UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para
otimização do tratamento da doença de Chagas**

Erika Cristina Vargas de Oliveira

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para
otimização do tratamento da doença de Chagas**

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

Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientada: Erika Cristina Vargas de Oliveira

Orientadora: Juliana Maldonado Marchetti

Ribeirão Preto

2014

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Erika Cristina Vargas de
Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico
para otimização do tratamento da doença de Chagas. 73p.;
30cm.

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado

1. Nanoemulsões. 2. Ácido ursólico. 3. Doença de Chagas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Erika Cristina Vargas de Oliveira

Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas.

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

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Juliana Maldonado Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Filomena e Worney e à
minha irmã Ana Thais, obrigada por
serem tão presentes.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti** pela orientação, amizade, confiança no meu potencial e oportunidade de crescimento pessoal e profissional;

Àos **Profs. Dres. Norberto Peporine Lopes, Roberto Santana e Sergio de Albuquerque** por abrirem as portas de seus laboratórios e pelas valiosas discussões nos ensaios de espectrometria de massas, espectroscopia do infravermelho e ensaios de citotoxicidade e atividade biológica, respectivamente;

Às **Dras. Monica Maruno e Fabiana T.C.M. Vicentini** e ao **Prof. Dr. Roberto Santana** pela contribuição no exame de qualificação;

Dra. Anne-Marie PENSE-LHERITIER, Dr. Vianney FRÉVILLE e Dra. Samar ISSA e todos os integrantes da École de Biologie Industrielle pela acolhida e a oportunidade de crescimento pessoal e profissional quando do estágio em suas dependências;

Aos técnicos **José Carlos Tomaz, José Clovis Júnior, e Cristiana Gonçalves** pela fundamental contribuição com os ensaios de espectrometria de massas, espectroscopia do infravermelho e ensaios de citotoxicidade e atividade biológica, respectivamente;

Aos técnicos e amigos **Henrique Diniz, Fabíola Silva Garcia Praça e José Orestes Del Ciampo** pela constante ajuda em nossos trabalhos, pelas leituras de tamanho de partículas e pelas longas horas de cromatografia;

Aos amigos e colegas de laboratório, do início ao fim da jornada: **Aline Armelini, Clemilton Cunha, Danielle Mano, Fernando Topan, Josimar Eloy, Juliana Barcellos, Larissa Bueno, Livia Borgheti, Livia Depieri, Marcelo Kravicz, Marina Claro, Margarete Moreno, Mayara Trevisani, Patrícia Campos, Raquel Petrilli, Samantha Marota-Oliveira e Thais Abelha**. Obrigada por contribuírem, cada um à sua maneira e à seu tempo, com esta experiência tão rica;

À amiga **Cristina** pela confiança, paciência, ajudas e por fazer da nossa república o nosso lar;

Aos amigos **Fernando e Gisely**, que desde o mestrado me acompanham, nossa aproximação brilhou o caminho;

Ao meu namorado **Juliano**, obrigada por me mostrar sempre uma outra opinião;

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP**, pela valiosa oportunidade de aprimoramento profissional;

Às empresas: **BASF** e **GATTEFOSSÉ** por gentilmente cederem as matérias-primas para a execução deste trabalho;

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro;

À todos que contribuíram e torceram direta ou indiretamente, para o sucesso desta pesquisa;

MUITO OBRIGADA

“Nada a temer senão o correr da luta
Nada a fazer senão esquecer o medo
Abrir o peito a força, numa procura
Fugir as armadilhas da mata escura

Longe se vai
Sonhando demais
Mas onde se chega assim
Vou descobrir
O que me faz sentir
Eu, caçador de mim “

(Milton Nascimento)

RESUMO

OLIVEIRA, E.C.V., Desenvolvimento de nanoemulsões contendo ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas. 2014. 73p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2014.

Mais de cem anos após a descoberta da doença de Chagas esta permanece vitimando milhares de pessoas. Antes restrita à América Latina, hoje já é motivo de alerta na Europa e EUA. Causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, é uma doença silenciosa, com graves complicações sistêmicas. Há 40 anos existem somente dois medicamentos para tratamento de Chagas, porém, estes não tratam a fase crônica e possuem efeitos colaterais severos. Nos últimos anos houve progresso no desenvolvimento de novos fármacos com atividade tripanocida e muitas pesquisas têm sido conduzidas neste âmbito cujo principal alvo ainda são os produtos naturais. O ácido ursólico é um terpeno de origem natural que já demonstrou ter importante ação tripanocida além de hepatoprotetora e antitumoral, porém, a hidrofobicidade deste composto é um desafio na produção de formas farmacêuticas que o veicule. As nanoemulsões têm aplicação na indústria cosmética e de medicamentos devido a vantagens como maior capacidade de solubilização em relação às emulsões convencionais permitindo a incorporação de fármacos pouco solúveis em água na fase oleosa além de maior estabilidade conferida pelo tamanho diminuto dos glóbulos e aumento da disponibilidade do fármaco. O método para análise do ácido ursólico por CLAE foi validado e mostrou-se seletivo, linear na faixa de 1,0 a 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção e quantificação correspondentes à 0,34 e 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A nanoemulsão desenvolvida apresentou estabilidade durante os 90 dias de teste, evidenciada pelos resultados obtidos nas análises por turbidimetria e índice de *Ostwald ripening*, porém, foi observada precipitação deste ao longo do tempo notadamente na concentração de 1 mg/mL. Aparentemente o fenômeno está relacionado à temperatura e a mudança desta variável para 30°C durante a emulsificação, foi eficaz para que não fosse mais observada diminuição nos valores de fármaco quantificado. Os ensaios de espectroscopia do infravermelho e espectrometria de massas permitiram verificar que o fármaco não reage com os demais componentes da formulação e não sofre degradação no período de tempo e nas condições estudadas. O ensaio *in vitro* do perfil liberação demonstrou que o fármaco foi imediatamente liberado da nanoemulsão o que não ocorreu quando comparado com a mistura física. Os ensaios de atividade biológica demonstraram que o sistema é seguro para a linhagem celular testada e apresenta boa atividade tripanocida para formas amastigotas.

Palavras chave: 1. Nanoemulsões; 2. Ácido ursólico; 3. Doença de Chagas

ABSTRACT

OLIVEIRA, E.C.V. Development of nanoemulsions containing ursolic acid to optimize the treatment of Chagas disease. 2014. 73p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2014.

Over a hundred years after the discovery of Chagas disease it remains victimizing thousands of people. Previously restricted to Latin America, today is reason for alert in Europe and USA. Caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is a silent disease, with severe systemic complications. For more than 40 years, there are only two drugs to treat Chagas disease, however, these do not have an effect on the chronic phase and have severe side effects. In recent years there has been progress in the development of new drugs with trypanocidal activity and many researches have been conducted in this area whose main target is still natural products. Ursolic acid is a naturally occurring terpene that has already shown to have important trypanocidal action besides antitumor and hepatoprotective, however, the hydrophobicity of this compound is a challenge to produce proper delivery systems. Nanoemulsions find use in the cosmetic industry and medicine due to advantages such as greater solubilizing capacity compared to conventional emulsions enabling the incorporation of sparingly soluble drugs in water in the oily phase besides greater stability conferred by the diminutive size of the droplets and increased availability of the drug. The chromatographic method to quantify ursolic acid was validated and shown to be selective, linear in the range from 1.0 to 50.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a limit of detection and quantification corresponding to 0.34 and 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The developed nanoemulsion was stable throughout the 90 days of testing, as evidenced by the results obtained from the analysis by turbidimetry and Ostwald ripening index, however, precipitation was observed over time particularly at a concentration of 1 mg/ml. Apparently the phenomenon is related to temperature and the change of this variable to 30°C during emulsification was successful in that it was no longer observed decrease in the amounts of quantified drug. Infrared spectroscopy and mass spectrometry results allowed to verify that the drug does not react with other components of the formulation and do not suffer degradation in the time period under the studied conditions. The in vitro release profile showed that the drug was immediately released from the nanoemulsion which was not observed with the physical mixture. The biological activity assays showed that the system is safe for the tested cell line and shows good trypanocidal activity for amastigotes.

Keywords: 1. Nanoemulsions; 2. Ursolic acid; 3. Chagas disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . Adaptado de Rassi Jr. (2010).....	3
Figura 02: Estruturas químicas dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox, desde a década de 1970 empregados no tratamento da Doença de Chagas. Adaptado de Urbina, 2010.	5
Figura 03: Estruturas dos fármacos antifúngicos conhecidos como azóis. Nos círculos estão evidenciados os anéis azóis, com dois nitrogênios, característico dos imidazóis como o cetoconazol, e com três nitrogênios, dos triazóis, como o itraconazol. Adaptado de Villalta, 2013 e Coura & Castro, 2002.....	8
Figura 04: Estruturas moleculares de alguns componentes de origem vegetal que apresentam ação sobre o <i>Trypanosoma cruzi</i> . Adaptado de Saúde-Guimarães, 2007 e Izumi, 2012	13
Figura 05: Estruturas moleculares dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico. Adaptado de Ferreira, 2013	15
Figura 06: Representação da formação de nanoemulsões por inversão de fases (catastrófico ou EPI) esquematizando os processos que ocorrem de acordo com o aumento da concentração de água no sistema. Adaptado de Solans 2012	19
Figura 07: Representação da formação de nanoemulsões pelo método de Temperatura de Inversão de Fases – TIF esquematizando os processos que ocorrem de acordo com as diferentes temperaturas pelas quais passa o sistema. Adaptado de Solans 2012.....	19
Figura 08: Estruturas químicas das matérias-primas empregadas na nanoemulsão desenvolvida. Fonte: Gatefossé, 2009 e 2010, Gelderblom, 2001 ...	23
Figura 09: Varredura do ácido ursólico monitorado de 190 a 400nm.....	32
Figura 10: Representação esquemática de cromatograma monitorado em 203nm com fase móvel acetonitrila:água (88:12) e vazão de 1mL/min, volume de injeção de 20µL.....	33
Figura 11: Curva analítica do ácido ursólico nas concentrações correspondentes à 1, 5, 10, 25 e 50µg/mL.....	33
Figura 12: Representação do diagrama de fases e a área selecionada para estudo	40
Figura 13: Resultados obtidos na determinação do índice de <i>Ostwald ripening</i> das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada	43

Figura 14: Dados brutos de retrodifusão no modo com referência, obtidos pelo aparelho Turbiscan evidenciando os padrões que representam fenômenos de instabilidade das emulsões: cremação (A), sedimentação (B) e coalescência ou floculação – aumento do tamanho das partículas (C)	45
Figura 15: Gráfico de variação da retrodifusão calculada a partir da variação turbidimétrica das formulações contendo 0,5 e 1 mg/mL de ácido ursólico	45
Figura 16: Gráficos demonstrando as variações da turbidimetria nas nanoemulsões contendo 0,5 mg/mL (A) e 1 mg/mL (B) de ácido ursólico. O modo som referência permite avaliar se ocorreram processos de instabilidade e o modo sem referência permite análise inter amostras.....	46
Figura 17: Resultados da quantificação de fármaco nas formulações submetidas ao teste de estabilidade acelerada	47
Figura 18: Difractogramas obtidos após análise das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade acelerada.....	48
Figura 19: Espectro de Infravermelho de ácido ursólico puro e em conjunto com os tensoativos, submetidos à temperatura de 37°C ou não	49
Figura 20: Resultados da quantificação de fármaco nas formulações preparadas a 30±5°C e submetidas ao teste de estabilidade acelerada	50
Figura 21: Espectro de massas em modo negativo do ácido ursólico evidenciando pico com relação massa carga em torno de 455m/z.....	52
Figura 22: Espectros de massa em modo negativo da nanoemulsão com ácido ursólico na concentração de 0,5 mg/mL nos dias 01 (acima) e 90 (abaixo) após preparação	53
Figura 23: Espectros de massa em modo negativo da nanoemulsão com ácido ursólico na concentração de 0,5mg/mL nos dias 01 (acima) e 90 (abaixo) após preparação	54
Figura 24: Representação do diagrama dos parâmetros de solubilidade de Hansen.....	56
Figura 25: Representação gráfica dos parâmetros de solubilidade de Hansen para o ácido ursólico e excipientes. Pontos próximos sugerem maior solubilidade entre si	57
Figura 26: Perfil de liberação do ácido ursólico a partir da nanoemulsão e mistura física em meios básico e ácido.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Precisão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico	35
Tabela 02: Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico	35
Tabela 03: Robustez do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico	36
Tabela 04: Solubilidade do ácido ursólico em diversos óleos e tensoativos ...	37
Tabela 05: Valores de EHL testados para o Propilenoglicol monocaprilato (Capryol [®] 90) com dois pares de tensoativo	39
Tabela 06: Composição das formulações manipuladas a partir do diagrama ternário	40
Tabela 07: Resultados de tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade do estudo de temperatura de emulsificação	41
Tabela 08: Tamanhos de glóbulos e polidispersividade das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada	42
Tabela 09: Teor de fármaco quantificado em nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade acelerada sem filtração prévia da amostra	47
Tabela 10: Resultados da determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico	49
Tabela 11: Tamanho de glóbulos e polidispersividade das formulações preparadas a 30±5°C submetidas ao estudo de estabilidade acelerada	50
Tabela 12: Resultados da atividade da nanoemulsão contendo ácido ursólico sobre formas morfológicas do <i>T. cruzi</i> e citotoxicidade sobre células da linhagem LLC-MK2	59

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

AU: Ácido Ursólico

CC₅₀: atividade citotóxica

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV: Coeficiente de Variação

CYP51: 14- α -demetilase

DLS: Dynamic Light Scattering – Espalhamento dinâmico de luz

DNDi: Drugs for Neglected Disease Initiative – Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas

EHL: Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

EM: Espectrometria de Massas

EO: Ethylene Oxyde – óxido de etileno

EPI: Emulsion Phase Inversion – emulsificação por inversão de fases

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

ESI: Electrospray Ionization – ionização por eletrospray

GAPDH: gliceraldeído-3-fostado desidrogenase

IC₅₀: atividade tripanocida

ISe: Índice de Segurança

ISE: Inibidores da Síntese de Ergosterol

KBr: brometo de potássio

Kg: Kilogramas

LAFEPE: Laboratório Farmacêutico de Pernambuco

LES: Lupus Eritrematoso Sistêmico

mA: miliampéres

mg: miligramas

mm: milímetros

MPa: milipascal

m/z: relação massa carga

NO: Óxido Nítrico

nm: nanometros

O/A: óleo em água

OMS: Organização Mundial da Saúde

Pdl: índice de polidispersividade

PDP: Product Development Partnership – Parceria para desenvolvimento de produtos.

PEG: Polietilenoglicol

pKa: constante de dissociação

PMS: N-Methylphenazonium methyl sulfate

PSH: Parâmetros de Solubilidade de Hansen

SD: Standard Deviation – desvio padrão

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TIF: Temperatura de Inversão de Fases

TNF- α : Tumoral Necrose Factor – fator de necrose tumoral

VNI: (R)-(N)-(1-(2,4-diclorophenil)-2-(1H-imidazol-1-yl)etil)-4-(5-phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)benzamide

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2*H*-Tetrazolium-5-carboxanilide

λ : comprimento de onda

δ : parâmetro de solubilidade de Hildebrand

δ_d : forças dispersivas

δ_p : interações polares

δ_h : ligações de hidrogênio

μM : micromolar

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas e símbolos	vi
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. Doença de Chagas.....	1
1.2. Tratamento da doença de Chagas	4
1.2.1. Benzonidazol e Nifurtimox.....	5
1.2.2. Inibidores da síntese do ergosterol (ISE) – antifúngicos azóis.....	7
1.2.3. Compostos de origem vegetal.....	10
1.3. Ácido ursólico.....	14
1.3.1. Atividade tripanocida do ácido ursólico.....	16
1.4. Nanoemulsões	17
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral.....	22
2.1. Objetivos específicos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. MATERIAL	23
3.1.1. Matérias-primas da nanoemulsão	23
3.1.2. Demais excipientes e solventes	24
3.1.3. Coluna cromatográfica	25
3.2. MÉTODOS.....	25
3.2.1. Desenvolvimento e validação do método para análise do ácido ursólico por CLAE	25
3.2.1.1. Condições cromatográficas	25
3.2.1.2. Validação do método analítico.....	25
3.2.2. Determinação da solubilidade do ácido ursólico em óleos e tensoativos.....	26
3.2.3. Determinação do EHL do propilenoglicol monocaprilato (Capryol®90)	27
3.2.4. Desenvolvimento das nanoemulsões	27
3.2.4.1. Obtenção das formulações.....	28
3.2.4.1.1. Determinação da temperatura de emulsificação.....	28

3.2.4.2. Análise macroscópica das formulações.....	28
3.2.4.3. Teste de centrifugação.....	28
3.2.4.4. Determinação do tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade.....	28
3.2.5. Estudo de estabilidade acelerada.....	29
3.2.5.1. Turbidimetria.....	29
3.2.5.2. Difração de Raios-X.....	29
3.2.6. Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico.....	29
3.2.6.1. Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.2.7. Espectrometria de massas.....	30
3.2.8. Determinação dos parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH) para o ácido ursólico.....	30
3.2.9. Avaliação do perfil de liberação in vitro.....	31
3.2.10. Avaliação da citotoxicidade.....	31
3.2.11. Avaliação da atividade antiparasitária.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Desenvolvimento e validação do método para análise do ácido ursólico por CLAE.....	32
4.2. Determinação da solubilidade o ácido ursólico em óleos e tensoativos.....	36
4.3. Determinação do EHL do propilenoglicol monocaprilato (Capryol®90).....	37
4.4. Desenvolvimento das nanoemulsões.....	39
4.4.1. Determinação da temperatura de emulsificação.....	41
4.4.2. Estudo de estabilidade acelerada – Ostwald ripening, Difração de Raios-X e Turbidimetria.....	42
4.5. Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico – Espectrosocopia do infravermelho.....	48
4.6. Avaliação das formulações preparadas a 30°C como temperatura de emulsificação.....	49
4.7. Espectrometria de massas.....	51
4.8. Determinação dos parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH) para o ácido ursólico.....	55
4.9. Avaliação in vitro do perfil de liberação.....	57
4.10. Avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária.....	58
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Doença de Chagas

Em 1907 o pesquisador de Manguinhos, Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, tinha a missão de combater a malária no norte de Minas Gerais. Paralelamente, interessou-se por um inseto hematófago muito presente nas casas de pau a pique daquela região e, analisando-o, descobriu em seus intestinos o protozoário *Trypanosoma cruzi*, assim nomeado em homenagem a Oswaldo Cruz, mentor de Carlos Chagas. Durante sua estadia observou sintomas patológicos inexplicáveis na população e passou então a pesquisar a associação entre os sintomas e o novo parasita descoberto. Em 1909 Carlos Chagas descobriu pela primeira vez o protozoário no sangue de uma menina de dois anos, Berenice, na fase aguda da doença. Em 22 de abril do mesmo ano, Oswaldo Cruz anunciou formalmente à Academia Nacional de Medicina a descoberta, por Carlos Chagas, de uma nova doença: a tripanossomíase americana ou “moléstia de Chagas” (KROPF, 2009).

O parasita *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, intracelular obrigatório. É um parasita intracelular considerado generalista por ser capaz de infectar diferentes tipos de células, fagocitárias e não fagocitárias, como células musculares e fibroblastos, além de macrófagos. Seu ciclo de vida é dos mais complexos entre os parasitas tripanossomatídeos, pois apresenta uma série de diferenciações morfológicas, intimamente ligadas à interação com o hospedeiro (ANDRADE & ANDREWS, 2005; CAMPOS, 2007).

A Doença de Chagas é dividida em duas fases sucessivas: aguda e crônica. A fase aguda tem duração de 4 a 8 semanas podendo ser assintomática ou apresentar sintomas que aparecem de uma a duas semanas após a infecção. Nesta fase o parasita pode ser detectado no sangue por meio de exame direto. Os sintomas podem ser brandos como febre, mal estar, inchaço de linfonodos e conjuntivite característica (sinal de Romaña). Em alguns casos, pode ocorrer nesta fase dilatação e efusão pericárdica, edema subcutâneo e hepato-esplenomegalia, efeitos do estado inflamatório causado pela infecção, dependendo do estado de

saúde do paciente e da cepa do parasita. (CAMPOS, 2007; MONCAYO & SILVEIRA, 2009; RASSI JR., 2010). Após este período, geralmente, o paciente recupera a saúde aparente e a doença evolui para a fase crônica onde o parasita se aloja nos órgãos internos. Muitos têm a forma indeterminada da doença, não apresentando sintomas e não sendo esta detectada por métodos diagnóstico padrão. Entretanto, 20 a 35% dos infectados desenvolvem danos irreversíveis nos órgãos internos 20 a 30 anos após a infecção. Lesões no sistema nervoso, no trato digestivo (megacólon, megaesôfago), ritmo cardíaco alterado e parada cardíaca são algumas das complicações da doença de Chagas que permanecem por toda a vida do paciente. A severidade dos sintomas varia de leve a grave, dependendo da extensão do comprometimento dos órgãos envolvidos, e isto determina a morbidade da doença. As causas das variações clínicas e epidemiológicas não estão totalmente esclarecidas. Inicialmente eram atribuídas somente ao parasita e sua ação sobre o corpo humano. Entretanto a escassez de parasitas observada em alguns pacientes assim como a intensa inflamação dos tecidos sugerem o envolvimento de processos auto-imunes na evolução da doença. (ANDRADE & ANDREWS, 2005; MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Durante muitos anos após a descoberta da doença a transmissão vetorial, pelo inseto *Triatoma*, conhecido como barbeiro, ao hospedeiro humano, foi a principal via de contaminação. Neste caso ocorre o ciclo de vida mais conhecido do parasita (**Figura 01**), que se inicia no intestino anterior do hospedeiro inseto, ao adquirir a forma tripomastigota do parasita ao alimentar-se de sangue do mamífero. Em seguida o parasita migra para a porção média do intestino do inseto onde se diferencia em epimastigota e se multiplica. Este migra para o intestino posterior do inseto onde se diferencia na forma infectante tripomastigota. Estas formas são excretadas nas fezes do inseto quando este se alimenta novamente de sangue. Ao atingirem a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, infectam vários tipos celulares e, dentro das células, se diferenciam em amastigotas, multiplicam-se e diferenciam-se novamente em tripomastigotas para então eclodirem a célula hospedeira e infectar novas células. A infecção pelo protozoário pode ocorrer ainda por: transfusão sanguínea, transplante de órgãos, forma congênita, acidentes laboratoriais e ingestão de alimentos contaminados. Nestes casos, o parasita é transmitido na forma tripomastigota infectante. (GULL, 2001; VILLALTA, 2009; RASSI JR., 2010; SOUZA, 2010)

Figura 01: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Rassi Jr. (2010).

Atualmente, mais de 100 anos após sua descoberta, a gestão e o conhecimento sobre a doença têm passado por profundas e substanciais mudanças. A transmissão pelo inseto barbeiro tem diminuído acentuadamente nos últimos 15 a 20 anos nas Américas Central e do Sul devido aos programas de controle de vetores. Países como Uruguai, Chile, Brasil e Guatemala consideram tal forma de transmissão interrompida desde 1997, 1999, 2006 e 2009, respectivamente. Porém, regiões da Bolívia, Argentina e Paraguai (Gran Chaco) ainda são consideradas de risco para transmissão pelo vetor devido a condições precárias de habitação e baixa eficácia dos inseticidas (YOSHIDA, 2008; BIOLO, 2010; LESCURE, 2010). Apesar de todos os esforços, ainda hoje a Doença de Chagas é endêmica na América Latina e estima-se que oito milhões de pessoas estejam infectadas nos 21 países da região, causando 14.000 mortes por ano. No Brasil, estima-se dois milhões de infectados com 150 a 200 novos casos anuais sendo 95% destes nos estados do Pará e Amapá. Nestes estados há grande consumo de açaí. A ingestão deste fruto manipulado em condições precárias de higiene, contendo o triatoma, ou suas fezes, com parasitas é hoje a principal via de contaminação nestes locais (YOSHIDA, 2008; PUFF, 2012).

Nos últimos 25 anos os padrões migratórios de pessoas das Américas Central e do Sul para a América do Norte e Europa têm mudado o panorama da Doença de Chagas. Estima-se de 300 mil a 1 milhão de infectados nos Estados Unidos, principalmente no estado do Texas e ao longo do Golfo do México onde podem ser

encontrados insetos vetores. Além disso, transplante de órgãos, transfusão sanguínea e transmissão congênita são responsáveis por aproximadamente 900 novos casos da doença neste país. Na Europa são estimados 24 a 38 mil casos de Chagas, sendo 12 a 25 mil somente na Espanha (BIOLO, 2010; LESCURE, 2010; HOTEZ, 2012). Esta nova distribuição da doença e o aniversário de 100 anos de sua descoberta em 2009 renovaram as atenções de governos e da iniciativa privada em busca de novas medidas e novos medicamentos para a cura da Doença de Chagas.

1.2. Tratamento da doença de Chagas.

Até a publicação do “Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas” em 1932 por Evandro e Carlos Chagas, não havia tratamento específico para a tripanossomíase americana. Muitos fármacos haviam sido testados, porém sem sucesso. Entre 1912 e 1968 haviam sido testados 27 compostos (arsenical, fucsina, cloreto de mercúrio e tártaro emético) e mais de 30 antibióticos, sem ação. Em 1961 apareceram os primeiros resultados demonstrando que a nitrofurazona em esquema de duração prolongada (aproximadamente 53 dias) na dose de 100mg/Kg/dia curava 95% dos camundongos infectados. A partir disso abriu-se uma nova era na terapêutica da doença de Chagas (COURA & CASTRO, 2002; CAMPOS, 2007).

Nos últimos anos houve progresso nas ações para o tratamento da doença de Chagas. Além do melhoramento dos medicamentos e da terapêutica já existentes, o desenvolvimento de novos fármacos também tem sido estudado. A atividade tripanocida é o principal alvo das pesquisas. Desde a elucidação do genoma do *T. cruzi* em 2005 surgiu uma nova vertente de pesquisas no intuito de obter novas ferramentas, porém, nenhum novo fármaco é esperado para os próximos anos. A OMS (Organização Mundial da Saúde) apoia e promove a criação de parcerias para desenvolvimento de novos produtos sem fins lucrativos, as PDPs (Product Development Partnerships). Uma delas, a DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative – *Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas*) desenvolveu um banco de dados sobre a doença de Chagas e incentiva a pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para, além desta doença, a malária, a doença do sono e a leishmaniose (RIBEIRO, 2009; CLAYTON, 2010).

1.2.1. Benzonidazol e Nifurtimox

No final da década de 60 e início de 70 dois novos fármacos surgiram com melhores perspectivas para o tratamento de Chagas na fase aguda, o Nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetrahydro-4H-1, 4-tiazina-1,1-dióxido – Bayer) e o Benzonidazol (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida – Roche, hoje produzido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco - LAFEPE). Ambos (**Figura 02**) fazem parte da mesma família, a dos nitroheterocíclicos mas possuem diferentes grupos químicos e diferentes mecanismos de ação contra o *T.cruzi*. (COURA & CASTRO, 2002; CAMPOS, 2007; URBINA, 2010).

Figura 02: Estruturas químicas dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox, empregados no tratamento da Doença de Chagas desde a década de 1970. Adaptado de Urbina, 2010.

O Benzonidazol age inibindo o desenvolvimento dos parasitas impedindo a multiplicação destes por meio da ligação de seus intermediários nitroreduzidos a componentes celulares como lipídios e DNA. A ação tripanocida do Nifurtimox deve-se a redução metabólica do grupo nitro produzindo radicais nitroânion muito reativos, que geram a produção de compostos de oxigênio tóxicos, como por exemplo, o superóxido, o peróxido de hidrogênio e radicais de hidroxila. Como o *T. cruzi* é deficiente nos mecanismos de detoxificação, ele se torna mais susceptível à ação nociva destes compostos (LOPES, 2007). A eficácia de ambos varia muito em qualidade e extensão. Depende da fase da doença, período do tratamento, dose, idade e origem geográfica do paciente devido à grande variabilidade genética do *T. cruzi* (URBINA, 2010). Em 1999 foi estabelecido um consenso sobre as cepas do parasita e duas linhagens principais foram descritas: *T. cruzi* I, silvestre, presente na

bacia amazônica e *T. cruzi* II, predominante no ambiente doméstico, no cone sul da América do Sul. Este último é subdividido em cinco tipos, Ila a Ile e em 2006 foi relatada a existência de *T. cruzi* III (RASSI JR., 2010).

Os melhores resultados para o tratamento com ambos os fármacos são observados durante a fase aguda da doença e em infecções por via congênita ou por acidente laboratorial. O tratamento pode durar de 15 a 90 dias com uma a três tomadas diárias com doses que variam entre 5 e 15mg/Kg/dia, dependendo do fármaco e do caso. A cura geralmente ocorre em 60 a 80% dos pacientes tratados na fase aguda. Quando o tratamento ocorre na fase crônica, os índices de cura são de 6 a 10%. Entre os dois, o Benzonidazol apresenta melhores perfis de segurança e eficácia. No Brasil, o tratamento da doença de Chagas é feito exclusivamente com Benzonidazol, nas formas adulta e pediátrica, produzidas pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) (COURA & CASTRO, 2002; CAMPOS, 2007; RASSI JR., 2010; URBINA, 2010).

O tratamento da doença de Chagas com estes antiparasitários tem diversas controvérsias. Uma delas é o grande número e severidade dos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes. O Benzonidazol pode causar hipersensibilidade cutânea com aparecimento de erupções, edema generalizado, febre, linfoedenopatia, dor muscular e articular, trombocitopenia, púrpura e agranulocitose, polineuropatia, parestesia, e polineurite de nervos periféricos. O Nifurtimox pode ser responsável por anorexia, perda de peso, excitabilidade ou sonolência, náuseas, diarreias e polineuropatia periférica. Ambos são genotóxicos. A incidência dos efeitos depende da idade do paciente, sua região geográfica e do acompanhamento clínico (COURA & CASTRO, 2002; URBINA, 2010).

Outra grande limitação é a baixa atividade na fase crônica da doença que é a forma mais prevalente. O porquê ainda é incerto, porém acredita-se que esteja relacionado a propriedades farmacocinéticas desfavoráveis como, baixa penetração tissular e meia-vida curta. Soma-se a isso ainda a falta de um marcador biológico confiável que ateste a resposta clínica. Para comprovar eficácia e cura são necessários anos de acompanhamento do paciente. Os métodos sorológicos respondem lentamente à eliminação do parasita circulante e, na fase crônica, a quantidade de parasitas circulantes fica abaixo dos limites de detecção dos métodos disponíveis porém sem assegurar a ausência deste (PINAZO, 2010; URBINA, 2010).

Hoje, o tratamento antiparasitário é recomendado para todos os casos na fase aguda, para aqueles transmitidos por forma congênita e para infecção reativada, todas as crianças e jovens até 18 anos na fase crônica. Para adultos, o tratamento deve ser oferecido a todos entre 19 e 50 anos sem complicações cardíacas avançadas e, é opcional para os maiores de 50 por não terem sido observados benefícios nesses casos. O tratamento com antiparasitários é contraindicado para gestantes e pacientes com complicações cardíacas e/ou digestivas avançadas nos quais é feito somente tratamento sintomático (RASSI JR., 2010). Em 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA aprovou a forma pediátrica do benzonidazol que foi desenvolvida pelo (LAFEPE) em parceria com a DNDi e já encontra-se em fase de produção (SEMERENE, 2011).

1.2.2. Inibidores da síntese de ergosterol (ISE) – antifúngicos azóis.

Os esteróis são componentes lipídicos essenciais aos organismos eucarióticos. Presentes na membrana celular regulam funções como sua permeabilidade e fluidez e também participam do metabolismo aeróbico e regulação do ciclo celular. Alguns organismos eucarióticos (como insetos e o protista - *Trypanosoma brucei*) obtêm os esteróis essenciais de fontes exógenas, como por exemplo, da alimentação. Outros precisam sintetizar seus esteróis. O produto final da síntese de esteróis varia entre as espécies de eucariotas. Mamíferos produzem colesterol enquanto plantas, fungos e alguns protozoários produzem ergosterol. Em todos os casos a deficiência de esteróis é letal. A inibição da sua biossíntese é alvo de medicamentos largamente empregados no tratamento de infecções fúngicas desde a década de 80 (BUCKNER, 2012; VILLALTA, 2013).

Os antifúngicos conhecidos como azóis são compostos sintéticos classificados em imidazóis ou triazóis de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol de cinco membros. Deste grupo fazem parte, entre outros, cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol, ravuconazol e posaconazol (**Figura 03**). A atividade destes fármacos se deve a inibição das enzimas do citocromo P450 responsáveis pela produção de esteróis (SHEPPARD, 2002; VILLALTA, 2013).

Figura 03: Estruturas dos fármacos antifúngicos conhecidos como azóis. Nos círculos estão evidenciados os anéis azóis, com dois nitrogênios, característico dos imidazóis como o cetoconazol, e com três nitrogênios, dos triazóis, como o itraconazol. Adaptado de Villalta, 2013 e Coura & Castro, 2002.

O citocromo P450 é uma superfamília de hemoproteínas que contém mais de 2.500 membros divididos em 281 famílias. O CYP51 ou estero 14 α -demetilase é uma família do P450 cuja função é catalisar uma reação de três passos para remoção oxidativa do grupo metila 14 α do precursor cíclico do estero. Este grupo é convertido em álcool, aldeído e é então retirado na forma de ácido fórmico na etapa final. Com esta via bloqueada ocorre acúmulo tóxico do estero cíclico e distúrbios na membrana celular por deficiência de estero causando morte do microorganismo (LEPESHEVA, 2004; BUCKNER, 2012; VILLALTA, 2013).

As primeiras evidências da ação dos ISE sobre o *T. cruzi* surgiram em 1981 com trabalho de Do Campo que demonstrou inibição do crescimento e modificações estruturais no parasita pela ação do miconazol. Desde então seguiram diversos estudos objetivando demonstrar a ação de antifúngicos sobre estes parasitas. O cetoconazol foi o primeiro a apresentar ação seletiva *in vitro* na fase aguda, porém, sem ação na fase crônica (CASTRO, 1993). Os demais azóis, itraconazol e

fluconazol, não foram efetivos para cura em modelo animal. Todos induzem resistência do parasita (COURA & CASTRO, 2002; BUCKNER, 2012).

Uma geração mais recente de azóis foi desenvolvida e vem sendo testada. O ravuconazol (Eisai Co e Bristol-Myers Squibb) demonstrou atividade tripanocida *in vitro*, porém, *in vivo*, em ratos, sua atividade foi limitada e em modelo canino a atividade foi somente inibitória e não curativa. Estes resultados podem ser atribuídos à meia-vida relativamente curta do fármaco nestes modelos, cerca de 4,5h em ratos e 8,8h em cães. Outro fármaco, o TAK-187 (Takeda Chemical Company), apresentou atividade contra infecções de fase aguda e crônica em modelos murinos mesmo em cepas resistentes ao nitrofuranos, mas este também apresenta meia vida curta. O posaconazol (Noxafil®, Merck), é atualmente o azól mais potente e eficaz contra o *T. cruzi*. Ele promoveu cura da infecção com o parasita em modelo murino e tem potencial contra cepas resistentes ao benzonidazol e nifurtimox mesmo em animais imunossuprimidos. Os bons resultados podem ser atribuídos à grande afinidade de ligação ao CYP51 do parasita, meia vida longa e acumulação do fármaco na membrana das células do hospedeiro, aumentando a disponibilidade do fármaco no local. O principal entrave para o uso deste fármaco em larga escala é seu alto custo de produção, cerca de 1.000 dólares por paciente, devido à longa reação de síntese e baixo rendimento desta (CASTRO, 1993; RIBEIRO, 2009; URBINA, 2009; BUCKNER, 2012; VILLALTA, 2013).

Em janeiro de 2013 foi publicado estudo de Villalta e colaboradores sobre os efeitos de um ISE, um imidazol, desenvolvido a partir da reconstituição da reação de síntese do ergosterol em laboratório, o VNI. Neste estudo é divulgado que este composto promoveu cura de Chagas nas fases aguda e crônica em ratos, com 100% de sobrevida dos animais e que este é, portanto, um excelente candidato para testes clínicos, mas tais estudos ainda não se iniciaram.

Outra abordagem estudada é o emprego dos azóis em terapia combinada com nitrofuranos. Diniz (2013) relatou efeitos curativos em animais (murino) com infecção aguda tratados por 10 dias com benzonidazol seguidos por 10 dias de tratamento com posaconazol. O que não foi observado durante tratamento de 10 dias com os dois medicamentos isoladamente. Pinazo (2010) descreve um caso crônico de Chagas e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) para o qual o tratamento com benzonidazol somente reduziu o número de parasitas circulantes. O tratamento

subseqüente com posaconazol levou ao desaparecimento dos parasitas mesmo com a manutenção do tratamento imunossupressivo para o LES.

1.2.3. Compostos de origem vegetal

O uso de substâncias de origem vegetal no tratamento de doenças e manutenção da saúde é uma prática antiga. A observação destas práticas, aliada a tecnologia, proporcionou o surgimento de diversos medicamentos atualmente empregados em larga escala. A presença dos produtos naturais na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos continua sendo imprescindível para o avanço das terapêuticas. No campo das tripanossomíases é possível encontrar na literatura diversos estudos que investigam a ação de uma variedade de extratos naturais brutos, compostos isolados e análogos semi-sintéticos contra o *T. cruzi*. De 1995 a 2010 foram pesquisadas mais de 300 espécies pertencentes a mais de 100 famílias diferentes. Entre as classes de compostos que apresentam resultados favoráveis, podemos citar as quinonas, os flavonóides, os alcalóides e os terpenos (**Figura 04**) (COURA & CASTRO, 2002; SAÚDE-GUIMARÃES, 2007; IZUMI, 2011).

Quinonas

Abundantemente presentes na flora brasileira, apresentam um grande potencial biológico. É uma família ampla dividida em benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas. Estas últimas têm tido maior destaque em estudos sobre atividade contra doenças. A ação das quinonas sobre os microorganismos se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam estresse oxidativo (FERREIRA, 2008).

A principal quinona testada contra Chagas é a β -lapachona (**1**). É uma naftoquinona produto do isolamento do lapachol este por sua vez obtido das cascas dos indivíduos da família Bignoneacea, popularmente conhecidos como ipês. A β -lapachona apresentou atividade tripanocida para as três formas morfológicas do parasita. Seu maior entrave é a toxicidade para o hospedeiro humano. No intuito de diminuí-la, foram desenvolvidos derivados naftoimidazólicos que apresentaram resultados contra as formas tripomastigota (CASTRO, 1993; COURA & CASTRO, 2002; DE MOURA, 2004).

Outras quinonas que também apresentaram alguma atividade contra o *T. cruzi*: a plumbagina, isolada da *Pera benensis*; a embelina, isolada de *Oxalis*

erythrorhiza, planta originária da Argentina; a purpurina, antraquinona isolada da *Rubia tinctorum* e 7-epiclusianona, uma benzoquinona extraída de *Rheedia gardneriana* (COURA & CASTRO, 2002; SAÚDE-GUIMARÃES, 2007).

Flavonóides

Formam um grande grupo de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Mais de cinco mil flavonóides já foram descritos e classificados de acordo com sua estrutura química. Caracterizam-se por apresentar dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono formando, na maioria dos casos, um heterociclo. A atividade dos compostos desse grupo se dá pela inibição da enzima gliceraldeído-3-fostado desidrogenase (GAPDH). Esta é parte da via glicolítica, que gera energia pela produção de ATP. Mecanismo do qual o *T. cruzi* é muito dependente. (DIAS, 2009; GOULART, 2012).

Ribeiro (1997) reporta que dois compostos, o 3-metoxiflavonol penduletina **(2)** e a flavona sacuranetina **(3)**, isolados de *Trixis vauthieri*, promoveram eliminação do parasita em sangue infectado, sendo esta última espécie o principal alvo das pesquisas com flavonóides. Em 2011 Marin e colaboradores demonstraram ação inibitória do *T. cruzi* de 9 flavonóides extraídos de *Delphinium staphisagria*. Da espécie *Lycnophora staavioides* foram isolados 10 flavonóides que reduziram os parasitas sanguíneos (SAUDE-GUIMARÃES, 2007).

Pode-se destacar ainda a ação de flavonóides presentes na própolis produzida em áreas de clima tropical e de clima temperado, que apresentaram atividade in vitro contra o *T. cruzi* (CASTRO, 2001)

Alcalóides

São compostos orgânicos heterocíclicos que possuem um ou mais nitrogênios em seu esqueleto carbônico. São encontrados em várias famílias vegetais como as *Apocynaceas*, *Papaveraceas*, *Rubiaceas* e *Solanaceas*. Devido à grande variedade de compostos, podem exercer diversos efeitos sobre os organismos como hipotensão arterial, efeito diurético, vasoconstrição periférica, estimulação respiratória e sedação, entre outros (PEREIRA, 2007). Variados também são os mecanismos de ação dos alcalóides sobre o *T. cruzi*.

A apomorfina **(4)** e β -carbolinas **(5)** inibiram a respiração celular nas formas epimastigotas do parasita em cepas resistentes ao nifurtimox. Alcalóides isolados de

espécies do gênero *Aspidosperma* inibiram o crescimento de *T. cruzi* ao se ligarem a seu DNA. Vincristina **(6)** e vinblastina **(7)**, isolados de *Vinca rosea*, impediram a divisão nuclear e conseqüente proliferação de formas epimastigotas (COURA & CASTRO, 2002; PEREIRA, 2007).

Demais alcalóides citados como ativos sobre o *T. cruzi*: cocsolina, dafnandrina, dafnolina, isolados de *Albertisia* cf. *A. papuana* Becc; lacina, obtida de *Caryomene olivascens*; girocarpina e feantina, isolados de *Gyrocarpus americanus* e isochondrodendrina, obtido de *Curarea candicans*; piperina, isolada de *Piper nigrum*; 2-n-propilquinolina, chimanina B e chimanina D, isolados de *Galipea longiflora* Krause (SAÚDE-GUIMARÃES, 2007).

Terpenos

São compostos que apresentam grande variedade de estruturas e funções. Derivam da combinação de unidades de 5 carbonos (C₅) chamadas isopreno. Os principais terpenos são monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e polisoprenóides (C_n) (BAKKALI, 2008; LIMA, 2011).

Entre os terpenos com ação sobre o *T. cruzi*, podemos citar diterpenos isolados de espécies das famílias vegetais *Asteracea*, *Annonacea*, *Meliacea*, *Fabacea* e *Lamiacea*, que apresentaram ações variadas entre inibição eliminação dos parasitas nas três formas morfológicas. O ácido caurenóico **(8)**, ácido xilópico e ácido traquilobânico são exemplos destes, que eliminaram o parasita de amostras de sangue contaminado (SAÚDE-GUIMARÃES, 2007; IZUMI, 2011).

Ainda entre os diterpenos, podemos citar o taxol **(9)**. Isolado da casca de *Taxus brevifolia*, é usado no tratamento para câncer de ovário, mama e pulmão em um medicamento conhecido como Paclitaxel desde 1992. É um agente antimitótico por meio de sua ação sobre o equilíbrio tubulina-microtúbulo. Dessa forma inibe o crescimento de formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* (CORREA, 1995; COURA & CASTRO, 2002).

Sesquiterpenos obtidos de membros da família *Asteracea* e *Lauracea* inibiram o parasita na sua forma replicante amastigota dentro de células do hospedeiro. Monoterpenos isolados de espécies das famílias *Gramineae*, *Lamiaceae* e *Lauraceae* foram ativos provocando a lise de formas tripomastigotas (IZUMI, 2011).

Ainda, Izumi e colaboradores (2012) relatam atividade sinérgica entre o diterpeno β -cariofileno (**10**) e o sesquiterpeno ácido copálico (**11**) isolados do óleo de copaíba. Eles promoveram mudanças no metabolismo oxidativo do parasita seguido de um processo de autofagia deste levando a sua morte seletiva e foram mais ativos nas formas replicativas amastigotas.

Entre os triterpenos, podemos citar a tingenona (**12**), extraída da *Taxus brevifolia* que causou a inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos em formas epimastigotas e, o ácido ursólico

Quinona

Flavonóides

Alcalóides

Terpenos

Ácido caurenóico (8)

Taxol (9)

B-cariofileno (10)

Ácido copálico (11)

Tingenona (12)

Figura 04: Estruturas moleculares de alguns componentes de origem vegetal que apresentam ação sobre o *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Saúde-Guimarães, 2007 e Izumi, 2012.

1.3. Ácido ursólico

O ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico (**Figura 05**) (Massa Molecular = 456,70; pKa = 4,68) são triterpenos pentacíclicos formados por 5 anéis de seis membros. São amplamente distribuídos no reino vegetal, tendo sido isolados de mais de 120 espécies, entre as quais, plantas e ervas comumente usadas na culinária e medicina como *Pyrus malus* (maçã), *Prunus domestica* (ameixa), *Rosemarinus officinalis* (alecrim) and *Ocimum basilicum* (manjerição). Também estão presentes nas raízes do *Panax ginseng*, planta de uso consagrado na medicina tradicional chinesa à qual são atribuídas propriedades diversas como aumento da memória e longevidade (LIU, 1995; RAMACHANDRAN, 2008; FERREIRA, 2013).

Figura 05: Estruturas moleculares dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico. Adaptado de Ferreira, 2013.

As propriedades medicinais verificadas empiricamente na prática da fitoterapia foram ao longo do tempo comprovadas por diversos estudos. Entre 1995 e 2005 contam-se por volta de 700 trabalhos científicos envolvendo os ácidos ursólico e oleanólico. Entre as atividades pesquisadas estão, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, anti-hiperlipidemia, anti-hiperglicemia, neuroproteção, hepatoproteção e antitumoral (LIU, 1995; RAMACHANDRAN, 2008).

Diversos estudos discutem as ações anti-inflamatória e analgésica dos ácidos ursólico e oleanólico. Vasconcelos e colaboradores (2006) relatam que uma dose de 40mg/Kg de ácido ursólico teve ação analgésica análoga à 100mg/Kg de ácido acetil salicílico na inibição de constrição abdominal em ratos. A ação anti-inflamatória tópica é reportada em estudo de Baricevic e colaboradores (2001) que observaram ação duas vezes mais potente que a da indometacina no tratamento de edemas em ratos. O mecanismo de ação destes compostos para inibir a inflamação também é alvo de pesquisas e pode estar relacionado ao estímulo de liberação de óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) em macrófagos como também à inibição do CYP450 em células hepáticas. (YOU, 2001; KIM, 2004).

Cunha e colaboradores (2007) observaram ação dos ácidos ursólico e oleanólico sobre cepas de espécies de *Streptococcus sp.* e *Enterococcus faecalis*, que são microorganismos responsáveis pela formação de cáries em humanos, evidenciando a ação antibactericida destes compostos.

Os efeitos anti-hiperlipidêmico e anti-hiperglicêmico foram apontados pela primeira vez por Somova e colaboradores (2003) e Matsuda e colaboradores (1998) respectivamente. Estes últimos atribuíram a ação hipoglicêmica à supressão da transferência da glicose do estômago para o intestino delgado e o transporte desta

nas microvilosidades em suas células, enquanto que o mecanismo hipolipidêmico ainda está sob investigação.

Ao ácido ursólico também é atribuída ação protetora sobre neurônios do hipocampo contra morte induzida por doenças neurodegenerativas por meio da proteção de mitocôndrias, diminuição da produção e aumento do sequestro de radicais livres (SHIH, 2004). Lu e colaboradores (2007) reportam melhora no déficit de cognição e atenuação do dano oxidativo em ratos, sendo assim promissor contra doenças senis.

A atividade hepatoprotetora do ácido oleanólico foi reportada primeiramente em 1975. Isolado de uma planta usada no tratamento de hepatite pela medicina chinesa (*Swertia mileensis*), promoveu proteção contra danos causados por tetracloreto de carbono em fígado de ratos. Desde então demonstrou proteção também contra danos causados por acetaminofeno, cádmio, bromobenzeno, furosemida e colchicina entre outros compostos, além dos danos resultantes de fibrose e cirrose crônicas. Tais efeitos podem ser atribuídos às ações antioxidante, anti-inflamatória e inibidora de enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias, promovidas tanto pelo ácido oleanólico quanto ursólico. Em uma comparação entre os isômeros, o ursólico se mostrou mais eficaz em reparar danos químicos em fígado de ratos (LIU, 1995; LIU, 2005).

Tanto o ácido oleanólico quanto o ursólico têm demonstrado ação nos diversos estágios de desenvolvimento de tumores. Ambos inibem o início do crescimento do tumor assim como agem na apoptose de células tumorais e impedem metástase e angiogênese nos tumores. As pesquisas envolvendo ação antitumoral destes compostos são amplas e contemplam diversos tecidos e sistemas como câncer de cólon, pele, pulmão e leucemias. O mecanismo de ação pelo qual agem sobre os tumores ainda não está elucidado, mas já emergem como promissores agentes para desenvolvimento de medicamentos antitumorais (LIU, 1995; LIU, 2005; KIM, 2004; FURTADO, 2008; RASHID, 2013).

1.3.1. Atividade tripanocida do ácido ursólico

Cunha e colaboradores, em 2003, testaram ácidos triterpênicos isolados de algumas espécies do gênero *Miconia* sobre formas tripomastigotas circulantes. Os ácidos ursólico, oleanólico e gypsogênico foram os mais eficientes em eliminar o parasita das amostras de sangue. A ação dos compostos foi atribuída à presença de

um grupo carboxila na posição C-28. Este foi o primeiro registro de ação tripanocida de ácidos triterpênicos.

O mesmo grupo, em 2006, testou *in vitro* e *in vivo* os ácidos ursólico, oleanólico, urjinólico e máslico, além de uma mistura de 2- α -hydroxiursólico e um sal potássico do ácido ursólico. Observaram que os ácidos ursólico e oleanólico foram os mais eficazes *in vitro* e, entre eles, o primeiro foi o mais eficaz *in vivo* tendo apresentado 75,7% de redução dos parasitas no pico parasitêmico em camundongos. Os pesquisadores atribuíram a ação tripanocida à presença dos grupos carboxila e hidroxila na molécula (CUNHA, 2006).

Em 2010, Ferreira e colaboradores determinaram 20mg/Kg/dia de ácido ursólico como sendo a dose mais eficaz em reduzir o número de parasitas no pico parasitêmico em camundongos. Neste mesmo trabalho relatam a segurança deste composto ao observarem que não houve mortes num período de 72h com administração de até 2.000mg/Kg. Três anos mais tarde, o grupo publicou que a via oral é a mais apropriada para administração do ácido ursólico quando comparada com a via peritoneal (FERREIRA, 2013).

Diante do exposto fica evidenciado o potencial do ácido ursólico como ativo para tratamento da doença de Chagas. Faz-se necessário então a condução de estudos que visem o desenvolvimento de formas farmacêuticas para veiculação deste. Para que isto seja possível é primordial contornar a principal limitação apresentada pelo ácido ursólico, que é sua alta lipofilicidade, fator este que limita a biodisponibilidade, interferindo na sua eficácia.

1.4. Nanoemulsões

Nanoemulsões são finas dispersões de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) com aspecto azulado, translúcido ou transluscente cujo tamanho dos glóbulos da fase interna varia de 50 a 200nm (TADROS, 2004) ou 100 a 600nm (BOUCHEMAL, 2004). São também referidas como miniemulsões, emulsões ultrafinas e emulsões submicron. São sistemas cineticamente estáveis e termodinamicamente instáveis. A primeira característica determina que tenham estabilidade por longos períodos de tempo, uma vez que o movimento Browniano dos glóbulos é suficiente para suplantar a ação da gravidade impedindo coalescência. A segunda, que necessitam de aporte de energia para serem

formadas, diferenciando-as das microemulsões, que são formadas espontaneamente (IZQUIERDO, 2005).

Os processos de produção das nanoemulsões podem ser divididos em dois tipos: métodos de alta energia e de baixa energia. Os primeiros permitem bom controle da distribuição do tamanho dos glóbulos e variedade na composição das formulações. Valem-se das forças deformadoras capazes de quebrar os glóbulos tornando-os menores. Tal energia pode ser obtida pelos homogeneizadores de alta pressão, geradores de ultrassom e dispositivos de alta rotação. Destes, os homogeneizadores de alta pressão são os mais utilizados por fornecerem a quantidade de energia necessária em menor tempo e com fluxo constante. (FERNANDEZ, 2004; IZQUIERDO, 2005; SOLANS, 2005).

Os métodos de baixa energia fazem uso da energia química armazenada no sistema. Exploram a transição de fases que ocorre durante a emulsificação que pode ser à temperatura constante variando a composição (Emulsion Phase Inversion (EPI), por inversão de fases ou catastrófica) (**Figura 06**) ou variando a temperatura (transicional, Temperatura de Inversão de Fases, TIF) (**Figura 07**). Neste último, o aumento da temperatura durante o preparo da emulsão favorece a mudança de solubilidade dos tensoativos não iônicos. Um tensoativo hidrofílico à baixa temperatura torna-se lipofílico com o aumento desta devido à desidratação das cadeias de óxido de etileno. Em valores intermediários de temperatura, onde os valores de tensão interfacial são extremamente baixos é formado um sistema bicontínuo onde os componentes coexistem. Neste sistema a taxa de coalescência é alta e ele é, portanto, instável. Quando ocorre redução da temperatura podem ser formadas emulsões cineticamente estáveis e com tamanho de glóbulos reduzido e baixo índice de polidispersividade. Na prática, a combinação de métodos de alta e baixa energia tem sido eficiente na produção de nanoemulsões com glóbulos pequenos e uniformes (FERNANDEZ, 2004; SANDURNÍ, 2005; SOLANS, 2005).

Figura 06: Representação da formação de nanoemulsões por inversão de fases (catastrófico ou EPI) esquematizando os processos que ocorrem de acordo com o aumento da concentração de água no sistema. Adaptado de Solans, 2012.

Figura 07: Representação da formação de nanoemulsões pelo método de Temperatura de Inversão de Fases – TIF esquematizando os processos que ocorrem de acordo com as diferentes temperaturas pelas quais passa o sistema. Adaptado de Solans, 2012.

O tamanho diminuto dos glóbulos da nanoemulsão lhe confere estabilidade contra processos de sedimentação, ou cremação, causados pela ação da força da gravidade sobre as partículas. A floculação, que depende das forças

eletromagnéticas ao redor dos glóbulos, pode ocorrer, mas o principal fenômeno de instabilidade que ocorre nas nanoemulsões é o *Ostwald ripening* ou difusão molecular. Caracteriza-se pela migração do conteúdo lipofílico de glóbulos menores para os maiores através da fase externa hidrofílica causando o aumento do tamanho dos glóbulos. Ocorre devido à diferença na solubilidade entre os glóbulos de diferentes tamanhos. A teoria de Lifshitz-Slezov-Wagner prevê relação linear entre o raio ao cubo e o tempo, sendo o slope da curva, a taxa de *Ostwald ripening* (TADROS, 2004, SOLANS, 2005)

As nanoemulsões têm larga aplicação na indústria cosmética e de medicamentos devido a vantagens como: (i) necessitam de pequena quantidade de tensoativos; concentrações de 3-10% podem ser suficientes, diminuindo a toxicidade e os custos; (ii) a grande área de superfície e a baixa tensão interfacial e superficial permitem o aumento da penetração dos fármacos, maior molhabilidade e espalhabilidade; (iii) podem ser substitutas dos lipossomas que são menos estáveis; (iv) podem ser utilizadas em diversas formas farmacêuticas como sprays, espumas, cremes, linimentos e géis. O melhor entendimento dos mecanismos de produção de partículas submicron, o aumento do número de estudos comprovando as vantagens das nanoemulsões sobre as emulsões simples e microemulsões e a melhor compreensão acerca dos componentes das formulações, técnicas de preparo e equipamentos envolvidos, têm atraído ainda mais o interesse das companhias sobre este sistema permitindo que novos produtos sejam desenvolvidos (BOUCHEMAL, 2004; TADROS, 2004; CONSTANTINIDES, 2008).

O potencial das nanoemulsões como sistemas de liberação de compostos hidrofóbicos, como o ácido ursólico, é demonstrado em diversos trabalhos disponíveis na literatura. Shafiq e colaboradores (2007) desenvolveram nanoemulsão contendo Ramipril e observaram aumento de 229,62% da biodisponibilidade em relação às cápsulas contendo o mesmo fármaco. Em 2012, Li e colaboradores apresentaram características físico-químicas de uma nanoemulsão para veiculação de polimetoxiflavonas extraídas de cascas de frutas cítricas que têm ação antitumoral. Borhade e colaboradores (2012) propuseram uma nanoemulsão de Clotrimazol para tratamento de malária. Desta forma puderam proteger o fármaco contra o pH ácido do estômago ao qual ele é sensível e conseguiram 100% de liberação do Clotrimazol em meios de diversos pH. McClements e colaboradores

(2013) fizeram uma revisão sobre técnicas de obtenção, estabilidade e propriedades de nanoemulsões destinadas à veiculação oral de bioativos hidrofóbicos.

A veiculação dos ácidos ursólico e oleanólico em sistemas nanoestruturados foi alvo de estudos de alguns autores. Chen e colaboradores (2005) produziram nanosuspensões com ácido oleanólico com finalidade hepatoprotetora. Em 2009, Xi e colaboradores desenvolveram um sistema auto-emulsionante para aumentar a biodisponibilidade oral do ácido ursólico com finalidade de possibilitar o tratamento de câncer de mama e próstata com estas substâncias.

O desenvolvimento de sistemas de liberação para o ácido ursólico visando o tratamento da doença de Chagas tem sido o objeto de pesquisas do grupo da orientadora deste trabalho, Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Em 2014 foram publicados os primeiros resultados acerca de dispersões sólidas e lipossomas desenvolvidos pelo grupo (ELOY, 2014; TREVISANI, 2014). As dispersões sólidas promoveram aumento da solubilidade aquosa do ácido ursólico, assim como a atividade tripanocida *in vivo* quando comparado ao controle negativo (ELOY, 2012). Os lipossomas promoveram 100% de morte de formas epimastigotas da cepa CL Brenner do parasita do parasita (TREVISANI, 2014). Está ainda em andamento o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas, além das nanoemulsões aqui propostas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo objetivou o desenvolvimento de nanoemulsões para administração oral do ácido ursólico visando à otimização da terapia da doença de Chagas.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico para a quantificação do fármaco estudado, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver uma nanoemulsão para veiculação por via oral do ácido ursólico;
- Avaliar e caracterizar o sistema por meio de medida de tamanho e distribuição de tamanhos de glóbulos e índice de *Ostwald ripening*; turbidimetria, difração de Raios-X, espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier e espectrometria de massas.
- Avaliar *in vitro* o perfil de liberação;
- Avaliar a segurança da formulação por meio de ensaios de citotoxicidade em linhagem celular;
- Avaliar a atividade antiparasitária em formas epimastigotas e amastigotas do parasito em cultura celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Matérias-primas da nanoemulsão

- Dietilenoglicol monoetil éter, $C_4H_{14}O_3$ (Transcutol[®] P; EHL = 4,2; Gattefossé – França, Lote: 451130002). Líquido incolor usado em produtos farmacêuticos e cosméticos como solvente para ativos e promotor de absorção. Permite desenvolvimento de formulações nas formas de emulsões e géis aquosos. É produzido pela condensação de óxido de etileno e álcool seguido de destilação (GATTEFOSSÉ, 2010) (**Figura 08**).
- Propilenoglicol monocaprilato (Capryol[®] 90; EHL = 12; Gattefossé – França, Lote: 1312-48). Líquido incolor viscoso miscível com água, álcool e diversos solventes. Ampla aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos como promotor de absorção, promotor de biodegradação e estabilizante de emulsões. (GATTEFOSSÉ, 2009) (**Figura 08**).
- Óleo de rícino etoxilado 35EO (Cremophor[®] EL; EHL = 13,5, BASF – Alemanha, Lote: 18531768EO). Líquido viscoso de coloração amarelo-castanho, límpido em temperaturas acima de 26°C. Solúvel em água e diversos solventes orgânicos como etanol, álcool isopropílico, acetato de etila, clorofórmio entre outros. Largamente empregado como solvente e tensoativo em preparações líquidas para uso tópico e oral (BASF, 2008). (**Figura 08**).

Transcutol[®] P

Capryol[®] 90

Cremophor® EL

Figura 08: Estruturas químicas das matérias-primas empregadas na nanoemulsão desenvolvida. Fonte: Gatefossé, 2009 e 2010, Gelderblom, 2001.

3.1.2. Demais matérias-primas e solventes.

- Acetonitrila grau cromatográfico (J.T. Baker – EUA, Lote: L38C60)
- Ácido clorídrico (Synth – Brasil, Lote: 144168)
- Ácido ursólico grau de pureza farmacêutico (Colastil; Idealfarma – Brasil, Lote: 090201)
- Água recentemente purificada por Sistema Milli-Q Plus (Millipore®/Millipore Corporation – EUA).
- Clorofórmio (J.T. Baker – EUA, Lote: M37C12)
- Fosfato de potássio monobásico anidro (Synth – Brasil, Lote: 154751)
- Hidróxido de sódio (Synth – Brasil, Lote: 125388)
- Metanol (J.T. Baker – EUA, Lote: J27C08)
- Monooleato de Sorbitano 80 (SPAN® 80, Alkest® O 80 M, EHL = 4,3, Oxiteno – Brasil)
- Óleo de rícino etoxilado 30EO (Ultramona® R300, EHL = 11,7; Oxiteno – Brasil)
- Óleo de rícino etoxilado 36EO (Ultramona® R360; EHL = 12,6; Oxiteno – Brasil)
- Óleo de rícino hidrogenado 40EO (Cremophor® RH40; EHL = 13; BASF – Alemanha)
- PEG 8 caprylic/capric glycerides (Labrasol®; EHL = 14; Gattefossé – França, Lote: 132338)
- Poligliceril 6 dioleato (Plurol Oleique®; EHL = 4,6; Gattefossé – França)
- Polissorbato 80 (TWEEN® 80, EHL = 15, ViaFarma – Brasil, Lote: 021021-103)

- Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Crodamol[®] GTCC; EHL = 8; Croda do Brasil – Brasil, Lote: 0000513338)

3.1.3. Coluna cromatográfica

- Lichrospher[®] C₁₈ Merck (d.i. 4,0 x 250 mm; 5 µm), protegida por uma coluna de guarda (d.i. 4x4 mm) de mesma composição.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Desenvolvimento do método para análise do ácido ursólico por CLAE

Foi realizada varredura em espectrofotômetro UV-vis Femto 800XI (Brasil) na faixa de 190 a 400 nm a fim de determinar o comprimento de onda de absorção máxima do ácido ursólico (λ).

3.2.1.1. Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu (Japão) constituído por uma bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP ($\lambda = 203$ nm), injetor Rheodyne, e integrador Chromatopac modelo C-R6A. A fase estacionária foi composta por uma coluna C₁₈ Lichrospher[®] Merck (d.i. 4,0 x 250 mm; 5 µm), protegida por uma coluna de guarda (d.i. 4x4 mm) de mesma composição. As análises foram realizadas em temperatura ambiente controlada ($25,0 \pm 5,0$ °C).

3.2.1.2. Validação do método analítico

Linearidade

A partir da solução estoque de ácido ursólico ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas soluções em concentrações de 1,0; 5,0; 10,0; 25,0 e $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As curvas analíticas foram construídas relacionando os valores da concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$, no eixo das abscissas com os valores das áreas obtidas (mAU) no eixo das ordenadas. O intervalo linear foi calculado através da verificação 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) (r mínimo aceitável foi de 0,99) (BRASIL, 2003). Análises estatísticas foram realizadas para avaliação da regressão linear.

Seletividade

A seletividade foi determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras do AU contaminadas com quantidades apropriadas dos excipientes empregados nas dispersões sólidas, PEG 6000 e Poloxamer 407, e análise das dispersões sólidas sem o fármaco (placebos).

Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão foi avaliada intra e interensaio. Para avaliar estes parâmetros, foram utilizadas soluções de padrão de AU (1,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para determinação da repetibilidade e da exatidão intraensaio, as análises de 10 replicatas foram realizadas em um mesmo dia, já a exatidão interensaios e precisão intermediária foram avaliadas em triplicata, por três dias consecutivos. Os resultados da precisão do método foram apresentados através do coeficiente de variação (CV), calculado pela razão do desvio padrão com a média dos valores obtidos.

Os resultados da exatidão intra e interensaios foram obtidos através da razão em porcentagem entre a diferença do valor obtido e o valor teórico, em relação ao valor teórico.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi determinado através do sinal / ruído da linha de base através da relação entre o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y com a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração obtida com precisão e exatidão.

Robustez

Este parâmetro foi avaliado variando as seguintes condições analíticas: proporção dos solventes da fase móvel e a vazão empregada na análise.

3.2.2. Determinação da solubilidade do ácido ursólico em óleos e tensoativos.

Um excesso de ácido ursólico foi adicionado a 2 g das matérias-primas e submetidos à agitação magnética (100 rpm) sob aquecimento ($75\pm 5^\circ\text{C}$) por 4 horas. As amostras foram então centrifugadas a 20.800 g por 20 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi retirada, diluída em acetonitrila e analisada por CLAE conforme método descrito no item 3.2.1.

3.2.3. Determinação do EHL do Propilenoglicol monocaprilato (Capryol® 90).

A determinação do valor de EHL requerido pelo óleo foi realizada por meio da preparação de emulsões seriadas com o óleo estudado empregando tensoativos de EHL conhecido. Estes foram misturados em proporções previamente calculadas a partir das equações 01 e 02. Após 24 horas do preparo a estabilidade das emulsões foi observada macroscopicamente e aquelas que se apresentaram sem modificações, tiveram tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade medidos. A emulsão mais estável após 15 dias foi admitida como referência e o valor do EHL do óleo corresponde ao daquela emulsão.

$$\text{EHL}_{\text{req}} = (\text{EHL}_A \cdot \%A \cdot 0,01) + (\text{EHL}_B \cdot \%B \cdot 0,01) \quad \text{eq.1}$$

$$\%A + \%B = 100\% \quad \text{eq. 2}$$

Onde:

EHL_{req} = Valor de EHL requerido pelo óleo;

EHL_A = Valor de EHL do tensoativo lipofílico;

EHL_B = Valor do EHL do tensoativo hidrofílico;

$\%A$ = Porcentagem do tensoativo lipofílico a ser empregada na formulação

$\%B$ = Porcentagem do tensoativo hidrofílico a ser empregada na formulação

3.2.4. Desenvolvimento das nanoemulsões

As formulações foram desenvolvidas seguindo o método do diagrama ternário. Este é representado no plano como triângulo equilátero. Os três vértices do triângulo correspondem a 100% dos três constituintes: óleo/ água/ tensoativo. O diagrama é obtido inicialmente variando as concentrações de 10 em 10%, a fim de cobrir toda a superfície do triângulo, obtendo-se assim 36 formulações para cada sistema proposto. A proporção dos tensoativos hidrofílico e lipofílico foi determinada seguindo o sistema EHL e as frações calculadas segundo as equações 1 e 2 mencionadas anteriormente. As formulações selecionadas para estudo foram desenvolvidas com as matérias primas onde se observou maior solubilidade do ácido ursólico.

3.2.4.1. Obtenção das formulações

As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente e então a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação mecânica (600 rpm) sendo o sistema submetido em seguida a agitação a 14.000 rpm em Ultra-turrax® (IKA T10 basic) até arrefecimento.

3.2.4.1.1. Determinação da temperatura de emulsificação.

Foram preparadas emulsões à temperatura ambiente controlada ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) ou aquecendo as fases a $50\pm 5^{\circ}\text{C}$ e $75\pm 5^{\circ}\text{C}$. As amostras foram avaliadas macroscopicamente e tiveram o tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade determinados por até 15 dias.

3.2.4.2. Análise macroscópica das formulações

Vinte e quatro horas após o preparo (estabilidade intrínseca) foram observadas características organolépticas das formulações. Aquelas que se apresentavam sem alteração passaram pelos demais testes.

3.2.4.3. Teste de centrifugação

Alíquotas das amostras foram vertidas em microtubos tipo eppendorf de 2 mL e submetidas à ciclos de centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5430R) por 15 minutos cada (70, 440 e 863 g respectivamente) a temperatura ambiente controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Após cada ciclo foram avaliadas macroscopicamente identificando possíveis processos de instabilidade ou separação de fases.

3.2.4.4. Determinação do tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade

Tais parâmetros foram determinados empregando sistema de espalhamento dinâmico de luz (DLS – Dynamic Light Scattering) em equipamento Zetasizer Nano system ZS (Malvern, UK) a um ângulo de 173° com laser He-Ne. As amostras foram diluídas em água (1:10) e as medidas realizadas a temperatura ambiente controlada ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$). O resultado da distribuição dos glóbulos foi obtido através de gráficos de porcentagem de intensidade em relação ao diâmetro dos glóbulos.

3.2.5. Estudo de estabilidade acelerada

Foram testadas formulações contendo 0,5 ou 1 mg/mL de ácido ursólico. O fármaco foi adicionado à fase oleosa e a mistura submetida à agitação magnética até solubilização completa deste. Em seguida, prosseguiu-se com o processo de emulsificação conforme mencionado anteriormente. As amostras foram então acondicionadas em frascos de vidro fechados com batoque e tampa de plástico e armazenadas em condições diferentes de temperatura (ambiente controlada, $25\pm 5^{\circ}\text{C}$; geladeira, $4\pm 5^{\circ}\text{C}$ e estufa, $50\pm 5^{\circ}\text{C}$) por 90 dias. Em tempos pré-estabelecidos correspondentes à, 01, 07, 15, 30, 60 e 90 dias, foram medidos o tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade das amostras. O teor de fármaco foi quantificado por CLAE segundo método previamente validado nos dias 01, 15, 30, 60 e 90.

3.2.5.1. Turbidimetria.

As nanoemulsões contendo ácido ursólico nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL foram submetidas à análise pelo aparelho Turbiscan LAB^{Expert} (Formulation, França) e foram escaneadas pela sua fonte de luz uma vez por semana durante 08 semanas. Estas análises foram realizadas no Laboratoire Claudius Galien – Formulation, da École de Biologie Industrielle - EBI, Cergy, França, em parceria com a Professora Anne-Marie Pensée-LHéritier.

3.2.5.2. Difração de Raios-X

As amostras submetidas ao teste de estabilidade acelerada foram filtradas em membrana com malha de $0,45\mu\text{m}$ e o resíduo sólido retido nesta foi submetido à análise. As medidas de difração de raios-X foram realizadas no equipamento de marca Siemens/modelo D5005, com ânodo de cobre ($\text{CuK}\alpha = 1,5406\text{ \AA}$) operando com 40 kV e 30 mA. Os difratogramas de raios-X foram obtidos com 2θ , variando entre 2° e 50° e incremento de $0,05^{\circ}/\text{s}$.

3.2.6. Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico.

Um excesso do fármaco (10 mg) foi adicionado a 10 mL de:

- água purificada,
- tampão fosfato pH 6,8

- tampão fosfato pH 6,8 + Transcutol® P /Cremophor® EL = 16,13%/83,83%
- solução de HCl 0,1N
- solução de HCl 0,1N + Transcutol® P /Cremophor® EL = 16,13%/83,83%

As misturas foram então submetidas a agitação magnética (600 rpm) por 24h a temperatura ambiente controlada ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) ou a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. As amostras foram então filtradas e analisadas por CLAE para quantificação do fármaco.

3.2.6.1. Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os experimentos foram realizados com o uso de equipamento Shimadzu IRPrestige-21. O ácido ursólico e os tensoativos foram previamente solubilizados separadamente e em conjunto, em clorofórmio e deixados sob agitação magnética à 37°C por 24 horas. Cada amostra foi então gotejada sobre uma janela cristalina de KBr de maneira a formar um filme fino recobrimdo a área pela qual atravessaria o feixe de luz do Infravermelho. Após secagem do solvente ao ar, a janela de KBr foi posicionada para a leitura. As análises foram feitas com resolução de 2 cm^{-1} , de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.7. Espectrometria de massas

Amostras contendo 0,5 e 1 mg/mL de ácido ursólico foram analisadas por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (micrOTOF Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer, fabricante: Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) operando no modo negativo nas seguintes condições: voltagem do capilar de 3500 Volts, o gás nebulizador foi nitrogênio na temperatura de 180°C a seco, com fluxo de 4 L/min. NA-TFA a 10 mg/ml foi usado como padrão para calibração interna e externa. As análises foram realizadas nos dias 01, 15, 30, 60 e 90 após a manipulação das formulações.

3.2.8. Determinação dos parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH) para o ácido ursólico.

Por meio do software HSPiP – Hansen Solubility Parameters in Practice, versão 3 – 2010, seguindo método de Yamamoto, pertencente ao Prof. Vianney Fréville (École de Biologie Industrielle - EBI, Cergy, França), foram calculados os PSH para o ácido ursólico e os componentes da nanoemulsão. Após a obtenção dos dados, foi construído um gráfico de dispersão de parâmetros de ligações polares (δ_p)

x parâmetros de ligações de hidrogênio (δh) onde foram representados os pontos no espaço correspondentes às substâncias analisadas. Na representação gráfica foram acrescentados os parâmetros de solubilidade de solventes orgânicos para comparação.

3.2.9. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação.

O experimento foi realizado em um equipamento de dissolução (Hanson Research – SR8 Plus) utilizando 100 mL de meio de dissolução (tampão fosfato pH 6,8 ou solução de HCl 0,1N) a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, agitação de 100 rpm com dispositivo de pás. A amostra contendo 1 mg/mL de fármaco foi adicionada diretamente a cuba e as coletas (1 mL) para quantificação do fármaco por CLAE foram feitas após 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos.

3.2.10. Avaliação da citotoxicidade.

Células da linhagem LLCMK2 foram cultivadas em placas com 96 poços juntamente com a nanoemulsão a ser avaliada nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; e 32,0 μM . As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 72 horas. Para soltar as células foram empregados 50 μL /poço de TrypLE Express (Life Technologies). Após este período as células foram coradas com Cedex Trypan Blue na concentração de 1:1 (amostra:corante). A leitura das placas foi realizada no aparelho Cedex Xs Analyzer.

3.2.11. Avaliação da atividade antiparasitária

Em placa de 96 poços foram colocadas células da linhagem LLCMK2 (1×10^5 células/mL, 100 μL /poço) e incubadas por 24 horas. Após este período, formas epimastigotas e amastigotas da cepa CL Brener na proporção de 10:1, foram adicionadas aos poços e incubadas por mais 24 horas a 37°C em ambiente de 5% de CO_2 . Em seguida, foram adicionadas as nanoemulsões em análise nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0; e 32,0 μM . As placas foram novamente incubadas por mais 72 horas. Após este período, foram adicionados 50 μL da solução de Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (400 μM em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) (CPRG; Roche, Indianapolis, Ind.) e mais 6 horas de incubação a 37°C . A reação colorimétrica é então quantificada a 570 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento e validação do método para análise do ácido ursólico por CLAE

A etapa de desenvolvimento de método analítico para a quantificação do ácido ursólico envolveu a definição da região do comprimento de onda de maior absorção da molécula, através da varredura no espectro do ultravioleta que mostrou que o ácido ursólico absorve fortemente no comprimento de onda de 203 nm gerando pico com boa resolução e ausência de cauda (**Figura 09**). O mesmo foi utilizado no trabalho de Gnoatto (2005), tendo sido selecionado, portanto, para as análises cromatográficas. Após investigação, verificou-se que a fase móvel composta por acetonitrila e água (88:12, v/v) mostrou-se adequada por permitir a análise do fármaco em um tempo de 11 minutos, conforme demonstrado no cromatograma apresentado na **Figura 10**. Desta forma, foi possível obter tempo de retenção menor que para as proporções de fase móvel com mais água, entretanto com tempo de retenção não muito distante da concentração testada com menor proporção de água (90:10). A fase móvel contendo metanol, por outro lado, revelou-se menos apropriada para a análise, pois o fármaco apresentou retenção em tempo maior, já que metanol é um solvente com polaridade maior que a acetonitrila e, ainda, durante as análises houve dificuldade em equilibrar a coluna e estabilizar a linha de base. Ressalta-se a importância da seleção criteriosa da composição da fase móvel, pois idealmente deseja-se que a corrida analítica seja a mais breve possível, usando mínimas quantidades de solvente orgânico, com conseqüências diretas para a redução do custo das análises.

Figura 09: Varredura do ácido ursólico monitorado de 190 a 400nm.

Figura 10. Representação esquemática de cromatograma monitorado em 203nm com fase móvel acetonitrila:água (88:12) e vazão de 1mL/min, volume de injeção de 20 μ L.

Linearidade

A análise da **Figura 11** permitiu observar que o método desenvolvido para quantificação de ácido ursólico é linear dentro do intervalo proposto, de 1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pois o coeficiente de correlação, r , calculado através da regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, é maior que 0,99 (BRASIL, 2003). Por este motivo, o método mostrou-se capaz de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de ácido ursólico, dentro da faixa de análise avaliada.

Figura 11. Curva analítica do ácido ursólico nas concentrações correspondentes à 1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

Seletividade

A seletividade é considerada a primeira etapa da validação analítica, pois deve-se garantir que os adjuvantes da formulação não interfiram na quantificação do fármaco (RIBANI, 2004). Os resultados obtidos pela análise das soluções de AU em acetonitrila contaminados com os constituintes empregados nas dispersões sólidas, PEG 6000 e Poloxamer 407, e análise das dispersões sólidas sem fármaco mostraram que estes polímeros não interferiram na quantificação do fármaco porque não exibiram picos cromatográficos coincidentes com tempo de retenção característico do AU.

Limite de Detecção e Quantificação

O limite de quantificação, equivalente ao menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis, correspondeu a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Concentrações abaixo desta foram analisadas e excluídas por não apresentarem exatidão. O limite de detecção foi de $0,34 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Precisão e Exatidão

Para a análise fidedigna do fármaco o método deve mostrar-se preciso, ou seja, apresentar pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma concentração e exato, representado pelo grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). Os resultados apresentados na **Tabela 01** evidenciam que o método é preciso para ambas as determinações, repetibilidade, cujo CV máximo foi de 3,39% para a menor concentração analisada, $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, e interensaio, onde o CV máximo correspondeu a 4,49% para o limite de quantificação inferior $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A **Tabela 02** mostra que o método desenvolvido é exato, já que os desvios com relação aos valores nominais mantiveram-se entre 0,28 e 3,04%, para um mesmo dia de análise, e entre -4,11 e 0,19%, para ensaios em dias diferentes.

Tabela 01. Precisão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico

Repetibilidade			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	25,00	50,00
N	10	10	10
CV(%)	3,39	0,70	1,16
Precisão Intermediária			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	25,00	50,00
N	3	3	3
CV (%)	4,49	1,14	1,39

Conc.: concentração; n: número de replicatas

Tabela 02. Exatidão do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico

Exatidão Intraensaio			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	25,00	50,00
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,03	24,69	50,14
N	10	10	10
E(%)	3,04	-1,23	0,28
Exatidão Interensaio			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,00	25,00	50,00
Conc. obtida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,96	24,68	50,10
N	3	3	3
E(%)	-4,11	-1,27	0,20

Conc.: concentração; n: número de replicatas.

Robustez

A robustez pode ser definida como a sensibilidade de um método frente a pequenas variações nas condições analíticas, tais como a proporção dos componentes da fase móvel e o fluxo empregado na análise (INMETRO, 2003). Os resultados expressos na **Tabela 03** mostram que o método analítico desenvolvido e validado revelou-se robusto frente a alterações na vazão e composição da fase móvel, já que para todas as condições avaliadas o método manteve-se linear e exato (entre -14,93% e +10,50%).

Tabela 03. Robustez do método cromatográfico utilizado na análise do ácido ursólico

Vazão 0,9 (mL min ⁻¹)	
Linearidade	
R	0,9999
Exatidão	
Conc. teórica (µg mL ⁻¹)	E(%)
1	2,35
25	1,06
50	0,33
Vazão 1,0 (mL min ⁻¹)	
R	0,9999
Exatidão	
Conc. teórica (µg mL ⁻¹)	E(%)
1	10,50
25	-1,92
50	0,46
Fase Móvel (86.8:12.2, Acetonitrila:Água)	
R	0,9994
Exatidão	
Conc. teórica (µg mL ⁻¹)	E(%)
1	-14,93
25	4,64
50	-1,07
Fase Móvel (89.2:10.8, Acetonitrila:Água)	
R	0,9997
Exatidão	
Conc. teórica (µg mL ⁻¹)	E(%)
1	6,47
25	-3,52
50	0,57

4.2. Determinação da solubilidade do ácido ursólico em óleos e tensoativos.

As nanoemulsões O/A são capazes de liberar fármacos pouco solúveis em água quando estes estão solubilizados na fase oleosa interna do sistema. Desta forma a solubilidade do ácido ursólico, um fármaco hidrofóbico, nos óleos e tensoativos que compõem a fase oleosa é etapa fundamental no desenvolvimento

das formulações. Xi et. al. (2009) determinaram a solubilidade do ácido oleanólico, isômero do ácido ursólico, em diversos óleos e tensoativos hidrofílicos e lipofílicos obtendo como resultado alta solubilidade daquele fármaco em Capryol® 90, Labrasol® e Transcutol® P. Segundo Patel et. al. (2011) a polaridade dos fármacos pouco solúveis em água favorece sua solubilização em óleos com pequeno ou médio volume molar como os mono e diglicerídeos como é o Capryol® 90. A **Tabela 04** mostra os resultados obtidos para o ácido ursólico nestas matérias primas e outras também empregadas em desenvolvimento de nanoemulsões para liberação de fármacos pouco solúveis (PATEL, 2011; BALI, 2010, KELLMAN, 2007).

Tabela 04. Solubilidade do ácido ursólico em diversos óleos e tensoativos.

Matérias-primas	Solubilidade do ácido ursólico (mg/g)
Crodamol® GTCC	0,72±0,05
Capryol® 90	10,08±0,15
Cremophor® EL	20,42±0,56
Cremophor® RH40	18,64±0,24
Ultramona® R300	7,88±0,57
Ultramona® R360	6,95±0,87
Labrasol®	6,39±0,14
Plurol oleique®	10,24±1,19
Transcutol® P	16,50±0,59

É possível observar que o ácido ursólico foi mais solúvel no óleo Capryol® 90, no tensoativo hidrofílico Cremophor® EL e no tensoativo lipofílico Transcutol® P tendo sido estes escolhidos como matérias-primas para o desenvolvimento das nanoemulsões.

4.3. Determinação do EHL do propilenoglicol monocaprilato (Capryol® 90).

O sistema EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) representa uma classificação dos óleos e tensoativos tendo como base os parâmetros de solubilidade destes em solventes polares ou apolares. Desenvolvido em 1942, consiste em uma escala numérica de valores entre 01 e 20 onde os valores de EHL aumentam de acordo com a hidrofília da molécula. Quando bem combinados os valores de EHL dos tensoativos e do óleo, são obtidas formulações com melhor estabilidade e menor

tamanho de glóbulo sendo este um fator chave para o bom desenvolvimento de emulsões (WANG, 2009).

Segundo Fernandez et. al. (2004) o tamanho dos glóbulos é determinado pelo equilíbrio das frações de óleo e tensoativo mais do que pelo conteúdo de água ou força mecânica aplicada ao sistema. Desta forma, fica claro que o equilíbrio entre os valores de EHL dos óleos e dos tensoativos é crítico para a formação de sistemas viáveis. Quando bem combinados os valores de EHL dos tensoativos e do óleo, são obtidas formulações com melhor estabilidade e menor tamanho de glóbulo sendo este um fator chave para o bom desenvolvimento de emulsões (WANG, 2009).

Os números correspondentes ao EHL de alguns produtos são freqüentemente indicados em literatura, porém, muitas vezes como valores compreendidos em uma faixa entre dois pontos ou precedidos de sinais de maior ou menor (< ou >) o que dificulta a elaboração de sistemas estáveis. No caso do Capryol® 90, o informe técnico do fabricante Gattefossé informa o valor 06 como EHL requerido. Já a SureChem em seu documento de patente número 6294192 traz <10 como EHL requerido por esta substância, Rao e colaboradores (2014) estabeleceram 15 como EHL requerido pelo Capryol® 90. Ao empregar o valor 06, não foi possível obter formulações estáveis com as matérias primas selecionadas para este estudo. Fez-se necessário então a determinação de um valor viável.

Foram empregados dois pares de tensoativos. Primeiramente, um par usado com frequência para determinação de EHL (ZANIN, 2002) (Span®80/Tween®80). Uma vez determinado o EHL requerido pelo óleo com este par, passou-se para o par Transcutol®P/Cremophor®EL sendo pesquisados apenas valores próximos àquele determinado com o primeiro par de tensoativos. Na **Tabela 05** estão descritos os valores de EHL pesquisados e as proporções dos tensoativos empregados.

Tabela 05: Valores de EHL testados para o Propilenoglicol monocaprilato (Capryol® 90) com dois pares de tensoativo.

EHL final	Span® 80(%)	Tween® 80(%)	Transcutol®P(%)	Cremophor®EL(%)
05	93,46	6,54	-	-
06	84,12	15,88	-	-
07	74,76	25,24	-	-
08	65,42	34,58	-	-
09	56,07	43,93	-	-
10	46,73	53,27	37,6	62,4
11	37,38	62,62	26,9	73,1
12	28,04	71,96	83,87	16,12
13	18,69	81,31	94,62	5,37

Das emulsões formuladas com o par Span®80/Tween®80 somente as com EHL final 11, 12 e 13 se mantiveram estáveis nas 24 horas após o preparo. Após serem submetidas ao teste de centrifugação, somente a de EHL final 12 permaneceu estável. A partir deste resultado é possível tomar o valor de EHL final 12 como referência para o teste com o par de tensoativos Transcutol®P/Cremophor®EL. Dentre as emulsões formuladas com este par, a de EHL final 10 era líquida de cor branco-leitosa e mostrou-se instável após o teste de centrifugação. As demais (EHL final 11, 12 e 13) eram translúcidas e azuladas e por permanecerem estáveis, tiveram o tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade verificados por até 15 dias. Não foi observada diferença significativa entre os valores destes parâmetros durante o tempo de teste, portanto, optou-se pela adoção do valor 12 para o EHL requerido por ser o valor determinado pelo par de tensoativos Span®80/Tween®80. O tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade apresentados pela emulsão 15 dias após o preparo foi 31,52 nm e 0,108 respectivamente.

4.4. Desenvolvimento das nanoemulsões

Diversas referências na literatura empregam o diagrama ternário como método para desenvolver sistemas nanoestruturados (PATEL, 2011; WANG 2009;

SHAFIQ, 2007; CONSTANTINIDES, 1997). Por meio dele é possível determinar as proporções entre água/óleo/tensoativo que resultarão num sistema com características pré-determinadas como adequadas. Nesta pesquisa objetivou-se o desenvolvimento de nanoemulsões O/A com no máximo 10% de tensoativos. Segundo Bouchemal *et al* (2004) e Tadros *et al* (2004) nanoemulsões com até 20% de óleo podem ser obtidas empregando 3 a 10% de tensoativos. Sadurní *et. al.* (2005) desenvolveram nanoemulsões O/A com 90% de água e 6 a 9% de tensoativos e obtiveram glóbulos com tamanhos entre 14 e 39 nm. De acordo com estas informações, selecionamos a região do diagrama ternário onde poderiam ser formadas nanoemulsões O/A com até 10% de tensoativos (**Figura 12**). Tal região resultou em 05 formulações cuja composição está apresentada na **Tabela 06**.

Figura 12. Representação do diagrama de fases e a área selecionada para estudo

Tabela 06: Composição das formulações manipuladas a partir do diagrama ternário.

Amostras	Água (%)	Capryol® 90 (%)	Tensoativos*(%)
1	90	05	05
2	85	05	10
3	85	10	05
4	80	10	10
5	80	15	05

* Transcutol® P /Cremophor® EL = 16,13%/83,83%

Vinte e quatro horas após o preparo as amostras 1, 2 e 4 tinham aspecto translúcido e azulado. As amostras 3 e 5 apresentaram-se branco-leitosas. Estas últimas, assim como a amostra 1, mostraram-se instáveis após teste de

centrifugação. As amostras 2 e 4 permaneceram estáveis até o término dos testes (15 dias) e o tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade medidos na ocasião foram: amostra 2: 74,94 nm e 0,557; amostra 4: 31,52 nm e 0,108 sendo esta última selecionada para continuação dos estudos uma vez que valores de polidispersividade abaixo de 0,2 indicam homogeneidade e consequente estabilidade da amostra (CAZO, 2012).

4.4.1 Determinação da temperatura de emulsificação.

A temperatura de emulsificação tem papel importante no desenvolvimento de emulsões pois é um dos fatores que determina o tamanho dos glóbulos do sistema e consequentemente sua estabilidade (SADURNÌ, 2005).

Todas as emulsões manipuladas apresentaram-se translúcidas e com aspecto azulado. Não houve alteração após teste de centrifugação. Os resultados de tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade estão descritos na **Tabela 07**.

Tabela 07: Resultados de tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade do estudo de temperatura de emulsificação

Temperatura de emulsificação						
25±5°C			50±5°C		75±5°C	
Tempo (dias)	Tamanho (nm)	Pdl	Tamanho (nm)	Pdl	Tamanho (nm)	Pdl
01	36,54 ± 3,36	0,15±0,14	31,41±1,06	0,14±0,08	32,99±1,97	0,14±0,08
07	45,70±14,96	0,16±0,16	31,55±1,18	0,11±0,05	30,56±3,8	0,17±0,014
15	55,09±13,85	0,16±0,06	38,8±9,65	0,12±0,07	31,9±0,54	0,12±0,021

Legenda: Pdl = índice de polidispersividade

Pode-se considerar que a emulsão com os melhores resultados foi aquela preparada a 75±5°C, considerando a menor variação do tamanho dos glóbulos durante o tempo de teste. Este resultado corrobora aqueles apresentados por Sadurní et. al. (2005) que testaram as temperaturas de 25°C, 50°C e 70°C para produzir nanoemulsões e concluíram que a temperatura de 70°C era a mais adequada resultando em glóbulos com aproximadamente 40nm. Diante destes resultados, a temperatura de 75±5°C foi adotada para obtenção das nanoemulsões.

4.4.2. Estudo de estabilidade acelerada – *Ostwald ripening*, Difração de Raios-X e Turbidimetria.

Para este estudo as formulações são submetidas a condições extremas de temperatura a fim de verificar seu comportamento e assim auxiliar no processo de desenvolvimento. Os resultados referentes a tamanho dos glóbulos, índice de polidispersividade e *Ostwald ripening* estão dispostos na **Tabela 08** e **Figura 13** a seguir.

É possível observar que houve alteração nos valores dos parâmetros avaliados nas condições empregadas durante o período do teste nas formulações acondicionadas em estufa (**Tabela 08**). Quanto ao processo de instabilidade *Ostwald ripening*, pode-se considerar que este não ocorreu nas formulações estudadas uma vez que não houve relação linear entre o raio ao cubo e o tempo, mesmo naquelas acondicionadas em estufa, nas quais se observou alguma variação dos parâmetros avaliados (**Figura 13**). A partir destes resultados pode-se considerar que as formulações estudadas são estáveis neste período de tempo, nas condições estabelecidas.

Tabela 08: Tamanhos de glóbulos e índice de polidispersividade das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.

		1 dia		90 dias	
		Tamanho (nm)	Pdl	Tamanho (nm)	Pdl
0,5mg/mL	TA	34,2±4.8	0,11±0.06	34,2±4.0	0,09±0.09
	GEL	35,5±3.7	0,15±0.06	41,5±7.1	0,16±0.07
	EST	38,4±6.4	0,20±0.01	50,1±13.2	0,32±0.08
1mg/mL	TA	32,4±0,3	0,06±0.03	36,1±3.4	0,12±0.06
	GEL	40., ±1.6	0,30±0.01	43,3±7.1	0,33±0.07
	EST	32,4±0.3	0,03±0.02	66,3±6.9	0,58±0.29

Legenda: Pdl: índice de polidispersividade; TA: Temperatura Ambiente 25±5°C; GEL: Geladeira 04±5°C; EST: Estufa 50±5°C

Figura 13: Resultados obtidos na determinação do índice de *Ostwald ripening* das formulações submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.

Turbidimetria

Atualmente, a estabilidade física de emulsões e suspensões é avaliada por técnicas analíticas precisas como microscopia, espectroscopia, medidas de tamanho de partícula e potencial zeta e turbidimetria. A técnica mais adequada é escolhida de acordo com as características desejadas do sistema como, concentração, opacidade e faixa de tamanho de partículas. Em quase todas elas, deve haver diluição prévia da amostra para realizar a análise o que interfere no equilíbrio do sistema, além disso, muitas vezes as características da formulação impõem limitações ao uso de algumas técnicas como no caso das nanoemulsões, que não podem ser observadas por microscopia ótica (MENGUAL, 1999). É desejável portanto, que as amostras sejam submetidas a mais de uma técnica de avaliação da estabilidade.

A turbidimetria baseia-se transmissão ou retroespalhamento de luz que incide sobre a amostra. A transmissão é usada na análise de amostras claras a turvas e o retroespalhamento, para amostras opacas (FORMULACTION, 2008). O analisador ótico Turbiscan (Formulation, França) permite a observação em tempo real de fenômenos reversíveis como cremação e sedimentação, e irreversíveis como coalescência, sem necessidade de diluição da amostra (LIU, 2011).

A dispersão a ser analisada é colocada em um frasco cilíndrico de vidro chamado célula. A fonte de luz é um diodo eletroluminescente que emite luz na região próxima ao infravermelho ($\lambda=880\text{nm}$). Dois sensores óticos sincronizados recebem respectivamente a luz transmitida através da amostra (detector a 180° em

relação à luz incidente) e a luz retroespalhada (detector a 45° em relação à luz incidente). Um padrão de fluxo de luz é obtido, correspondendo a uma avaliação macroscópica da amostra em um determinado tempo. Quando a aquisição de dados é repetida, obtém-se a sobreposição destes, caso a amostra seja estável. Quando a emulsão é instável, é possível identificar o processo de instabilidade (cremeação, sedimentação, coalescência e/ou floculação – **Figura 14**) e calcular a variação de retroespalhamento da luz para fins de comparação entre as amostras (MACIEL, 2012, FORMULACTION, 2008).

Para análise dos resultados alterna-se os modos sem e com referência. Neste último a primeira análise é tomada como referência, a linha é traçada sobre o valor 0, e a análise é feita segundo a variação a partir dela. Por meio deste modo é possível calcular a variação da transmissão ou retrodifusão (Delta T ou R) e assim avaliar a ocorrência dos processos de instabilidade apresentados na **Figura 14**. Desta forma também é possível comparar formulações entre si, avaliando as variações de Delta T ou R. O modo sem referência permite avaliar a opacidade da formulação por meio da taxa de transmissão ou retrodifusão e também calcular os tamanhos de partículas quando possível.

De acordo com a **Figura 16**, referente às nanoemulsões contendo 0,5 e 1 mg/mL, a primeira tem maior transparência. Os modos com referência indicam que não ocorreu nenhum dos processos de instabilidade citados na **Figura 14** e, comparando os Delta R das formulações **Figura 15**, verificou-se que a formulação com 0,5 mg/mL teve maior variação, indicando aumento dos glóbulos, mas que esta não foi suficiente para calcular o tamanho destes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 14: Dados brutos de retrodifusão no modo sem referência, obtidos pelo aparelho Turbiscan evidenciando os padrões que representam fenômenos de instabilidade das emulsões: cremeação (A), sedimentação (B) e coalescência ou floculação – aumento do tamanho das partículas (C)

Figura 15: Gráfico de variação da retrodifusão calculada a partir da variação turbidimétrica das formulações contendo 0,5 e 1 mg/mL de ácido ursólico

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 16: Gráficos demonstrando as variações da turbidimetria nas nanoemulsões contendo 0,5 mg/mL (A) e 1 mg/mL (B) de ácido ursólico. O modo com referência permite avaliar se ocorreram processos de instabilidade e o modo sem referência permite análise inter amostras.

Os resultados expostos indicam a estabilidade do sistema nas condições avaliadas, porém, a quantificação do fármaco nas formulações demonstrou, principalmente naquelas com 1 mg/ml, queda no teor de fármaco ao longo do tempo (**Figura 17**) indicando possível precipitação ou degradação deste. Para verificar se houve precipitação, foram quantificadas amostras da nanoemulsão sem filtração prévia. Os valores verificados estão compreendidos entre 80% e 100% sugerindo precipitação do fármaco (**Tabela 09**). A análise das amostras por difração de raios-X foi realizada a fim de verificar se houve precipitação do ácido ursólico, porém, a quantidade de amostra obtida após a filtração não foi suficiente para gerar resultado confiável sendo o experimento inconclusivo em relação à elucidação da possível precipitação do fármaco (**Figura 18**).

Figura 17: Resultados da quantificação de fármaco nas formulações submetidas ao teste de estabilidade acelerada.

Tabela 09: Teor de fármaco quantificado em nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade acelerada sem filtração prévia da amostra.

		Fármaco após 90 dias(%)
0,5 mg/ml	TA	104.69±13.3
	GEL	94.03±10.7
	EST	88,38±4.9
1mg/ml	TA	94.16±3.9
	GEL	102.56±2.1
	EST	81.92±6.2

Legenda: Pdl: polidispersividade; TA: Temperatura Ambiente 25±5°C; GEL: Geladeira 04±5°C; EST: Estufa 50±5°

Figura 18: Difratogramas obtidos após análise das nanoemulsões submetidas ao teste de estabilidade acelerada

4.5. Determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico – Espectroscopia do infravermelho.

A solubilidade do ácido ursólico em água, no tampão fosfato e na solução de HCl sem os tensoativos ficou abaixo do limite de quantificação do método por CLAE (1 µg/mL) não sendo possível determiná-la nestes meios. Os resultados da solubilidade do fármaco nos demais meios estão apresentados na **Tabela 10**. É possível observar que a 37°C foi obtida menor concentração do fármaco em ambos os meios sugerindo a degradação ou precipitação do mesmo.

A fim de verificar se houve degradação do fármaco pela temperatura, realizou-se teste de espectroscopia do infravermelho e espectrometria de massas. Por meio a espectroscopia do Infravermelho é possível identificar possíveis interações intermoleculares que poderiam ocorrer entre o ácido ursólico e os tensoativos ou o meio de dissolução.

Os resultados mostrados na **Figura 19** sugerem que não ocorreu degradação uma vez que todas as bandas presentes não sofreram deslocamento ou alargamento no espectro. Este resultado corrobora aquele obtido no teste de estabilidade acelerada onde os resultados sugeriram precipitação do fármaco e não degradação deste.

Tabela 10: Resultados da determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico.

Solução (com tensoativos*)	Sol. à Temperatura ambiente (mg/mL)	Sol. à 37°C (mg/mL)
Tampão fostato pH 6.8	0,35±0,15	0,14±0,04
HCl 0,1N	0,17±0,02	0,07±0,02

* Transcutol® P /Cremophor® EL = 16,13%/83,83%. Sol = Solubilidade

Figura 19: Espectro de infravermelho de ácido ursólico puro e em conjunto com os tensoativos, submetidos à temperatura de 37°C ou não.

4.6. Avaliação das formulações preparadas à 30°C como temperatura de emulsificação

Diante dos resultados do estudo de estabilidade acelerada e da determinação do coeficiente de solubilidade do ácido ursólico é possível observar que a temperatura tem um papel chave no comportamento do fármaco no sistema. Durante o processo produtivo a formulação é submetida a $75\pm 5^{\circ}\text{C}$, como temperatura de emulsificação o que pode estar desencadeando a diminuição da solubilidade do fármaco. Os testes para determinação da melhor temperatura de

emulsificação realizados previamente mostraram que na temperatura de $25\pm 5^\circ\text{C}$ é possível obter formulações com tamanho de glóbulos e índice de polidispersividade próximos daqueles obtidos em maiores temperaturas (**Tabela 11**). A partir destes resultados optamos por estabelecer $30\pm 5^\circ\text{C}$ como nova temperatura de emulsificação. As formulações contendo 0,5 mg/mL de ácido ursólico foram então submetidas ao estudo de estabilidade acelerada conforme item 3.2.5.

Tabela 11: Tamanho de glóbulos e polidispersividade das formulações preparadas a $30\pm 5^\circ\text{C}$ submetidas ao estudo de estabilidade acelerada.

		1 dia		90 dias	
		Tamanho (nm)	PdI	Tamanho (nm)	PdI
0,5mg/mL $30\pm 5^\circ\text{C}$	TA	$36,7\pm 5,1$	$0,13\pm 0,07$	$35,4\pm 2,7$	$0,06\pm 0,07$
	GEL	$31,3\pm 1,1$	$0,08\pm 0,07$	$57,3\pm 13,4$	$0,24\pm 0,08$
	EST	$36,0\pm 7,5$	$0,13\pm 0,07$	$41,6\pm 5,1$	$0,14\pm 0,08$

Figura 20: Resultados da quantificação de fármaco nas formulações preparadas a $30\pm 5^\circ\text{C}$ e submetidas ao teste de estabilidade acelerada.

Observando os resultados apresentados na **Figura 20** e **Tabela 11** é possível considerar que a mudança da temperatura de emulsificação foi eficaz como estratégia para eliminar a diminuição do teor de fármaco quantificado ao longo do tempo, sem comprometer a estabilidade do sistema. Após 90 dias a formulação

apresentou teores de AU de 105,59%, 96,66% e 87,39% nas formulações armazenadas nas condições de temperatura ambiente, geladeira e estufa respectivamente. Quanto ao tamanho dos glóbulos e índice de polidispersividade é possível observar que não houve alteração importante dos parâmetros durante o período de teste. Estes resultados sugerem que a temperatura tem papel chave no comportamento do fármaco no sistema desenvolvido.

4.7. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica microanalítica usada para obter informações do peso molecular e de características estruturais da amostra. É uma das ferramentas disponíveis mais importantes por ser capaz de fornecer informações sobre a composição elementar da amostra, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e composição de superfícies sólidas além das proporções isotópicas de átomos em amostras (RODRIGUEZ, 2003).

A ionização por *electrospray* (ESI) expandiu a gama de moléculas que podem ser analisadas por espectrometria de massas. Por meio desta técnica é possível analisar moléculas de alta polaridade, alta massa molecular e grande complexidade estrutural. É a mais adequada para monitorar a formação de produtos e detectar o momento que subprodutos estão sendo formados em reações químicas (DINIZ, 2011). Na tentativa de elucidarmos o comportamento do ácido ursólico ao longo do tempo na nanoemulsão, submetemos o fármaco puro e as amostras contendo 0,5 e 1 mg/mL armazenadas a temperatura ambiente, a espectrometria de massas com ionização por *electrospray*.

Figura 21: Espectro de massas em modo negativo do ácido ursólico evidenciando pico com relação massa carga em torno de 455m/z.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 22: Espectros de massa em modo negativo da nanoemulsão com ácido ursólico na concentração de 0,5mg/mL nos dias 01 (acima) e 90 (abaixo) após preparação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 23: Espectros de massa em modo negativo da nanoemulsão com ácido ursólico na concentração de 1 mg/mL nos dias 01 (acima) e 90 (abaixo) após preparação.

Os dados obtidos indicaram para o ácido ursólico puro, um pico principal com massa molecular de aproximadamente 455m/z (**Figura 21**). Nas análises realizadas com as nanoemulsões (**Figuras 22 e 23**), até 90 dias, verifica-se que tal pico se mantém presente nas amostras analisadas, indicando a presença do fármaco e que não houve decomposição ou interação deste com os demais componentes da formulação que pudessem ser detestados por esta técnica.

4.8. Determinação dos parâmetros de solubilidade de Hansen (PSH) para o ácido ursólico.

Para que ocorra a solubilização de um soluto é necessário que as interações intermoleculares soluto-soluto e solvente-solvente sejam quebradas para darem lugar a interações soluto-solvente. Quando as moléculas de uma substância líquida têm a capacidade de vencer as forças de coesão entre as moléculas do soluto (forças eletromagnéticas de Wan-der-Waals) diz-se que esta tem poder solvente sobre o soluto. Esse poder solvente de uma substância é traduzido na prática por um valor chamado parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ) que é de certa forma uma medida das forças de Wan-der-Waals derivada da densidade de energia coesiva do solvente que por sua vez é a energia necessária para desfazer todas as ligações intermoleculares de um material. A miscibilidade entre dois componentes é determinada pela proximidade entre os seus parâmetros de solubilidade, quanto mais próximos, mais miscíveis são os componentes. Baixos valores de δ são característicos de substâncias apolares enquanto valores altos indicam substâncias mais polares. Entretanto, a determinação dos parâmetros de solubilidade de Hildebrand não leva em consideração as forças intermoleculares específicas tendo sido necessária a revisão desta teoria inicialmente desenvolvida em 1916 (NOVO, 2012).

Existem três tipos de interações moleculares que influenciam as forças coesivas: as forças dispersivas (δ_d) (forças de London), as interações polares (δ_p) (dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido) e as ligações de hidrogênio (δ_h). Em algumas substâncias estão presentes os três tipos de interações moleculares devendo estas ser levadas em consideração ao serem calculados os parâmetros de solubilidade. Segundo Charles Hansen é necessário somar as contribuições individuais de cada uma das interações. Desta maneira, cada substância pode ser descrita como um ponto (representado pela soma de três vetores – $\delta = (\delta_d + \delta_p + \delta_h)^{1/2}$) em um espaço

tridimensional onde cada dimensão representa um tipo de interação molecular. Os solventes e substâncias que apresentarem parâmetros de solubilidade numericamente próximos serão provavelmente miscíveis e solúveis entre si. A representação se dá por um gráfico $\delta_p \times \delta_h$ onde estão localizados os pontos referentes a cada substância. Aquelas solúveis entre si formam uma nuvem de pontos próximos conforme exemplificado na **Figura 24**. (HANSEN, 1967; BORDES, 2010, FRÉVILLE, 2011; NOVO, 2012,).

Figura 24: Representação do diagrama dos parâmetros de solubilidade de Hansen

Os parâmetros de solubilidade de um composto podem ser obtidos de diversas maneiras, por meio de cálculos matemáticos ou experimentalmente (cromatografia gasosa, vaporização, calorimetria, etc. Atualmente é possível encontrar na literatura os parâmetros previamente determinados para uma grande variedade de substâncias como solventes, tensoativos, polímeros e fármacos. A determinação destes tem sido uma ferramenta importante na pesquisa farmacêutica auxiliando no desenvolvimento e aprimoramento de novos produtos (HANCOCK, 1997, BUSTAMANTE, 2000, ADAMSKA, 2006, ADAMSKA, 2007, BORDES, 2010, FRÉVILLE, 2011; VAY 2011).

Após o cálculo dos PSH por meio do software e construção do gráfico exposto na **Figura 25**, pode-se observar a nuvem de pontos, evidenciada pelo círculo, formada nas proximidades do fármaco indicando a possível solubilidade deste nestes excipientes. Este resultado comprova resultados anteriormente obtidos por cromatografia, da solubilidade do ácido ursólico nos componentes da nanoemulsão (Cremophor EL, Capryol e Transcutol), todos contidos no círculo.

O cálculo dos parâmetros de solubilidade e obtenção da representação gráfica permitem supor a solubilidade de fármacos em substâncias frequentemente empregadas no desenvolvimento de medicamentos e podem ser uma ferramenta muito útil de triagem para formuladores

Figura 25: Representação gráfica dos parâmetros de solubilidade de Hansen para o ácido ursólico e excipientes. Pontos próximos sugerem maior solubilidade entre si

4.9. Avaliação *in vitro* do perfil de liberação.

O perfil de liberação visa verificar a quantidade de fármaco liberado da forma farmacêutica desenvolvida em um determinado tempo. Os resultados permitem corrigir desvios na formulação e fazer adaptações necessárias para etapas futuras como os estudos *in vivo*.

Observando a **Figura 26** é possível dizer que em ambos os meios testados a liberação foi consideravelmente maior a partir das nanoemulsões em comparação com a mistura física dos componentes adicionados à cuba de dissolução. Logo nos primeiros cinco minutos de teste verificou-se aproximadamente 75% de liberação do

fármaco em meio básico. Em meio ácido esta porcentagem de liberação só foi atingida após aproximadamente 60 minutos. Este comportamento é esperado uma vez que o fármaco é um ácido fraco e encontra-se menos ionizado neste meio. Resultados similares foram observados em estudos de Xi (2009) que obteve 75% de liberação de ácido oleanólico, isômero do ácido ursólico, em água ou meio ácido, de sistemas de liberação auto-emulsificantes. Estudos de liberação a partir de nanoemulsões também foram conduzidos por Borhade (2012) que observou 100% de liberação de clotrimazol após 15 minutos.

Figura 26: Perfil de liberação do ácido ursólico a partir da nanoemulsão e mistura física em meios básico e ácido.

4.10. Avaliação da citotoxicidade e atividade antiparasitária.

Observando a **Tabela 12** verificamos que os ensaios biológicos realizados sobre as formas amastigotas apresentaram valor de IC_{50} de 18,03 μM , o que segundo Osorio (2007), indica que o composto é muito ativo para estas formas morfológicas. O índice de seletividade (IS_e) relacionado a estas mesmas formas foi de 21,66 indicando potencialidade do sistema para ser empregado em testes in vivo, uma vez que, compostos apresentando $IS_e \geq 10$ já podem ser candidatos a tais testes (SYKES, 2012). Considerando estes resultados, pode-se dizer que a formulação desenvolvida é segura para a linhagem celular testada e mostrou-se promissora para futuros testes in vivo.

Tabela 12: Resultados da atividade da nanoemulsão contendo ácido ursólico sobre formas morfológicas do *T. cruzi* e citotoxicidade sobre células da linhagem LLC-MK2.

Forma do parasito/célula	Concentração (µM) x % de lise (±SD)				IC ₅₀ (µM)	CC50/IC50(IS _e)
	0,5	2,0	8,0	32,0		
Epimastigota	2,3 ± 0,6	3,3 ± 2,0	59,8 ± 2,7	75,8 ± 5,4	8,05	49,24
Amastigota	5,1 ± 1,9	11,0 ± 3,7	15,7 ± 5,1	75,9 ± 12,4	18,03	21,66
LLCMK2 (citotoxicidade)	1,5 ± 0,8	9,7 ± 1,5	19,3 ± 3,3	23,4 ± 8,7	396,4	

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A partir do exposto foi possível concluir que o método proposto para análise do ácido ursólico por CLAE foi devidamente validado demonstrando ser adequado e confiável para os objetivos propostos. O sistema nanoemulsionado foi obtido com sucesso e apresentou estabilidade durante os 90 dias de teste, evidenciada pelos resultados obtidos nas análises por turbidimetria e índice de *Ostwald ripening*. A adição de fármaco não alterou o tamanho dos glóbulos, porém, foi observada precipitação deste ao longo do tempo notadamente na concentração de 1 mg/mL. Aparentemente o fenômeno está relacionado à temperatura e a mudança desta variável para 30°C durante a emulsificação, foi eficaz para que não fosse mais observada diminuição nos valores de fármaco quantificado. Os ensaios de espectroscopia do infravermelho e espectrometria de massas permitiram verificar que o fármaco não reage com os demais componentes da formulação e não sofre degradação no período de tempo e nas condições estudadas. O ensaio *in vitro* do perfil liberação demonstrou que o fármaco foi imediatamente liberado da nanoemulsão o que não ocorreu com a mistura física. Os experimentos de citotoxicidade e atividade parasitária demonstraram que a formulação desenvolvida é segura para a linhagem celular testada e apresentou atividade contra formas replicantes do parasita.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ADAMSKA, K.; VOELKEL, A. Hansen solubility parameters for polyethylene glucols by inverse gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1132, p.260-267. 2006.

ADAMSKA, K.; VOELKEL, A.; HÉBERGER, K. Selection of solubility parameters for characterization of pharmaceutical excipients. **Journal of Chromatography A**. v.1171, p.90-97. 2007

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology – Advance Online Publication**. v.1249, p.1-5. 2005.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**. v.76, p.410 – 420. 2010.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p.446 – 475. 2008.

BARICEVIC, D.; SOSA, S.; DELLE-LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SIMONOVSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**. v.75(2-3), p.125 – 132. 2001.

BASF®. Cremophor® EL Castor oil. Technical Information. 2008.

BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N. Chagas cardiomyopathy – Where do we stand after a hundred years. **Progress in Cardiovascular Diseases**. v.52, p.300 – 316. 2010.

BORDES, C.; FRÉVILLE, V.; RUFFIN, E.; MAROTE, P.; GAUVRIT, J.Y.; BRIANÇON, S.; LANTÉRI, P. Determination of poly(ε-caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**. v.383, p.236-243. 2010.

BORHADE, V.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Clotrimazole nanoemulsions for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, design and physicochemical evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**. v.431 (1-2), p.138 – 148. 2012.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**. v.280, p. 241–251, 2004.

BORDES, C.; FRÉVILLE, V.; RUFFIN, E.; MAROTE, P.; GAUVRIT, J.Y.; BRIANÇON, S.; LANTÉRI, P. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**. v.383, p.236-243. 2010.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 389-396, 1962.

BUCKNER, F.S; URBINA, J.A. Recent development in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.2, p.236 – 242. 2012.

BUSTAMANTE, P.; PEÑA, M.A.; BARRA, J. The modified extended Hansen method to determine partial solubility parameters of drugs containing a single hydrogen bonding group and their sodium derivatives: benzoic acid/Na and ibuprofen/Na. **International Journal of Pharmaceutics**. v.194, p.117 – 124. 2000.

CAMPOS, F.M.F. **Caracterização do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase (TcADH) e associação da sua baixa expressão com o fenótipo de resistência in vitro do *Trypanosoma cruzi* ao benzonidazol**. 2007. 77f. Dissertação (Mestrado). Fundação Oswaldo Cruz – Instituto René Rachou. Rio de Janeiro – RJ. 2007.

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

CASTRO, S.L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **ARBS - Annual Review of Biomedical Sciences**. v.3, p.49 – 83. 2001.

CAZO, N.A.; PEREIRA-FILHO, E.R.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PUHL, A.C., POLIKARPOV, I.; FORIM, M.R. Nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. **Orbital – The Electronic Journal of Chemistry**. v.4(2). 2012.

CHEN, Y.; LIU, J.; YANG, X.; ZHAO, X.; XU, H.; Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v.57, p.259 – 264. 2005.

CONSTANTINIDES, P.P., CHAUBAL, M.V.; SHORR, R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.60, p.757 – 767. 2008.

CORREA, A.G. Taxol: Da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**. v.18(5), p.460 – 467. 1995.

COURA, J.R. & CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97(1), p.3-24, 2002.

CUNHA, W.R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, N.P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**. v.69, p.470 – 472. 2003.

CUNHA, W.R.; CREVELIN, E.J.; ARANTES, G.M.; CROTTI, A.E.M.; SILVA, M.L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; ALBUQUERQUE, S.; FERREIRA, D.S. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**. v.20, p.474 – 478. 2006.

CUNHA, L.C.S.; SILVA, M.L.A.; FURTADO, N.A.C.; VINHÓLIS, A.H.; MARTINS, C.H.G.; SILVA-FILHO, A.A.; CUNHA, W.R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift fur Naturforschung C**. v.62(9-10), p.668 – 672. 2007.

DE MOURA, K.C.G.; SALOMÃO, K.; MENNA-BARRETO, R.F.S; EMERY, F.S.; PINTO, M.F.R.; PINTO, A.V.; CASTRO, S.L. Studies on the trypanocidal activity of semi-synthetic pyran[*b*-4,3]naphthol[1,2-*d*]imidazoles from β -lapachone. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.39, p.639 – 645. 2004

DIAS, L.C., DESSOY, M.A., SILVA, J.J.N., THIEMANN, O.H., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**. v.32(9), p.2444 – 2457. 2009.

DINIZ, M.E.R.; **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 93f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2011.

DOCAMPO, R., MORENO, S.N.J., TURRENS, J.F., KATZIN, A.M., GONZALEZ-CAPPA, S.M., STOPPANI, A.O.M. Biochemical and structural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.3, p.169 – 180. 1981.

ELOY, J.O. **Dispersões sólidas de ácido ursólico para otimização do tratamento da doença de Chagas**. 2012. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP. 2012.

ELOY, J.O.; MARCHETTI, J.M Solid dispersions containing ursolic acid in poloxamer 407 and PEG 6000: a comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**. v.253, p.98 – 106. 2014.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.251, p.53 – 58. 2004

FERREIRA, D.S.; ESPERANDIM, V.R.; TOLDO, M.P.A.; SARAIVA, J.; CUNHA, W.R.; ALBUQUERQUE, S. Trypanocidal activity and acute toxicity assesment of triterpene acids. **Parasitology Research**. v.106, p.985 – 989. 2010.

FERREIRA, D.S.; ESPERANDIM, V.R.; TOLDO, M.P.A; KUEHN, C.C.; PRADO-JÚNIOR, J.C.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; ALBUQUERQUE, S. *In vivo* activity of ursolic and oleanolic acids during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Experimental Parasitology**. v.134, p.455 – 459. 2013.

FERREIRA, J.G. **Estudo de compostos quinônicos com potencial atividade contra a doença de Chagas**. 2008. 97f. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos – SP. 2008.

FORMULACTION SA. Turbiscan LAB – Guide d'utilisation. 2008

FRÉVILLE, V.; van HECKE, E.; MARINKOVIC, S. *et al.* Mapping and multivariate analysis for a rapid evaluation of new green solvents characteristics and efficiency. **Journal of Dispersion Science and Technology**. v.32, p.1742-1752. 2011

FURTADO, R.A.; RODRIGUES, E.P.; ARAUJO, F.R.R.; OLIVEIRA, W.L.; FURTADO, M.A.; CASTRO, M.B.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. **Toxicologic Pathology**. v.36, p.576 – 580. 2008.

GATEFOSSÉ, Capryol® 90 Applications. Disponível em: <http://www.gattefosse.com/en/applications/capryol-90.html>. Acessado em 10/02/2012.

GATEFOSSÉ®. Toxicological evaluation - Study reports – Capryol® 90. 2009.

GATEFOSSÉ®. Review on safety and toxicological aspects – Transcutol®. 2010.

GELDERBLOM, H.; VERWEIJ, J.; NOOTER, K.; SPARREBOOM, A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **Journal of Cancer**. v.37, p.1590 – 1598. 2001.

GNOATTO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC Method to assay total saponins in *Ilex Paraguaiensis* aqueous extract. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v 16, p. 723-726, 2005.

GOULART, R.R. **Otimização de flavonóide tilirosídeo como inibidor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 2012. 159p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos – SP. 2012.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post genomics. **International Journal for Parasitology**. v.31, p.443 – 452. 2001.

HANCOCK, B.C.; YORK, P.; ROWE, R.C. The use of solubility parameters in pharmaceutical dosage form design. **International Journal of Pharmaceutics**. v.148, p.1-21. 1997

HANSEN, C.M. **The three dimensional solubility parameter and solvent diffusion coefficient. Their importance in solvent coating formulation**. Copenhagen Danish Technical Press, 1967.

HOTEZ, P.J.; DUMONTEIL, E.; WOC-COLBURN, L. *et al.* Chagas disease: the new HIV/AIDS of the Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.6(5), p.e1498. 2012.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)*, 2005.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T.F.; DEDEREN, J.C.; GARCIA, M.J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.285, p.388 – 394. 2005.

IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B.P., VEIGA JUNIOR, V.F., NAKAMURA, C.V. Natural products and Chagas disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Reports**. v.28, p.802 – 823. 2011.

IZUMI, E., UEDA-NAKAMURA, T., VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. v.55, p.2994 – 3001. 2012.

KELLMAN, R.G. et. al. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 342, p. 231–239, 2007

KIM, K.A.; LEE, J.S.; PARK, H.J.; KIM, J.W.; KIM, C.J.; SHIM, I.S.; KIM, N.J.; HAN, S.M.; LIM, S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. **Life Sciences**. v.74, p.2769 – 2779. 2004.

KROPF, S.P. Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença no Brasil (1909 – 1923). *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*. v.16(1), p.205 – 227. 2009.

LEPESHEVA, G., WATERMAN, M.R. CYP451 – The omnipotent P450. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.215, p.165 – 170. 2004.

LESCURE, F.X.; LE LOUP, G.; FREILIJ, H. *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**. v.10, p.556 – 570. 2010.

LI, Y., ZHENG, J., XIAO, H., McCLEMENTS, D.J. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. **Food Hydrocolloids**. v.27, p.92-94, 2012

LIMA, I.O. **Atividade antifúngica e toxicidade dos monoterpenos citral e carvacol**. 2011. 125f. Tese (Doutorado). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB. 2011.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**. v.49, p.57 – 68. 1995.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, p.92 – 94. 2005.

LIU, J.; HUANG, X.F.; LU, L.J.; LI, M.X.; XU, J.C.; DENG, H. P. Turbiscan Lab Expert analysis of the biological demulsification of a water-in-oil emulsion by two biodemulsifiers. **Journal of Hazardous Materials**. v.190, p.214-221. 2011.

LOPES, A.L. **Aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de pacientes com infecção ou doença de Chagas do município de Berilo – Vale do Jequitinhonha – MG após nove anos do tratamento específico com benzonidazol**. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. 2007.

LU, J.; ZHENG, Y.L.; WU, D.M.; LUO, L.; SUN, D.X.; SHAN, Q. Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. **Biochemical Pharmacology**. v.74, p.1078 – 1090. 2007.

MACIEL, N.R. **Desenvolvimento de emulsões múltiplas cosméticas contendo óleo de girassol e óleo de gergelim: estudos de estabilidade físico-química**. 2012. 103f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP. 2012.

MARÍN, C., RAMÍREZ-MACÍAS, I., LÓPEZ-CÉSPEDES, A., OLMO, F., VILLEGAS, N., DÍAZ, J.G., ROSALES, M.J., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R., SÁNCHEZ-MORENO, M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas disease. **Journal of Natural Products**. v.74, p.744 – 750. 2011.

MATSOUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; MATSUMURA, N.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. III. Structure-related inhibitory activity and action mode of oleanolic acid glycosides on hypoglycemic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v.46(9), p.1399 – 1403. 1998.

McCLEMENTS, D.J. Nano-emulsion based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. **Therapeutic Delivery**. v.4(7), p.841 – 857. 2013.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: The Turbiscan MA 1000. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v.152, p.111 – 123. 1999.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104 (supl. 1), p.17-30, 2009.

NOVO, L.P. **Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana de açúcar**. 2012. 139p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo. São Carlos – SP. 2012.

OSORIO, E.; ARANGO, G.J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M.A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. v.111, p.630 – 635. 2007.

PATEL, J.; KEVIN, G.; PATEL, A.; RAVAL, M.; SHETH, N. Design and development of a self-nanoemulsifying drug delivery system for telmisartan for oral drug delivery . **International Journal of Pharmaceutical Investigation**. v.1(2), p.112 – 118. 2011.

PEREIRA, M.M., JÁCOME, R.L.R.P., ALCÂNTARA, A.F.C., ALVES, R.B., RASLAN, D.S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Química Nova**. v.30(4), p.970 – 983. 2007.

PINAZKO, M.J.; ESPINOSA, G.; GÁLLEGO, M. *et. al.* Case report: successful treatment with Posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupulus erytrematosus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.82(4), p.583 – 587. 2010.

RAMACHANDRAN, S.; PRASAD, N.R. Effect of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, on ultraviolet-B radiation-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions**. v.176, p.90 – 107. 2008.

RAO, M.R.P.; SHITAL, A.; GIRISH, S.; KUMAR, M. Determination of required HLB of Capryol 90. **Journal of Dispersion Science and Technology**. v.35(2), p.161 – 167. 2014.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **The Lancet**. v.375 p.1388-1402. 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004

RIBEIRO, A., PILÓ-VELOSO, D., ROMANHA, A.J., ZANI, C.L. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. **Journal of Natural Products**. v.60, p.836 – 838. 1997.

RIBEIRO, I., SEVCSIK, A.M., ALVES, F., DIAP, G., DON, R., HARHAY, M.O, CHANG, S., PECOUL, B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.3(7), e484, 2009.

RODRIGUEZ, R.M. **Estudo da emissão de íons estáveis e metaestáveis (LiF)_nLi⁺ induzida por fragmentos de fissão do ²⁵²Cf**. 2003. 140f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Física. Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ. 2003.

SADURNÍ, N., SOLANS, C., AZEMAR, N., GARCIA-CELMA, M.J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.26, p.438–445, 2005.

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

SEMERENE, B. **Brasil entregará medicamento para Chagas à cinco países**. Ministério da Saúde - Portal da Saúde. 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=d>. Acessado em 01/12/2012.

SHAFIQ, S., SHAKEEL, F., TALEGAONKAR, S., AHMAD, F.J., KHAR, R.K., ALI, M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.66, p.227–243, 2007.

SHEPPARD, D., LAMPIRIS, H.W. Agentes antifúngicos. In: KATZUNG, B.G. Farmacologia Básica e Clínica. 8ª edição. Rio de Janeiro – RJ. Editora Guanabara Koogan S/A. 2002. p.709 – 716.

SHIH, Y.H.; CHEIN, Y.C.; WANG, J.Y.; FU, Y.S. Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. **Neuroscience Letters**. v.362, p.136 – 140. 2004.

SOLANS, C., IZQUIERDO, P., NOLLA, J., AZEMAR, N., GARCIAL-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v.10, p.102-110, 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v.17, p.246 – 254. 2012.

SOMOVA, L.O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effect of oleanolic acid and ursolic acid in experimental hypertension. **Phytomedicine**. v.10, p.115 – 121. 2003.

SOUZA, W., CARVALHO, T.M.U., BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**. v.2010, p.1-18. 2010.

SURECHEM, Document - USPTO Granted - Patent No. 6294192. Disponível em: http://www.surechem.org/index.php?Action=document&docId=2576194&db=USPTO&tab=clms&lang=&db_query=2%3A0%3A&markupType=all. Acessado em 10/02/2012.

SYKES, M.L.; BAELL, J.B.; KAISER, M.; CHATELAIN, E.; MOAWAD, S.R.; GANAME, D.; LOSET, J.R.; AVERY, V.M. Identification of compounds with anti-proliferative activity against *Trypanosoma brucei brucei* strain 427 by a hole cell viability based HTS campaign. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.6(11), p.e1896. 2012.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUEMA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.108-109, p.303-318, 2004.

TREVISANI, M.G. **Potencialidade do uso de sistemas lipossomais contendo ácido ursólico como estratégia para otimização do tratamento da doença de Chagas**. 2014. 84p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP. 2014.

URBINA, J.A., Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.104(1), p.311 – 318. 2009.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**. v.115, p.55 - 65. 2010.

VASCONCELOS, M.A.; ROYO, V.A.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.; ANDRADE E SILVA, M.L.; CARVALHO, J.C.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift fur Naturforschung C**. v.61(7-8), p.477 – 482. 2006.

VAY, K.; SCHELER, S.; FRIEB, W. Application of Hansen solubility parameters for understanding and prediction of drug distribution in microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. v.416, p.202-209. 2011

VILLALTA, F., SCHARFSTEIN, J., ASHTON, A.W. *et al.* Perspectives on the *Trypanosoma cruzi* – host cell receptor interactions. **Parasitology Research**. v.104, p.1251 – 1260. 2009.

VILLALTA, F., DOBISH, M.C., NDE, P.N., KLESCHENKO, Y.Y., HARGROVE, T.Y., JOHNSON, C.A., WATERMAN, M.R., JOHNSON, J.N., LEPESHEVA, G.I. VNI cures acute and chronic Chagas disease. **The Journal of Infectious Disease**. v.208, p.504 – 511. 2013.

XI, J. *et al.* Formulation Development and Bioavailability. Evaluation of a Self-Nanoemulsified Drug Delivery System of Oleanolic Acid. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.10, p.172-182, 2009

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.C.; OLIVEIRA A.B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**. v. 3(1), p. 13-18. 2002.

REFERÊNCIAS

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**. v.57, p.105 – 109. 2008.

YOU, H.J.; CHOI, C.Y.; KIM, J.Y.; PARK, S.J.; HAHM, K.S.; JEONG, H.G. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. **FEBS Letters**. v.509, p.156 – 160. 2001.

WANG, L., DONG, J., CHEN, J., EASTOE, J., LI, X. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.330, p.443–448, 2009.