

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Livia Mara Silva

ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
SUBSTÂNCIAS NATURAIS EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Juiz de Fora
2018

Livia Mara Silva

**ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
SUBSTÂNCIAS NATURAIS EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produtos naturais bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Coorientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Livia Mara .

Atividade esquistossomocida de substâncias naturais em nanopartículas lipídicas sólidas / Livia Mara Silva. -- 2018. 138 p.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Coorientador: Frederico Pittella Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. Esquistossomose. 2. Cardamonina. 3. Licochalcona A. 4. Nanotecnologia. 5. Nanopartículas lipídicas sólidas. I. da Silva Filho, Ademar Alves, orient. II. Pittella Silva, Frederico, coorient. III. Título.

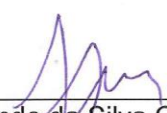
**Atividade Esquistossomícida de Substâncias Naturais em
Nanopartículas Lipídicas Sólidas**

Livia Mara Silva

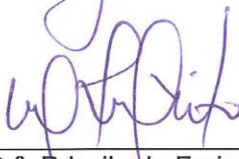
ORIENTADOR: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho
COORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF,
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

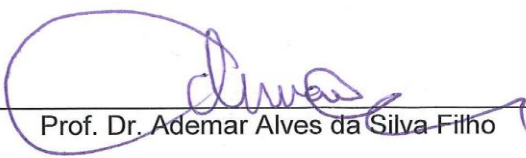
Aprovada em 12/07/2018



Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Junior



Profª. Drª. Priscila de Faria Pinto



Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

***Dedico este trabalho a todas as pessoas que convivem
com o risco de contraírem doenças que, ainda hoje, são
negligenciadas.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre cuidar bem de mim, fazendo tudo acontecer no momento certo.

Ao Átila, pelo amor, força, apoio e por compreender a minha ausência tantas vezes devido a este trabalho. Pelos abraços reconstrutores e por ser um porto seguro quando tudo parecia insuportável. Por ser tolerante com meus erros, pelos conselhos e por todos os momentos compartilhados.

À minha mãe Lânia, que sempre foi um grande exemplo de dedicação e superação, pela minha formação, pela torcida e pelos cuidados diários que encurtaram a distância e a saudade.

Aos meus irmãos Léo, Rominho e Pa, que acompanharam essa conquista e pelos momentos de riso constante, que me fizeram esquecer tantas dificuldades.

Aos meus pequenos Diego, Aslan, Teresa e Augusto por me lembrarem, em todos os momentos, a importância de manter o tom questionador e por serem o meu sorriso mais sincero.

À minha família e amigos pelos momentos de descontração e amor reconfortante.

Ao Professor Ademar, pela orientação, tolerância, confiança em mim e por permitir a execução desse trabalho.

Ao Professor Frederico Pittella, pela coorientação, por auxiliar as minhas dúvidas e por me fazer enxergar o que era obscuro.

Aos amigos do NIPPAN, que me receberam de braços abertos desde o início desta jornada e tornaram o trabalho mais agradável com a convivência. Aos alunos de iniciação científica, Ismael, Lauriene, Thalyta, Ohana, Matheus, Mirela, Monique e Marcela, por me ensinarem todas as tarefas do laboratório e por serem os maiores auxiliares do meu trabalho. Aos alunos Lucas e Allan pela amizade e alegria contagiante. À Lara Soares, pela palavra sempre sábia, amiga.

À Lorena Riani, pela amizade, pela paciência, pelo olhar trocado e por me ensinar, com seu coração tão bom, a ser um pouco melhor.

À Professora Priscila de Faria, por sempre me receber com coração aberto, pelo tempo dedicado a este trabalho, pelas palavras sinceras que me encorajaram em vários momentos e pela realização do ensaio *in vivo*.

À Danielle Marconato, pelos momentos de descontração, por todo auxílio e ensinamentos.

Ao Professor Humberto de Mello Brandão, pelos sábios conselhos e por permitir a utilização dos equipamentos da EMBRAPA.

À Camila Guimarães, pela ajuda nos ensaios de caracterização, pela disponibilidade e pelas excelentes conversas.

Ao Professor Josué de Moraes, pelas explicações, pela disposição e realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Ao Professor Gilson, pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC pela realização das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Professor Armando, por ser o pré-cursor do meu desenvolvimento científico e exemplo de profissional.

Aos colegas do LTF UFMG, em especial Lorena e Lili, por serem as minhas bases científicas.

Aos colegas de mestrado, em especial Ana Flávia e Alexandre, que foram as primeiras amizades em Juiz de Fora.

Aos colegas do LDNANO, pela recepção sempre calorosa e pelas boas ideias!

À Professora Mara Rubia, pelo tempo, por me ensinar a não desistir tão cedo e pelo uso do RMN.

À Professora Nádia Rezende, por disponibilizar o espaço do laboratório tantas vezes para realização desse trabalho.

Aos funcionários da UFJF, pela recepção sempre calorosa e pelo comprometimento com as atividades que desenvolvemos.

Aos Professores José Otávio e Maria Silvana por permitirem a conclusão deste trabalho juntamente com minhas atividades de trabalho.

Aos profissionais do Melpoejo, que incentivaram essa conquista e me auxiliaram na adaptação a Juiz de Fora.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

À FAPEMIG (Processos: PPM00296-16 e APQ01013-18) e CAPES, pelo apoio financeiro deste projeto.

Obrigada!

“É nas experiências, nas lembranças, na grande e triunfante alegria de viver na mais ampla plenitude que o verdadeiro sentido é encontrado.”

(Christopher McCandless)

RESUMO

A esquistossomose, causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*, é um grave problema de saúde pública no Mundo e no Brasil e está presente na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) da Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil, Minas Gerais (MG) é o estado mais afetado com a doença. Atualmente, há um grande número de doentes e o tratamento é obtido somente com um fármaco (praziquantel), ineficaz contra formas jovens do parasito e com relatos de resistência. Sendo assim, a pesquisa de novos fármacos esquistossomicidas torna-se muito importante. O uso de substâncias naturais destaca-se nesse cenário, sendo a cardamonina e a licochalcona A, chalconas com atividades esquistossomicidas já registradas em literatura. A nanotecnologia permite a incorporação de substâncias ativas em sistemas de escala nano que por sua vez, diminuem a toxicidade e aumenta a biodisponibilidade de substâncias. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) constituem um interessante sistema, pois são compostas por lipídeos, em sua maioria, biocompatíveis. A associação de nanotecnologia e produtos naturais foi desenvolvida nesse trabalho para um possível tratamento da esquistossomose. As NLS foram desenvolvidas por homogeneização por alto cisalhamento e caracterizadas em relação ao potencial zeta, tamanho da partícula, índice de polidispersão (Pdl), eficiência de encapsulação, liberação *in vitro*, estabilidade e citotoxicidade. Ensaio de toxicidade mostraram que as nanopartículas diminuem a toxicidade das substâncias diante de macrófagos da linhagem celular J774 e a hemólise. As formulações foram testadas *in vitro* e *in vivo* contra vermes adultos de *S. mansoni* e provocaram a morte dos parasitos. *In vitro*, a cardamonina incorporada em NLS provocou a morte de 100% dos parasitos em 24 horas na concentração de 25 μ M, além de significativa redução da atividade motora dos parasitos, resultados semelhantes ao obtido com a cardamonina livre. As NLS com licochalcona A provocaram a morte de vermes adultos em concentração menor do que a licochalcona A livre. *In vivo*, quando administrada via oral, a nanopartícula com licochalcona A diminui a carga parasitária em 30%, enquanto que a substância livre foi ineficaz. Pela via intraperitoneal, tanto a licochalcona A livre e encapsulada reduziram mais de 50% da carga parasitária. Os resultados obtidos indicam que as NLS contendo os ativos encapsulados são uma alternativa mais segura para o hospedeiro em tratamento da esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; Cardamonina; Licochalcona A; Nanotecnologia; Nanopartículas Lipídicas Sólidas;

ABSTRACT

Schistosomiasis, caused by *Schistosoma mansoni*, remains a serious public health problem in the world and Brazil, being present in the list of Neglected Tropical Diseases (NTDs) of the World Health Organization (WHO). In Brazil, Minas Gerais (MG) is the state most affected by the disease. Currently, there are a large number of patients and the treatment is only done with a drug (praziquantel), ineffective against young forms of parasites and to reports of resistance. Therefore, research for new schistosomiasis drugs becomes very important. The use of natural substances stands out in this scenario and cardamonin and licochalcone A are chalcones with schistosomicidal activities already registered in the literature. Nanotechnology allows the incorporation of active substances into nano-scale systems which, in turn, decrease toxicity and increase the bioavailability of drugs. Solid lipid nanoparticles (SLN) are an interesting nano system because they are composed of mostly biocompatible lipids. The association of nanotechnology and natural products was used in this work for a possible treatment of schistosomiasis. SLN were developed by high shear homogenization and characterized for its zeta potential, particle size, polydispersion index (PDI), encapsulation efficiency, *in vitro* release, stability and cytotoxicity. Toxicity assays shows that nanoparticles decrease the toxicity of the substances in front of macrophages J774 cell line and hemolysis. The formulations were tested *in vitro* and *in vivo* against adult *S. mansoni* worms and decreased the viability of parasite. *In vitro*, cardamonin incorporated in SLN caused the death of 100% of the parasites in 24 hours at the concentration of 25 μ M, in addition to significant reduction in the motor activity of the parasites. These results were similar to that of free cardamonin. SLN with licochalcone A caused the death of adult worms in a concentration lower than the free licochalcone A. *In vivo*, when orally administered, the nanoparticle with licochalcone A decreases 30% of the parasites, while the free substance was ineffective. By the peritoneal administration, free and encapsulated licochalcone A reduced more than 50% of the parasites. The results indicate that SLN containing encapsulated actives are a safe alternative for the host in the treatment of schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; Cardamonin; Licochalcone A; Nanotechnology; Solid Lipid Nanoparticles;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Prevalência da esquistossomose no mundo.....	19
Figura 2	Distribuição da esquistossomose no Brasil no período de 2010 – 2015..	20
Figura 3	Microscopia eletrônica do casal de <i>S. mansoni</i>	22
Figura 4	Esquema representativo da absorção de nutrientes pelo trato gastrintestinal e tegumento do <i>S. mansoni</i>	22
Figura 5	Tegumento de verme adulto macho de <i>S. mansoni</i>	24
Figura 6	Esquema representativo de quebra de ATP, ADP em AMP por enzimas do <i>S. mansoni</i>	25
Figura 7	Ciclo de vida do parasito <i>S. mansoni</i>	27
Figura 8	Estrutura química do enantiômero <i>R</i> do PZQ.....	28
Figura 9	Estrutura química geral de chalconas.....	32
Figura 10	Estrutura química da cardamonina.....	33
Figura 11	Gráfico representando a inibição da NATPDase pela cardamonina.....	34
Figura 12	Estrutura química da licochalcona A.....	35
Figura 13	Principais sistemas nanoestruturados utilizados na área farmacêutica....	39
Figura 14	Estrutura de nanopartícula lipídica sólida.....	44
Figura 15	Esquema ilustrativo do monômero de Pluronic F-127.....	45
Figura 16	<i>A. speciosa</i> , popularmente conhecida como Pacová Colônia.....	53
Figura 17	Partição líquido-líquido do extrato metanólico de raízes de <i>A. speciosa</i> .	54
Figura 18	Fracionamento do extrato metanólico das raízes de <i>A. speciosa</i>	56
Figura 19	Fracionamento do extrato seco das raízes de <i>G. inflata</i>	58
Figura 20	Esquema representativo do preparo de NLS.....	60
Figura 21	Perfil cromatográfico do padrão de cardamonina em CLAE-DAD, tempo de retenção e espectro de absorção no UV.....	72
Figura 22	Perfil cromatográfico do extrato EAS-L de raízes de <i>A. speciosa</i> em CLAE-DAD e espectro de absorção no UV do pico destacado em verde, correspondente à cardamonina.....	73
Figura 23	CCD da fração diclorometânica (FDAS-L), fração hexânica (FHAS-L) e padrão de cardamonina.....	74
Figura 24	Perfil cromatográfico da eluição da fração FDAS-L em CLAE-DAD e o tempo de retenção dos picos.....	74

Figura 25	Perfil cromatográfico da fração FDAS-L em CLAE-DAD, tempo de retenção dos picos e o espectro de absorção no UV do pico destacado em verde, equivalente à cardamonina, com fase móvel 70% metanol.....	75
Figura 26	Perfil cromatográfico da fração FDAS-L em CLAE-DAD, tempo de retenção dos picos e o espectro de absorção no UV do pico destacado em verde, correspondente à cardamonina, com fase móvel 80% metanol.....	76
Figura 27	CCD das frações obtidas por CLV a partir do extrato seco de <i>G. inflata</i> e padrão de licochalcona A.....	77
Figura 28	Diagrama de distribuição da licochalcona A em função do pH.....	78
Figura 29	Precipitado obtido após a extração por partição ácido-base.....	78
Figura 30	CCD do padrão de licochalcona A e precipitado obtido (ppt).....	79
Figura 31	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina.....	80
Figura 32	Expansão da região dos hidrogênios olefínicos H_α e H_β do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina.....	81
Figura 33	Expansão da região dos hidrogênios do anel aromático B do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina.....	82
Figura 34	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da licochalcona A.....	84
Figura 35	Expansão da região de δ 7,00 ppm do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da licochalcona A.....	85
Figura 36	Caracterização visual de NLS.....	87
Figura 37	Histogramas de intensidade de NLS.....	87
Figura 38	Eletromicrografia de transmissão das NLS-L.....	90
Figura 39	Curva analítica obtida para quantificação de cardamonina em filtrados de NLS.....	91
Figura 40	Perfil cromatográfico do filtrado de NLS-C em CLAE-DAD.....	91
Figura 41	Curva analítica obtida para quantificação de licochalcona A em filtrados de NLS.....	92
Figura 42	Perfil cromatográfico do filtrado de NLS-L.....	93
Figura 43	Perfis de liberação da cardamonina, licochalcona A, NLS-C e NLS-L...	94
Figura 44	Perfil cromatográfico da amostra de manteiga de cupuaçu antes e após exposição à radiação UV em CG-EM.....	98

Figura 45	Gráfico representativo de viabilidade celular em macrófagos da linhagem celular J774 tratadas com cardamonina e NLS-C.....	100
Figura 46	Gráfico representativo de viabilidade celular em macrófagos da linhagem celular J774 tratadas com licochalcona A e NLS-L.....	101
Figura 47	Atividade hemolítica da cardamonina, licochalcona A e NLS em eritrócitos humanos.....	102
Figura 48	Microscopia eletrônica de varredura do tegumento dos parasitos utilizados como controle negativo.....	106
Figura 49	Microscopia eletrônica de varredura do tegumento dos parasitos tratados com cardamonina e licochalcona A livres, NLS-C e NLS-L.....	108
Figura 50	Imagens demonstrando a fluorescência dos parasitos expostos à NLS-RN por 1 hora, em microscopia confocal.....	109
Figura 51	Imagens demonstrando a fluorescência dos parasitos expostos à NLS-RN por 2 horas, em microscopia confocal.....	110
Figura 52	Imagens seriadas, em eixo z, de parasito tratado com NLS-RN, por 1 hora em microscopia confocal.....	110
Figura 53	Gráfico representando a carga parasitária em média por grupo experimental do estudo <i>in vivo</i> com administração oral.....	114
Figura 54	Gráfico representando a carga parasitária em média por grupo experimental do estudo <i>in vivo</i> com administração intraperitoneal.....	116
Figura 55	Parasitos recolhidos por perfusão 2 horas após a administração <i>in vivo</i> intraperitoneal de NLS-RN.....	116
Figura 56	Efeitos da licochalcona A e NLS-L no oograma de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Algumas doenças tropicais negligenciadas listadas pelas OMS.....	18
Tabela 2	Dados do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) em Minas Gerais, de 2006 a 2016.....	21
Tabela 3	Substâncias naturais e seus derivados ativos contra <i>Schistosoma</i>	29
Tabela 4	Estudos envolvendo nanotecnologia para tratamento de esquistossomose.....	42
Tabela 5	Fases móveis utilizadas na cromatografia líquida à vácuo do extrato seco de <i>G. inflata</i>	57
Tabela 6	Composição das nanopartículas lipídicas sólidas.....	59
Tabela 7	Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral.....	70
Tabela 8	Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via intraperitoneal.....	70
Tabela 9	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina e dados descritos em literatura.....	83
Tabela 10	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da licochalcona A e dados descritos em literatura.....	86
Tabela 11	Resultados obtidos na caracterização físico-química das NLS.....	88
Tabela 12	Modelos matemáticos utilizados para determinação da cinética de liberação da cardamonina e licochalcona A das NLS.....	95
Tabela 13	Resultados de potencial zeta, PdI e tamanho médio das NLS submetidas a estudo de estabilidade em temperatura ambiente e refrigeradas a 4 °C.....	97
Tabela 14	Efeitos <i>in vitro</i> de cardamonina e NLS-C contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	104
Tabela 15	Efeitos <i>in vitro</i> de licochalcona A e NLS-L contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	105
Tabela 16	Recuperação de parasitos após tratamento oral.....	112
Tabela 17	Recuperação de parasitos após tratamento via intraperitoneal.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM - Cromatografia de fase Gasosa acoplado com espectroscopia de massas
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV – Cromatografia Líquida à Vácuo
DAD – Detector de Arranjo de Diodo
DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DLS - *Dynamic Light Scattering*
DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FA - Fase Aquosa
FO - Fase Orgânica
IAL - Instituto Adolfo Lutz
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica da Varredura
NIPPAN - Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
NIQUA - Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica
NLS - Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NLS-B – Nanopartículas Lipídicas Sólidas Brancas
NLS-C – Nanopartículas Lipídicas Sólidas com Cardamonina
NLS-L – Nanopartículas Lipídicas Sólidas com Licochalcona A
NLS-RN – Nanopartículas Lipídicas Sólidas com Red Nile
OMS - Organização Mundial de Saúde
PdI - *Polidispersion Index*
PZQ – Praziquantel Rf
- Fator de Retenção
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H – Ressonância Magnética de Hidrogênio
TMS – Tetrametilsilano
UV - Ultravioleta
UV/VIS – Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ESQUISTOSSOMOSE.....	18
1.2 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	21
1.2.1 <i>Schistosoma mansoni</i>.....	21
1.2.2 Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>.....	26
1.2.3 Tratamento da esquistossomose mansônica.....	28
1.3 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA.....	29
1.3.1 Chalconas.....	32
1.3.1.1 <i>Cardamonina</i>	32
1.3.1.2 <i>Licochalcona A</i>	35
1.4 NANOTECNOLOGIA.....	37
1.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	44
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	51
3.2 MATERIAIS QUÍMICOS UTILIZADOS.....	52
3.3 ISOLAMENTO DA CARDAMONINA.....	53
3.3.1 Obtenção de extrato bruto das raízes de <i>A. speciosa</i>.....	53
3.3.2 Fracionamento do EAS-L por partição líquido-líquido.....	54
3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	55
3.3.3.1 <i>Análise qualitativa do extrato bruto e fração FDAS-L por CLAE.....</i>	<i>55</i>
3.3.3.2 <i>CLAE semi-preparativa da fração FDAS-L.....</i>	<i>56</i>
3.4 ISOLAMENTO DA LICOCHALCONA A.....	57
3.4.1 Cromatografia líquida à vácuo (CLV).....	57
3.4.2 Isolamento da licochalcona A por partição ácido-base.....	57
3.5 IDENTIFICAÇÃO DA CARDAMONINA E LICOCHALCONA A.....	59
3.6 DESENVOLVIMENTO DAS NLS.....	59
3.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NLS.....	60
3.7.1 Caracterização físico-química.....	60

3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	61
3.7.3 Eficiência de encapsulação (% EE)	61
3.7.4 Estudo de liberação <i>in vitro</i>	61
3.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	62
3.8.1 Estudo de estabilidade das NLS de curta duração.....	62
3.8.2 Avaliação da composição lipídica da manteiga de cupuaçu frente à exposição UV por CG-EM.....	63
3.9 TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	63
3.9.1 Viabilidade celular.....	63
3.9.2 Teste de hemólise.....	64
3.10 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i>	65
3.10.1 Linhagem do <i>S. mansoni</i> e animais hospedeiros utilizados.....	65
3.10.2 Manutenção de vida do <i>S. mansoni</i>	65
3.10.3 Preparo das amostras.....	66
3.10.4 Ensaios <i>in vitro</i> com vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	66
3.11 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE PERMEABILIDADE DE NLS NO TEGUMENTO DE <i>S. mansoni</i>	67
3.12 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>	68
3.12.1 Manutenção de vida do <i>S. mansoni</i>	68
3.12.1.1 Via oral.....	68
3.12.1.2 Via intraperitoneal.....	69
3.12.2 Preparo das amostras.....	69
3.12.3 Grupos experimentais de animais.....	69
3.12.3.1 Grupos experimentais de animais com administração via oral.....	69
3.12.3.2 Grupos experimentais de animais com administração via intraperitoneal.....	70
3.12.4 Avaliação de carga parasitária.....	71
3.12.5 Oograma.....	71
3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 ISOLAMENTO DA CARDAMONINA.....	72
4.2 ISOLAMENTO DA LICOCHALCONA A.....	76
4.3 IDENTIFICAÇÃO DA CARDAMONINA E LICOCHALCONA A.....	79

4.3.1 Cardamonina	79
4.3.2 Licochalcona A	83
4.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NLS.....	86
4.4.1 Caracterização físico-química	86
4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão	89
4.4.3 Eficiência de encapsulação (% EE)	90
4.4.3.1 <i>Cardamonina</i>	91
4.4.3.2 <i>Licochalcona A</i>	92
4.4.4 Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	93
4.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	95
4.5.1 Estudo de estabilidade das NLS de curta duração	95
4.5.2 Avaliação da composição lipídica da manteiga de cupuaçu frente à exposição UV por CG-EM	98
4.6 TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	99
4.6.1 Viabilidade celular	99
4.6.2 Teste de hemólise	101
4.7 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i>	103
4.8 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE PERMEABILIDADE DE NLS NO TEGUMENTO DE <i>S. mansoni</i>	108
4.9 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>	111
4.9.1 Oograma	117
5 CONCLUSÃO.....	119
REFERÊNCIAS.....	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose, também denominada esquistossomíase ou popularmente barriga d'água, é uma doença crônica que atinge milhares de pessoas no mundo. As principais espécies que atingem o homem são *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. haematobium* (LEOW et al., 2015). No Brasil, *S. mansoni* é a espécie predominante, devido à presença do molusco de água doce *Biomphalaria glabrata*, o hospedeiro intermediário. Além disso, há condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do ciclo da doença, como ocupação humana desregulada e contaminação por excrementos das águas superficiais (MELO; COELHO, 2005; GRYSEELS; STRICKLAND, 2012).

A esquistossomose faz parte do conjunto de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (Tabela 1) listadas pela OMS (Organização Mundial de Saúde), sendo recomendada a quimioterapia preventiva em 52 países, na qual o tratamento é administrado independente de prévio diagnóstico. Atualmente, segundo estimativa da OMS, a doença infecta mais de 240 milhões de pessoas em 74 países e mais de 700 milhões de pessoas convivem com o risco de contrair a doença. Estima-se que em 2015, mais de 218 milhões de pessoas necessitaram de tratamento preventivo para a esquistossomose, mas somente cerca de 30% receberam a quimioterapia preventiva e 66,5 milhões foram tratadas (WHO, 2006; WHO, 2010; SKELLY et al., 2014; WHO, 2017a).

Tabela 1 – Algumas doenças tropicais negligenciadas listadas pelas OMS

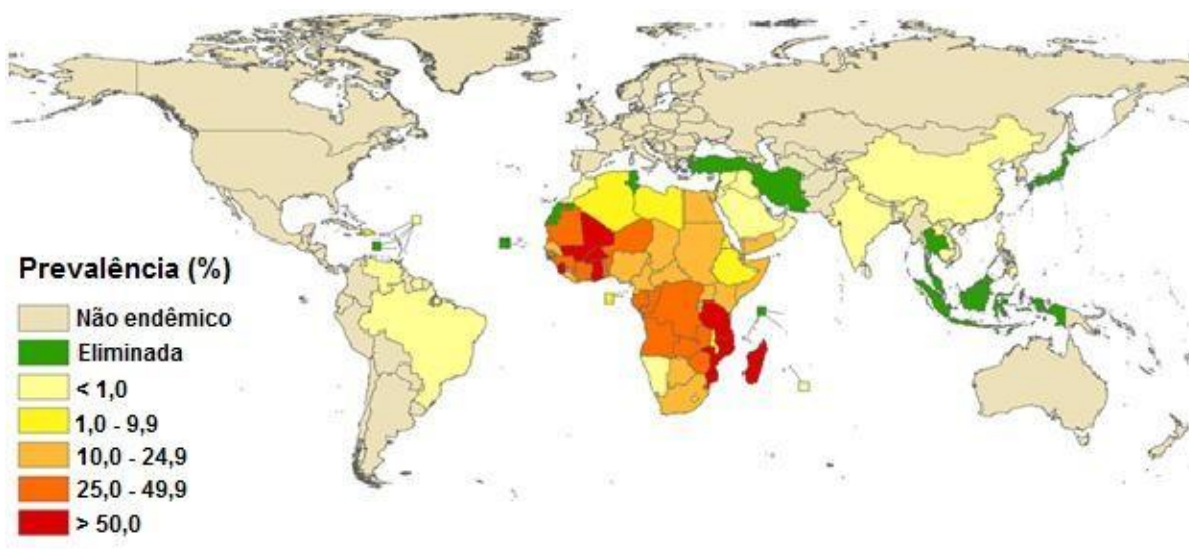
Doenças Tropicais Negligenciadas		
Dengue	Leishmaniose	Raiva
Tracoma	Cisticercose	Filariose linfática
Doença de Chagas	Equinococose	Hanseníase
Treponematoses endêmicas	Esquistossomose	Oncocercose
Micetoma, cromoblatomicose e outras micoses	Úlcera de Buruli (infecção por <i>Mycobacterium ulcerans</i>)	

Fonte: WHO, 2017b.

No mundo, a prevalência da esquistossomose é maior no continente africano, devido às condições precárias de saneamento. Na América Latina, a doença é encontrada no Brasil, Venezuela, Porto Rico, Antilhas e Suriname (MELO; COELHO, 2005; AMARAL et al.,

2006; UTZINGER et al., 2011; VITORINO et al., 2012). A figura 1 mostra a distribuição global da esquistossomose, de acordo com a prevalência estimada para cada país.

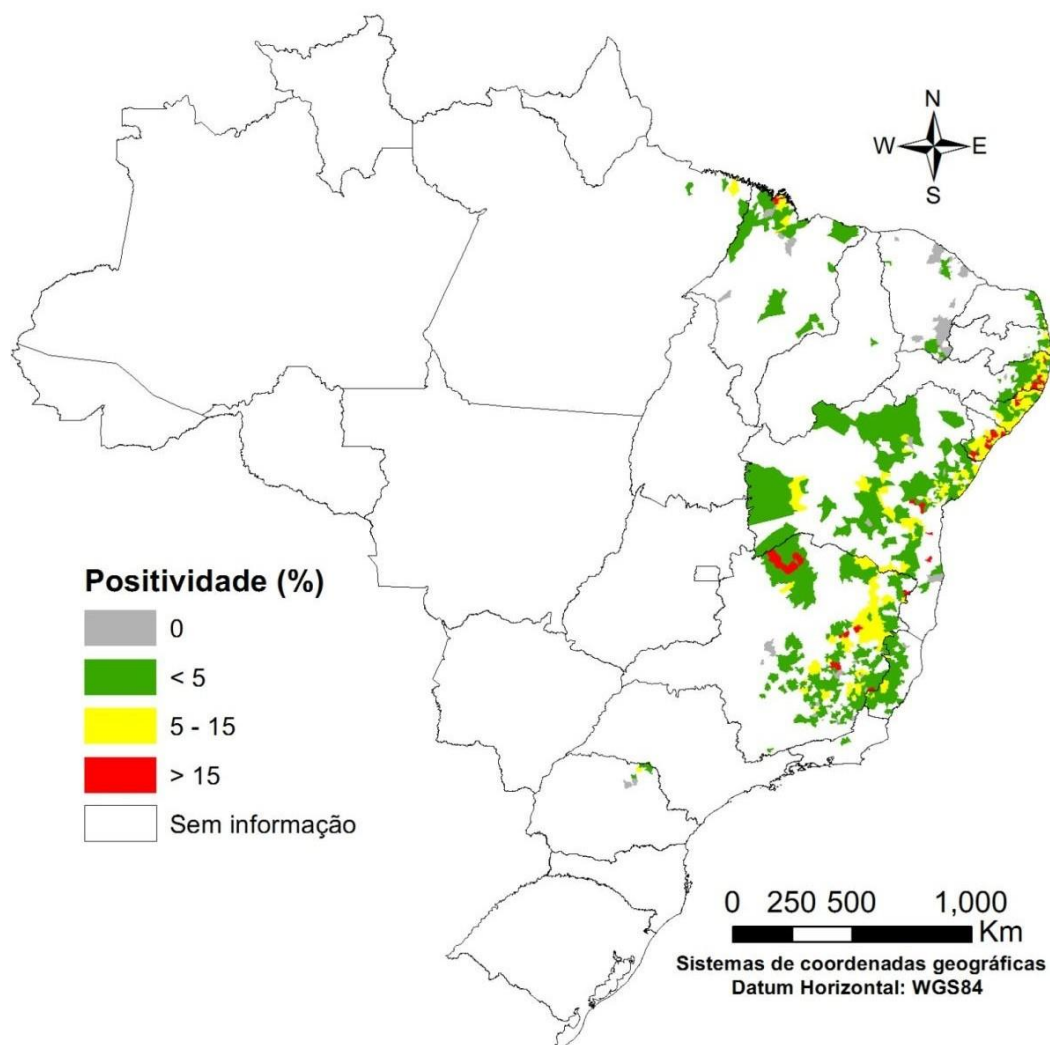
Figura 1 – Prevalência da esquistossomose no mundo



Fonte: Adaptado de UTZINGER et al., 2011.

No Brasil, estima-se que 6 milhões de pessoas estejam infectadas e 1,5 milhões estejam sob o risco de contrair a doença. A esquistossomose é registrada em vários estados brasileiros (Figura 2), como Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Maranhão, sendo que o estado de Minas Gerais possui a maior concentração (cerca de 70%) dos casos (MELO; COELHO, 2005; AMARAL et al., 2006; DRUMMOND et al., 2006; CONCEIÇÃO; COURA, 2012).

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose no Brasil no período de 2010 – 2015



Fonte: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS, 2017.

Assim como ocorre em todo o país, a doença vem se espalhando por Minas Gerais e, ultimamente, vem atingindo diversas regiões consideradas indenes, incluindo algumas áreas turísticas. Desse modo, além de um grave problema de saúde, torna-se um grave problema econômico e turístico (MASSARA et al., 2008). De acordo com Katz e Peixoto (2000), a prevalência da doença em Minas Gerais é superior a 7,8% e abrange mais de 500 municípios mineiros. Segundo dados do DATASUS – TABNET (2018), a prevalência da doença diminuiu nos últimos dez anos em Minas Gerais (Tabela 2), mas ainda requer atenção devido à elevada taxa de indivíduos não tratados, além da possibilidade de recidivas, número de indivíduos expostos ao risco de contrair a doença, quantidade de casos graves e possibilidade

da doença continuar se espalhando por novas áreas geográficas (KATZ; PEIXOTO, 2000; ROSS et al., 2002).

Tabela 2 – Dados do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) em Minas Gerais, de 2006 a 2016

Ano	Exames realizados	% Resultados Positivos	Indivíduos a tratar	% Indivíduos tratados
2006	643.308	4,40	35.138	77,5
2007	552.310	4,48	31.241	72,8
2008	411.557	4,72	20.786	85,1
2009	427.374	4,00	23.640	70,0
2010	367.363	4,43	27.771	60,7
2011	371.702	3,86	21.444	65,5
2012	251.172	3,31	17.912	40,1
2013	186.582	3,45	7.749	71,3
2014	160.420	3,01	6.596	65,3
2015	185.281	2,16	7.390	48,5
2016	22.231	1,97	505	42,6

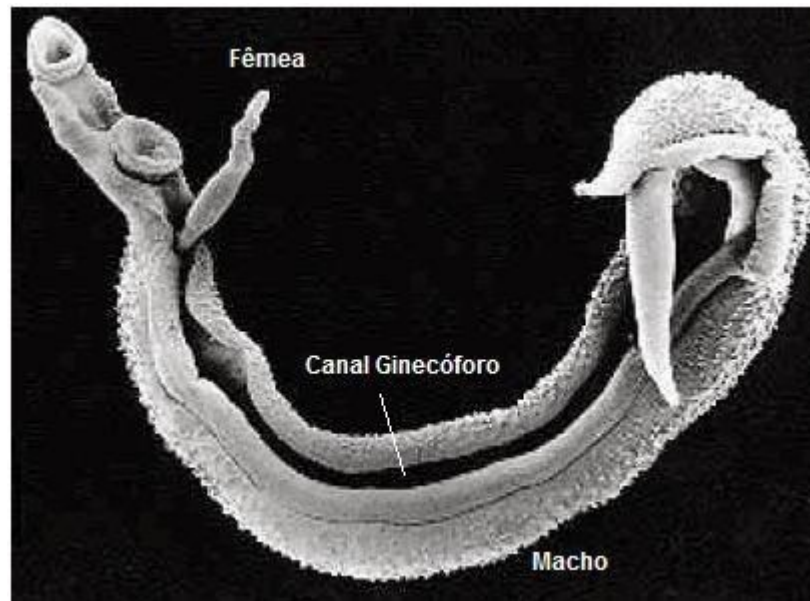
Fonte: MS/SVS/GT PCE (Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinan/pce/cnv/pcemg.def>) – Acessado em 28 de maio de 2018.

1.2 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

1.2.1 *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni*, causador da esquistossomose mansônica, é um platelminto que apresenta elevado dimorfismo sexual, ou seja, possuem sexos separados e facilmente distinguíveis entre si (Figura 3). O verme adulto masculino é mais curto e mais plano que a fêmea, a qual por sua vez, é maior e mais delgada. Geralmente, o casal é encontrado junto, em cópula constante, devido a presença do canal ginecóforo (abertura situada no dorso do verme de sexo masculino que abriga a fêmea) (GRYSEELS; STRICKLAND, 2012).

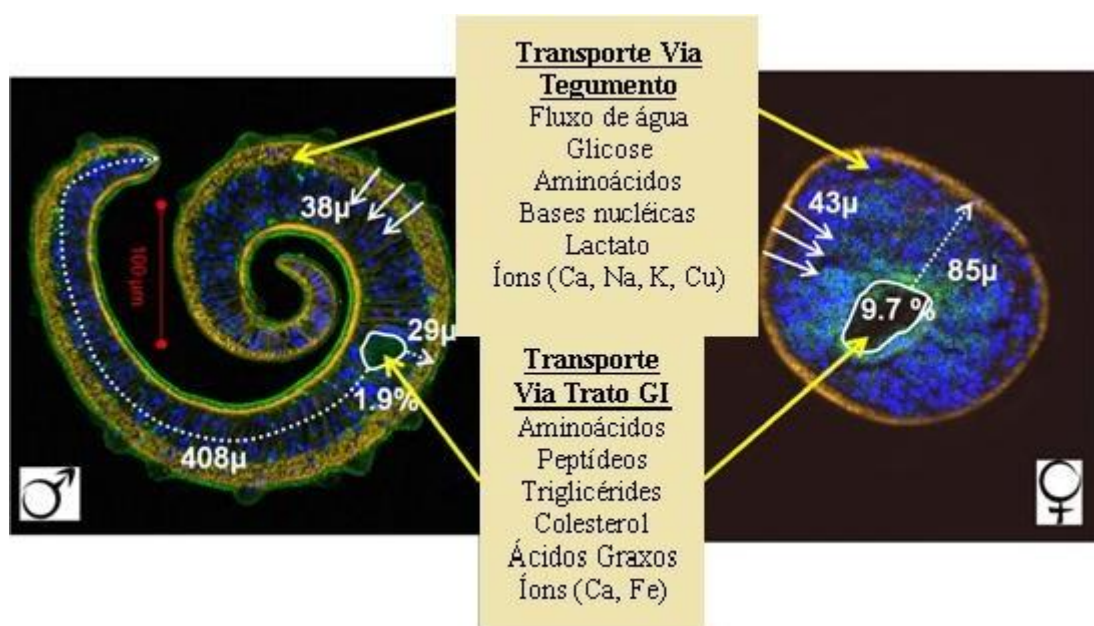
Figura 3 – Microscopia eletrônica do casal de *S. mansoni*



Fonte: Adaptado de <http://www.nhm.ac.uk/natureplus/blogs/science-news/2011/02> - Acessado em 13 de março de 2017.

O *S. mansoni* possui duas rotas de alimentação, o trato alimentar e o tegumento, sendo que cada uma é responsável pela absorção de determinados tipos de nutrientes, conforme demonstrado na figura 4.

Figura 4 - Esquema representativo da absorção de nutrientes pelo trato gastrointestinal e tegumento do *S. mansoni*

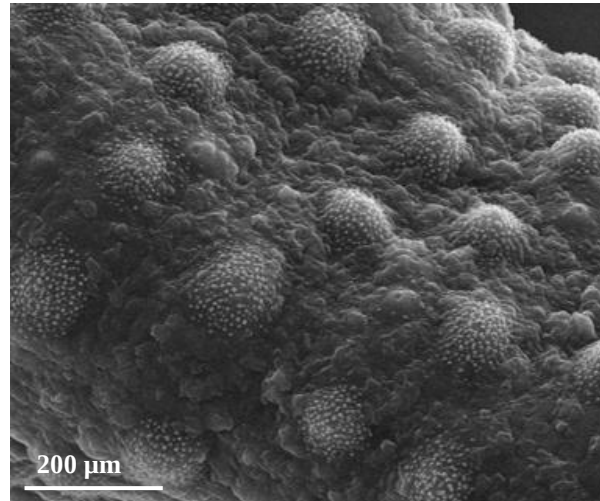


Fonte: Adaptado de SKELLY et al., 2014

O trato alimentar compreende a boca, um esôfago curto forrado com tegumento modificado e o intestino de absorção. O esôfago é demarcado em parte anterior e posterior, e possui uma glândula especializada (glândula esofágica) que libera secreções para dentro do lúmen intestinal, as quais interagem com o sangue ingerido, enquanto o intestino é revestido por uma camada epitelial, a gastroderme (LI et al., 2013b ; SKELLY et al., 2014). Macho e fêmea adultos ingerem cerca de 39.000 e 330.000 hemácias por hora, o que equivale à ingestão diária de 105 nl e 880 nl, respectivamente, de sangue total. O esôfago do parasito desempenha papel central no processamento do sangue. Secreções da glândula esofágica misturam com o sangue causando lise de eritrócitos e morte de leucócitos (LI et al., 2015). Assim, eritrócitos são rapidamente lisados após a ingestão, enquanto os leucócitos são aprisionados no lúmen posterior do esôfago (LI et al., 2013b; SKELLY et al., 2014).

Já o tegumento é essencial para a sobrevivência de vermes de *Schistosoma*. Além de desempenhar papel vital na evasão do sistema imune do hospedeiro, o tegumento é importante na aquisição de nutrientes, na excreção de produtos catabólicos e na absorção de substâncias, entre outros processos fisiológicos. O tegumento que recobre o corpo dos vermes é constituído por uma camada multicelular sincicial de alguns microns de espessura, que forma a interface entre parasito e hospedeiro (SKELLY et al., 2014). O tegumento é ligado na sua superfície basal por uma membrana plasmática, sobreposta por uma bicamada denominada membranocálice e possui diversas enzimas hidrolíticas e íons transportadores, que são responsáveis por várias funções, entre elas a absorção de nutrientes. Além disso, o tegumento é constituído por sete camadas hidrofóbicas, apresenta importante característica para permeação de fármacos, já que pode atuar com uma barreira hidrofóbica (LEOW et al., 2015). No macho, o tegumento é inteiramente revestido de espinhos e tubérculos e na fêmea é praticamente liso. As camadas tegumentares sofrem alta rotatividade, evidenciadas por invaginações da membrana, abundância de proteínas adaptadoras e vesículas de membranas (Figura 5) (LEOW et al., 2015).

Figura 5 – Tegumento de verme adulto macho de *S. mansoni*



Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP).

As principais enzimas presentes no tegumento são (FONSECA, 2012; SKELLY et al., 2014; LEOW et al., 2015):

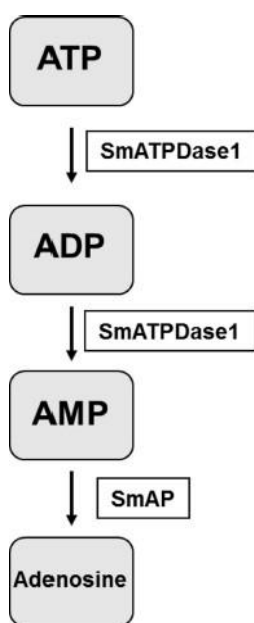
- Proteínas transportadoras de glicose (SGTP 1 e 4), as quais são responsáveis pela difusão facilitada de glicose.
- Permeases, as quais facilitam o transporte de todos os aminoácidos básicos (arginina, lisina, histidina), bem como da leucina, fenilalanina, metionina, glutamina.
- Aquaporinas, as quais são responsáveis por troca hídrica e excreção de H^+ .
- Fosfatase alcalina (SmAP), responsável pela clivagem de nucleotídeos fosfatos exógenos, gerando metabólitos desfosforilados, que são mais facilmente transportados através das membranas.
- ATP – difosfohidrolases (SmATPDase1 e SmATPDase 2), as quais são responsáveis pela hidrólise do ATP e ADP.

As *S. mansoni* ATP difosfohidrolases (EC 3.6.1.5; SmATPDases), também conhecidas como apirases ou SmATPDases, são ecto-enzimas localizadas na superfície tegumentar de *S. mansoni*, que hidrolizam uma variedade de nucleosídeos tri- e difosfatados aos correspondentes nucleosídeos monofosfatados (VASCONCELOS et al., 1996; DE CASTRO et al., 2015). A SmATPDase 1 está localizada na superfície do tegumento, enquanto a SmATPDase 2 está localizada na estrutura interna do sincício (FONSECA, 2012).

A SmATPDase1 é responsável pela quebra de ATP e o ADP em AMP (Figura 6). Assim, essa enzima auxilia o parasito contra a resposta imune do hospedeiro. Ao percorrer os

vasos sanguíneos, o verme provoca estresse local, desencadeando uma série de respostas imunológicas do hospedeiro, iniciadas pela liberação de ATP, que gera agregação plaquetária e um empecilho à sobrevivência do parasito. Assim, a lise de ATP e ADP por essas enzimas pode estar relacionada com inibição da resposta imune do hospedeiro sobre o parasito, uma vez que os subprodutos dessa lise (AMP) não provocam a agregação plaquetária em torno do parasito. Os machos possuem nível relativamente elevado de expressão SmATPDase1, o que pode ser explicado como um mecanismo para ajudar a manter um ambiente anti-inflamatório e antitrombótico em torno dele e, conseqüentemente, em torno do parceiro feminino, devido a sua presença constante no canal ginecóforo (DA`DARA et al., 2014a).

Figura 6 - Esquema representativo de quebra de ATP, ADP em AMP por enzimas do *S. mansoni*



Fonte: DA`DARA et al., 2014a.

Além disso, vermes adultos de *S. mansoni* são incapazes de sintetizar purinas e, assim, a hidrólise de ATP pelas ATP-difosfodidrolases auxilia a sobrevivência dos parasitos, pois garante nucleotídeos para a síntese de ácidos nucléicos do parasito (DA`DARA; BHARDWAJ; SKELLY, 2014b). Assim, as ATP-difosfodidrolases de *Schistosoma* são um importante alvo terapêutico para a descoberta de novos fármacos. Algumas substâncias, como a cardamonina, atuam inibindo a SmATPDase 1, que podem provocar sérios danos ao parasito (DE CASTRO et al., 2015).

O *S. mansoni* não pode sintetizar ácidos graxos e esteróis, por isso devem obtê-los através da dieta dos hospedeiro e modificá-los para suprir suas necessidades metabólicas. Nesse sentido, alguns estudos descreveram a ligação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) ao tegumento de *S. mansoni*, embora o mecanismo para essa ocorrência ainda não tenha sido completamente elucidado (TEMPONE; BIANCONI; RUMJANEK, 1997; SKELLY et al., 2014).

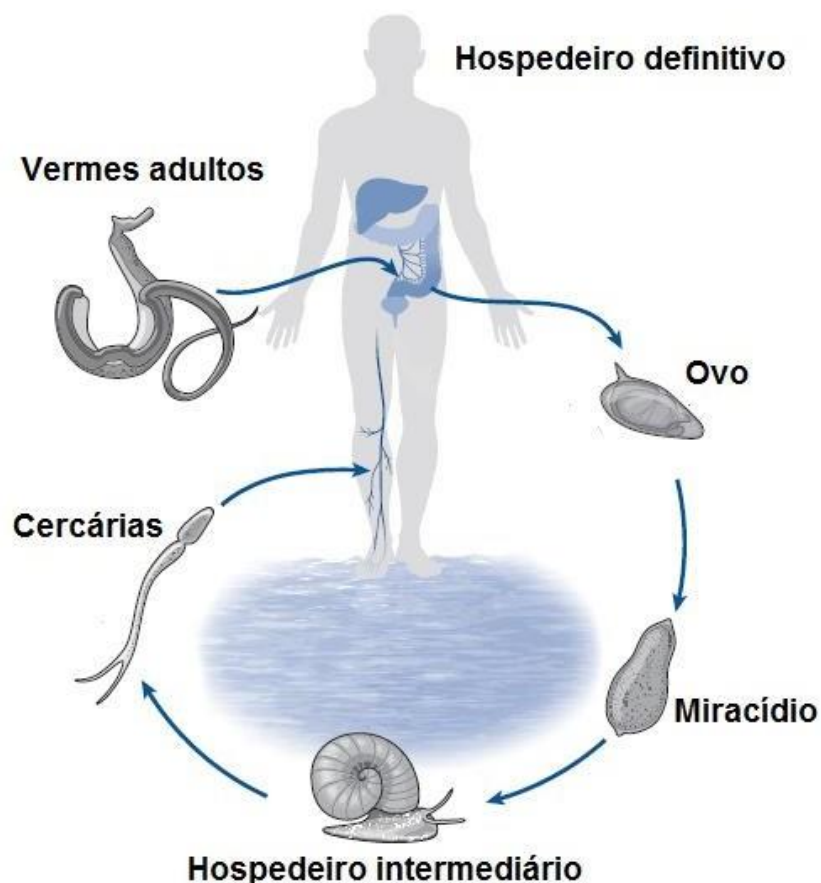
1.2.2 Ciclo de vida do *S. mansoni*

O verme adulto vive nas veias mesentéricas dos hospedeiros, principalmente na veia mesentérica inferior e migra contra corrente circulatória, gerando intenso estresse nos vasos sanguíneos. As fêmeas colocam cerca de 400 ovos por dia nas paredes de capilares e vênulas e cerca de 50% desses ovos chegam ao meio externo. Os ovos levam em torno de uma semana para se tornarem maduros e chegam ao intestino através de reações inflamatórias e perfuração venular. No intestino, os ovos são liberados juntamente com o bolo fecal. Quando alcançam a água, os ovos liberam o miracídio, que pode penetrar em diversos moluscos. Entretanto, somente os miracídios que penetrarem em moluscos do gênero *Biomphalaria* se desenvolverão. Após a penetração nos moluscos, o miracídio sofre uma sequência de transformações e perde seus cílios, recebendo o nome de esporocisto primário. Este sofre novas modificações e passa a ser chamado de esporocisto secundário. Através de reprodução assexuada, cada esporocisto origina várias larvas, as cercárias. A fase do parasito em hospedeiro intermediário, geralmente dura de 2 a 3 semanas (ROSS et al., 2002; SOUZA et al., 2011; GRYSEELS; STRICKLAND, 2012).

As cercárias atingem o meio aquático através de vesículas no tegumento do molusco geralmente nos horários de maior intensidade luminosa e temperatura da água, coincidindo com o horário de maior recreação em ambientes aquáticos por seres humanos, resultando em maior chance de contaminação (ROSS et al., 2002; SOUZA et al., 2011). As cercárias são larvas com caudas bifurcadas que penetram ativamente na pele e mucosas dos hospedeiros definitivos, através de suas ventosas, intensa movimentação e secreções histolíticas. Após a penetração, as cercárias perdem a cauda bifurcada e passam a ser chamadas de esquistossômulos. Eles penetram em um vaso sanguíneo e se dirigem ao sistema porta hepático, onde se alimentam, se transformam em vermes unissexuados, migram até a artéria mesentérica e iniciam a ovoposição (Figura 7) (ROSS et al., 2002; SOUZA et al., 2011).

Os ovos são transportados até o fígado, onde causam inflamação granulomatosa e problemas crônicos, como hepatomegalia e danos no sistema portal (ROSS et al., 2002; SOUZA et al., 2011; GRYSEELS; STRICKLAND, 2012). Além do fígado, os ovos também podem alcançar outros órgãos, como pulmões e sistema nervoso central (RICHTER, 2000). Quando amadurece nesses órgãos, há uma reação granulomatosa local, provocando lesões irreversíveis que podem desencadear problemas secundários como a hipertensão pulmonar, alterações no sistema nervoso e obstrução vascular. Esses danos são responsáveis pela cronicidade da doença e podem ocasionar a morte (LAMBERTUCCI et al., 2000; RICHTER, 2000). Os sintomas agudos da doença são caracterizados por vômitos diarreia, fraqueza e anemia (GRYSEELS; STRICKLAND, 2012).

Figura 7 – Ciclo de vida do parasito *S. mansoni*



Fonte: Adaptado de GRYSEELS, STRICKLAND, 2012.

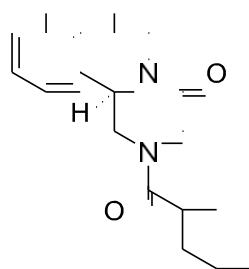
1.2.3 Tratamento da esquistossomose mansônica

O controle da esquistossomose é baseado no tratamento em larga escala de grupos populacionais em risco, acesso a água potável, saneamento melhorado, educação em higiene e controle de moluscos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a farmacoterapia como principal forma de tratamento e controle da esquistossomose (WHO, 2006; WHO, 2013). Inicialmente, o tratamento era feito com fármacos antimoniais, os quais possuem inúmeros e graves efeitos adversos, como trombocitopenia.

Posteriormente, adotou-se o uso de praziquantel (PZQ) e da oxamniquina para o tratamento da doença. Entretanto, a oxamniquina possui custo muito elevado, causa efeitos colaterais no sistema nervoso central, além de apresentar efeitos carcinogênicos e atuar somente contra a *S. mansoni*.

A quimioterapia com PZQ (Figura 8), um fármaco que foi desenvolvido na década de 1970, surgiu como a principal alternativa no tratamento da esquistossomose (VALENTIM et al., 2013; CIOLI et al., 2014; LAGO et al., 2018). Atualmente, o PZQ é o único fármaco de escolha, sendo comercializado como uma mistura racêmica de enantiômeros R e S, sendo apenas o isômero R ativo (MEISTER et al., 2014).

Figura 8 – Estrutura química do enantiômero R do PZQ



Fonte: Elaborada pela própria autora.

O PZQ atua como agonista parcial do receptor serotoninérgico 5HT_{2B} humano, regulando o tônus muscular dos vasos sanguíneos mesentéricos (CHAN et al., 2017). Além disso, promove imobilidade muscular, devido à inibição da despolarização de membrana e lesões tegumentares nos vermes adultos, facilitando a atuação do sistema imune do hospedeiro (NEVES, 2004; GRYSEELS; STRICKLAND, 2012). Todavia, o PZQ é inativo contra as formas jovens do parasito e, recentemente, há relatos demonstrando o surgimento de linhagens resistentes ao medicamento, assim como ocorrido no Brasil com a oxamniquina

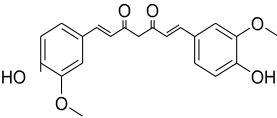
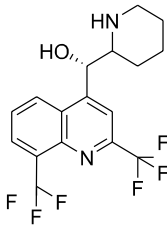
(VALENTIM et al., 2013; CIOLI et al., 2014). Além disso, o tratamento com PZQ possui significativa taxa de não adesão devido às suas reações adversas, principalmente náuseas, dores abdominais intensas e tonturas (MAGNUSSEN, 2003; LIU et al., 2008).

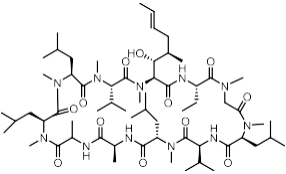
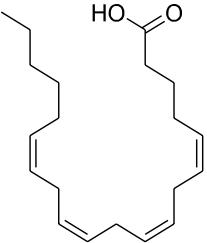
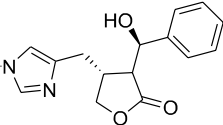
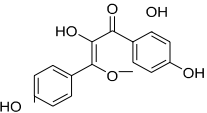
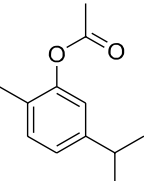
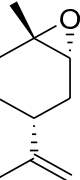
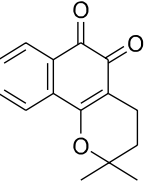
Considerando a grande quantidade de indivíduos que necessitam de tratamento, as grandes agências de saúde têm manifestado preocupações e destacaram a necessidade de novas terapias para o tratamento da esquistossomose. A necessidade de desenvolver um novo tratamento esquistossomicida pode exigir a exploração e filtragem da história quimioterapêutica para buscar as mais promissoras (WHO, 2017a; LAGO et al., 2018). Nesse sentido, os produtos naturais são considerados como potenciais fontes de produtos para o desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas (UTZINGER et al., 2011).

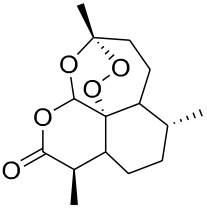
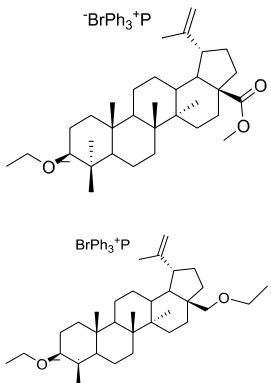
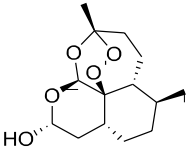
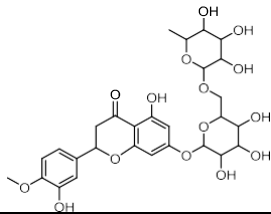
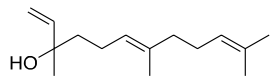
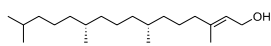
1.3 PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

Há milhares de anos as substâncias naturais vêm sendo utilizados como medicamentos pelo homem (NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015). Além disso, os fármacos oriundos de fontes naturais e derivados de produtos naturais são muito importantes atualmente, como a quinina, artemisinina e ivermectina (BUTLER, 2004; BARREIRO; BOLZANI, 2009; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015). Com relação aos produtos naturais com atividade esquistossomicida, várias substâncias naturais e seus derivados (Tabela 3) vem sendo pesquisados nos últimos anos (DE MORAES, 2015, LAGO et al., 2018).

Tabela 3 - Substâncias naturais e seus derivados ativos contra *Schistosoma*

Substância	Classe	Atividade	Referências
Curcumina 	Diarilpropanoide	Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra formas imaturas e vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	MAGALHÃES et al., 2009.
Mefloquina 	Alcaloide	Ativo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> contra formas imaturas e vermes adultos de <i>S. japonicum</i> .	XIAO; MEI; JIAO, 2009.

Substância	Classe	Atividade	Referências
Ciclosporina A 	Macrolídeo	Reduziu a carga parasitária <i>in vivo</i> de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	BUEDING; HAWKINS; CHA, 1981.
Ácido araquidônico 	Ácido graxo poli-insaturado	Ativo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> contra formas adultas e imaturas de <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i> .	EL RIDI et al., 2010.
Epiisopiloturina 	Alcaloide	Ativo <i>in vitro</i> contra formas imaturas e vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	VERAS et al., 2012.
Kaempferol 	Flavonoide	Atividade <i>in vitro</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	BRAGUINE et al., 2012.
Acetato de carvacrol 	Monoterpeno	Afetou a motilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni in vitro</i> .	DE MORAES et al., 2013c.
Epóxi Limoneno 	Monoterpeno	Mortalidade de vermes adultos de <i>S. mansoni in vitro</i> .	DE MORAES et al., 2013a.
β-Lapachona 	Quinona	Ativa contra formas imaturas e vermes adultos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>S. mansoni</i> .	AIRES ADE et al., 2014.

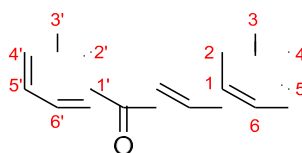
Substância	Classe	Atividade	Referências
Artemisinina 	Lactona Sesquiterpênica	Ativo contra as formas imaturas <i>in vivo</i> de <i>S. japonicum</i> .	UTZINGER et al., 2007. LIU et al., 2014.
Derivados de trifenilfosfato 	Triterpenos	Ativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	SPIVAK et al., 2014.
Dihidroartemisinina 	Derivado de artemisinina	Ativo contra as formas imaturas e vermes adultos <i>in vivo</i> de <i>S. mansoni</i> .	LIU et al, 2014.
Hesperidina 	Flavanona glicosilada	Ativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	ALLAM; ABUELSAAD, 2014. EL ASWAD; SADEK, 2014.
Nerolidol 	Sesquiterpeno	Ativo <i>in vitro</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .	SILVA et al., 2014.
Fitol 	Diterpeno	Ativo contra formas adultas de <i>S. mansoni in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	DE MORAES et al., 2014.

Entre várias classes de metabólitos vegetais com potencial esquistossomicida, estão as chalconas, as quais apresentam várias atividades biológicas importantes (SAHU et al., 2012).

1.3.1 Chalconas

As chalconas constituem uma importante classe de metabólitos secundários, principalmente por serem precursores de flavonoides e isoflavonoides, por atuarem na proteção de danos oxidativos, além de possuírem amplo espectro de atividades biológicas (SAHU et al., 2012). A estrutura química das chalconas é formada por dois anéis aromáticos, ligados por um sistema carbonílico α,β -insaturado de três carbonos (Figura 9) (SAHU et al., 2012).

Figura 9 – Estrutura química geral de chalconas



Fonte: Elaborada pela própria autora

Algumas propriedades farmacológicas vêm sendo descritas para essa classe de substâncias, como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antimalárica, leishmanicida, citotóxicas, antitumoral, hepatoprotetoras e outras (NOWAKOWSKA, 2007; SAHU et al., 2012; ROZMER; PERFÉSI, 2014).

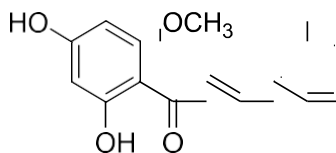
Em geral, as chalconas são substâncias que apresentam citotoxicidade elevada. Recente estudo mostrou que chalconas e seus metabólitos podem provocar danos musculares, principalmente desalinhamento miofibrilar em embriões de zebrafish (LEE et al., 2014). Contudo, a toxicidade dessas substâncias pode ser reduzida por meio de técnicas de encapsulação, as quais permitem uma liberação controlada dos fármacos evitando pico plasmático (HALEY; FRENKEL, 2008). Entre as chalconas de interesse antiparasitário, destacam-se a cardamonina e a licochalcona A.

1.3.1.1 Cardamonina

A cardamonina (Figura 10) é uma chalcona de coloração amarela, presente em vários vegetais, como os do gênero *Alpinia* (com destaque, nas espécies *Alpinia speciosa* e *Alpinia katsumadai*) e das espécies *Boesenbergia pandurata*, *Boesenbergia rotunda*, *Carya cathayensis*, *Cedrelopsis grevei*, *Combretum apiculatum*, *Comptonia peregrina*, *Desmos*

cochinchinensis, *Elettaria cardamomum*, entre outras (GONÇALVES; VALENTE; RODRIGUES, 2014).

Figura 10 – Estrutura química da cardamonina



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Entre as principais atividades biológicas dessa substância, pode-se destacar a atividade anti-inflamatória, antitumoral, hipoglicemiante, vasodilatadora, leishmanicida, antiviral, antifúngica, antibacteriana e esquistossomicida (SAHU et al., 2012; GONÇALVES; VALENTE; RODRIGUES, 2014; DE CASTRO et al., 2015).

A atividade anti-inflamatória da cardamonina foi descrita por vários autores. A atividade está relacionada com a regulação das respostas imunes com sinalização através do fator nuclear κ B (NF- κ B). Através da interferência na via NF- κ B, a cardamonina provoca a inibição da ciclooxygenase-2 (ISRAF et al., 2007). Além disso, a substância também provoca a inibição de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e a expressão da isoforma da óxido nítrico sintase, induzida por lipopolissacarídeos (JIN et al., 2007). Recentemente, a cardamonina 10 a 30 mg/kg administrada via oral, foi descrita como protetora de colites induzidas por ácido acético, pois reduziu a inflamação e estresse oxidativo (ALI et al., 2017).

Em estudo realizado por Lin e colaboradores (2012), a cardamonina apresentou toxicidade contra células cancerosas pancreáticas humanas. Recentemente, um estudo demonstrou que a substância inibiu o crescimento e induziu a apoptose em linhas celulares de câncer colorretal humano (JAMES et al., 2017). Além disso, a cardamonina também foi capaz de suprimir o alvo mamífero da rapamicina (mTOR), cuja ativação diminui a sensibilidade de células cancerosas de ovário à cisplatina sendo assim, considerada uma importante substância para estudos oncológicos futuros (NIU et al., 2018).

Ainda, Sambasevam e colaboradores (2017) demonstraram que uma dose única intraperitoneal de cardamonina nas concentrações de 3, 10, 30 mg/kg, foi capaz de inibir lesões neurológicas induzidas por vasoconstrição crônica. Wang e colaboradores (2001) mostraram que a cardamonina pode ser um vasorelaxante através de ensaios realizados nas artérias mesentéricas principais de ratos. Outro estudo evidenciou que a substância pode ser

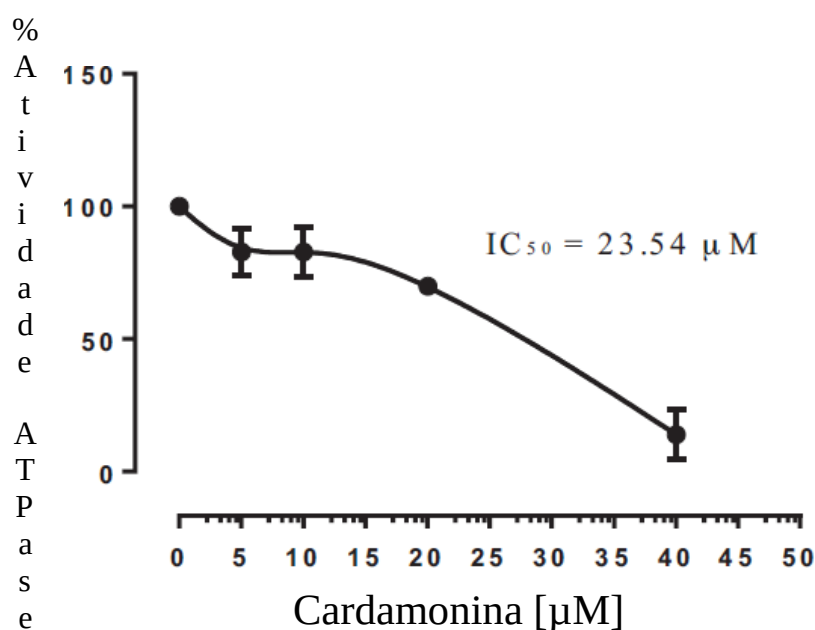
vasodilatadora devido a inibição da entrada de cálcio na célula e por estimular a saída de potássio (FUSI et al., 2010).

Outra importante atividade associada à cardamonina é a estimulação da absorção de glicose pelo transportador de glicose 4 (GLUT4), um mediador insulino-sensível da glicose, muito relevante para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (YAMAMOTO et al., 2011).

Além disso, Tewtrakul e colaboradores (2003) demonstraram que a cardamonina pode inibir a protease do HIV-1, uma enzima importante no ciclo de vida do vírus, apresentando uma IC_{50} de 115 μM . A atividade leishmanicida da chalcona foi demonstrada contra formas amastigotas de *Leishmania amazonenses*, resultando em uma IC_{50} de 8,0 μM (RUÍZ et al., 2011). A cardamonina também mostrou efeitos larvicida e contra o mosquito *Aedes albopictus* (LEE et al., 2018).

Já a atividade esquistossomicida foi demonstrada por De Castro e colaboradores (2015), os quais evidenciaram que a cardamonina (25 μM) provocou mortalidade de 100% dos parasitos adultos de *S. mansoni* em 24 horas, além de causar significativa redução de tubérculos no tegumento dos vermes. Em adicional, o mesmo estudo mostrou que a cardamonina inibiu a atividade *in vitro* da ATPase do *S. mansoni*, mostrando uma IC_{50} de 23,54 μM (Figura 11). Através de docking molecular, foi possível identificar que a cardamonina interage principalmente com SmATPDase1, por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (DE CASTRO et al., 2015).

Figura 11 – Gráfico representando a inibição da NATPDase pela cardamonina



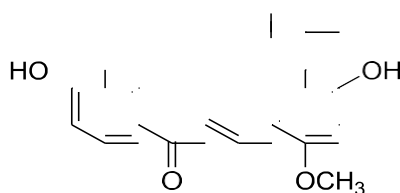
Fonte: Adaptado de DE CASTRO et al., 2015.

Apesar das propriedades esquistossomicidas descritas, a cardamonina possui citotoxicidade para algumas células, como a descrita por Aderogba e colaboradores (2012). Nesse estudo, foi observado efeito citotóxico da cardamonina em células VERO (linhagem de células de rim de macaco verde africano), com $LC_{50} = 7,29 \mu M$. Entretanto, a encapsulação desta substância pode ser uma alternativa para diminuir sua toxicidade.

1.3.1.2 Licochalcona A

A licochalcona A (Figura 12) é outra importante chalcona, de coloração laranja, extraída das raízes de *Glycyrrhiza sp* (Fabaceae), principalmente de *Glycyrrhiza inflata* (CARVALHO, 2013).

Figura 12 – Estrutura química da licochalcona A



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Existem inúmeras atividades descritas para essa chalcona, como imunomodulatória, antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antiobesidade, antibacteriana, leishmanicida, antimalárica e esquistossomicida (FU et al., 2004; FURUHASHI et al., 2005; QUAN; BAEK; CHUNG, 2012; SAHU et al., 2012).

A atividade anti-inflamatória da licochalcona A está associada a inibição da expressão e atividade da ciclooxigenase-2 em células de macrófagos de murinos, induzidas por lipopolissacarídeo (LPS). No mesmo estudo, a licochalcona A também foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido por xileno na concentração de 5 mg/orelha e o edema de pata, induzido por carragenina, nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg, via oral (CUI et al., 2007). Chu e colaboradores (2012) também mostraram que a substância é capaz de inibir a inflamação induzida por LPS *in vitro*, em células RAW 264.7, e *in vivo*, em camundongos com lesões pulmonares. Haung e colaboradores (2017) mostraram que essa chalcona pode auxiliar o tratamento da doença de Parkinson, induzida por LPS. Nesse estudo, a licochalcona A inibiu a produção estimulada por LPS de mediadores pró-inflamatórios e ativação microglial ao

bloquear a fosforilação de cinases, além de diminuir a absorção de dopamina e prevenir a ativação microglial, sendo exibido seu efeito neuroprotetor associado a efeitos anti-inflamatórios (HUANG et al., 2017).

A atividade antitumoral da licochalcona A está relacionada com a sua capacidade de induzir apoptose de células da mucosa oral humana cancerosas com IC₅₀ de 50 µM (KIM et al., 2014). Além disso, estudos comprovam que a licochalcona A foi capaz de aumentar a proliferação do fator de necrose tumoral induzido por ligante relacionado a apoptose (TRAIL, do inglês tumor necrosis factor – related apoptosis – inducing ligand), sendo tóxica para células de câncer de próstata e mostrou efeito antiproliferativo e apoptótico em células de câncer de mama de uma maneira dependente da dose e do tempo (SZLISZKA et al., 2010; KANG et al., 2017). Recentemente a licochalcona A provocou morte celular por consequência da ativação de caspases-9 e uma redução no potencial da membrana mitocondrial de células de gliomas (KURAMOTO et al., 2017).

Além disso, atividade antioxidante da substância foi demonstrada por Haraguchi e colaboradores (1998), em estudo no qual essa substância apresentou IC₅₀ < 30 µg/mL na captura de radicais livres DPPH (2,2,-difenil-1-picril-hidrazila) e inibição da formação de peróxidos. A inibição da peroxidação lipídica de microssomas e mitocôndrias hepáticas foi observada na concentração de 1 µg/mL de licochalcona A. Além dessas atividades, a licochalcona A foi descrita como interessante inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA) (KE et al., 2017).

A sua atividade antibacteriana foi descrita por vários autores, já sendo reportada a potente atividade contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 3,13 µg/mL, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. xenophi* e *M. marinum*, com CIM < 20 µg/mL (HARAGUCHI et al., 1998; HATANO et al., 2000; FRIIS-MOLLER et al., 2002). A atividade antimalárica deve-se a inibição das enzimas ubiquinol-citocromo C redutase e a succinato-ubiquinona redutase, ambas na mitocôndria do *Plasmodium falciparum* (CHEN et al., 1994). Já em ensaios leishmanicida, a licochalcona A inibiu a proliferação de promastigotas e amastigotas de *Leishmania donovani* e *L. major*, devido à inibição de uma enzima mitocondrial, a fumarato redutase (CHEN et al., 1993; KAYSER; KIDERLEN, 2001).

A atividade esquistossomicida já foi analisada anteriormente *in vitro* (CARVALHO, et al., 2013; GONCALVES et al., 2013; SOUZA et al., 2017). Esses experimentos demonstraram que a licochalcona A causa danos vitais ao parasito, com redução da motilidade e incapacidade de fixação de ventosas oral e ventral na superfície de poços

(FELICISSIMO, 2014). Já no estudo *in vitro* realizado por Souza e colaboradores (2017), 100% dos pares de vermes adultos de *S. mansoni* não apresentaram motilidade após 24h, na concentração de 12,5 μM de licochalcona A. A substância também foi eficaz para separar os casais de vermes nas concentrações de 12,5 μM -200 μM , em 6 a 12 horas e promoveu a formação de vesículas no tegumento de vermes fêmeas e machos, resultado em lise e condensação da cromatina nuclear em células vitelinas. Dessa forma, é uma substância interessante para aprimoramento de atividade esquistossomicida.

Entretanto, assim como a cardamonina, a licochacona A também apresenta sinais de toxicidade que devem ser considerados. Em estudo realizado por Xiao e colaboradores (2011), a licochalcona A mostrou-se capaz de inibir a progressão do ciclo celular e afetar o crescimento de células cancerígenas e não cancerígenas. Outros estudos mostraram que a licochalcona A provoca alterações na angiogênese tecidual e intensa hemólise em eritrócitos humanos, efeito independente da entrada de cálcio nas células (KIM et al., 2010; EGLER; LANG, 2015; ZENGER et al., 2015). Além disso, a substância apresenta citotoxicidade para células de fibroblasto do prepúcio humano (HFF) em concentrações maiores que 9 $\mu\text{g/mL}$ (SI et al., 2018). Contudo, a nanotecnologia pode ser utilizada para reduzir a toxicidade da substância.

1.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia envolve sistemas funcionais em nível molecular que abrange uma ampla gama de tópicos, comumente definida como compreensão, controle e reestruturação da matéria na ordem dos nanômetros (ou seja, menos de 100 nm) para criar materiais com propriedades e funções novas (SANCHEZ; SOBOLEV, 2010; KAUR; SINGH; KUMAR, 2012). A ideia de nanotecnologia foi introduzida em 1959, por Richard Feynman que acreditava na exploração de computação quântica para criar dispositivos em escala molecular. Em 1974, o termo nanotecnologia foi usado por Norio Taniguchi em sua pesquisa sobre os mecanismos abrasivos de usinagem de alta precisão de materiais duros e quebradiços. Kim Eric Dexler é conhecido como o pai da nanotecnologia, pois teorizou a nanotecnologia em profundidade e popularizou o assunto nos anos 70 e 80 (SANCHEZ; SOBOLEV, 2010; KAUR; SINGH; KUMAR, 2012). A nanotecnologia possui potencial para aplicação em diversas áreas, como bioengenharia, cosméticos, produtos para segurança, engenharia óptica, têxtil, alimentícia, energia, construção civil, medicinal e farmacêutica (KAUR; SINGH; KUMAR, 2012; PIZZOL et al., 2014). Porém, a exploração da nanotecnologia em escala

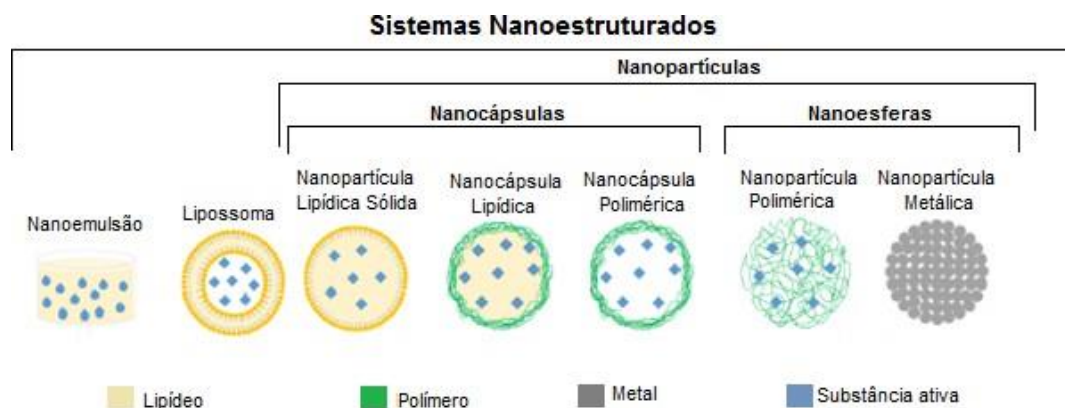
comercial ainda permanece limitada, com poucos resultados convertidos com sucesso em produtos comercializáveis (SANCHEZ; SOBOLEV, 2010). Na área da saúde, a nanotecnologia promete revolucionar o fornecimento de medicamentos, a terapia genética, o diagnóstico e muitas áreas de pesquisa, desenvolvimento e aplicação clínica (JENA et al., 2013).

As nanopartículas são a ponte efetiva entre os materiais a granel e estruturas atômicas ou moleculares. Esses sistemas são caracterizados por possuir pelo menos uma de suas dimensões menor do que 100 nm, e o tamanho da sua estrutura deve ser 1 a 1000 nm (ISO, 2008). Esse tamanho permite uma grande área superficial do material, responsável por parte das propriedades interessantes das nanopartículas. Porém, além do tamanho, outros fatores devem ser considerados para permitir que as nanopartículas interajam com o alvo biológico. Por exemplo, é necessário um revestimento que atue similarmente a uma interface biológica, como anticorpos, biopolímeros ou moléculas que tornem as nanopartículas biocompatíveis (JENA et al., 2013).

Um dos objetivos da nanotecnologia é transportar substâncias até o local de ação e entregá-los em uma dose terapêutica efetiva, ou seja, aumentar a biodisponibilidade das substâncias ativas (BARUA; MITRAGOTRI, 2014). Em relação à terapia convencional, os sistemas nanoestruturados possuem importantes vantagens, como a dissolução de substâncias acima do limite de solubilidade, maior biocompatibilidade, direcionamento de moléculas, proporcionando maior segurança, incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, além de poderem ser administradas na circulação sistêmica sem problemas de bloqueio de capilares (WANG et al., 2009; JENA et al., 2013; SOLDATI, 2015). Sendo assim, com o uso da nanotecnologia é possível utilizar doses menores, modular a ação terapêutica e a permeabilidade de substâncias através de membranas (VERMA et al., 2003). No entanto, apesar da promessa de nanotecnologia em todas as doenças, há uma série de desvantagens para usar essa tecnologia de entrega de substâncias ativas. As substâncias entregues a partir de entidades em nanoescala podem comportar-se de forma diferente em comparação a forma normal ou convencional (JAHANGIRIAN et al., 2017).

As nanopartículas podem ser utilizadas como uma superfície conveniente para montagem molecular em forma de nano-vesícula, forma esférica, em forma de placa e outras. Na área farmacêutica, as formas mais comuns são nanoemulsões, lipossomas e nanopartículas (Figura 13) (JENA et al., 2013; TOMIOTTO-POLLISSIER et al., 2017).

Figura 13 – Principais sistemas nanoestruturados utilizados na área farmacêutica



Fonte: Adaptado de TOMIOTTO-POLLISSIER et al., 2017.

As nanoemulsões consistem em um sistema coloidal de partículas nanométricas contendo a substância ativa, são dispersões bifásicas finas, em que uma fase é intimamente dispersa na outra (DE ARAÚJO et al., 2007). Possuem as vantagens de melhorarem a biodisponibilidade de fármacos, geralmente não são muito tóxicas, permitem incorporação em muitas formulações (espumas, cremes, líquidos e pulverizadores), permitem solubilizar substâncias lipofílicas, são úteis para mascarar gosto e menor quantidade de energia é requerida para fabricação (PIZZOL et al., 2014; JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; TOMIOTTO-POLLISSIER et al., 2017).

Os lipossomas são vesículas esféricas fechadas, consistindo em uma bicamada lipídica e núcleo aquoso, onde as substâncias ativas podem ser encapsuladas. Entre as principais vantagens desse nanosistema, pode-se citar o aumento da eficácia do fármaco, baixa toxicidade, biocompatibilidade, elevada capacidade de biodegradar, redução da exposição de tecidos ao agente encapsulado, redução da toxicidade e capacidade de se acoplar em ligantes específicos, permitindo segmentação. Em relação as suas desvantagens, pode-se citar a baixa solubilidade, possibilidade do fosfolípideo sofrer oxidação e hidrólise como reação e liberação de substâncias previamente à administração (AKBARZADEH et al., 2013; PIZZOL et al., 2014).

As nanopartículas são classificadas em nanoesferas, onde o ativo pode ser adsorvido na superfície ou aprisionado na matriz, e em nanocápsulas, que possuem uma camada e um núcleo aquoso ou lipídico, podendo a substância ativa estar dissolvida no núcleo ou adsorvida em sua superfície. Sua composição pode envolver lipídeos (nanopartículas lipídicas), polímeros (nanopartículas poliméricas) ou metais (nanopartículas metálicas) (PIZZOL et al., 2014; TOMIOTTO-POLLISSIER et al., 2017). As nanopartículas metálicas são vantagens

por possuírem efeito biológico sem precisar de fármacos e podem alterar propriedades físicas, químicas e biológicas de tecidos devido a sua relação superfície-volume. Geralmente são desenvolvidas com alguns produtos tóxicos, o que limita o seu uso. Além disso, a síntese dos seus componentes pode ser um processo com custo muito elevado (ZHANG et al., 2016).

As nanopartículas poliméricas possuem o núcleo ou superfície polimérica, sendo utilizados polímeros biodegradáveis na maioria das vezes. Permitem a liberação controlada e sustentada de fármacos, aumentando a eficácia terapêutica, reduzindo efeitos colaterais, podem ser utilizadas por várias vias de administração, incluindo oral, nasal, parenteral e intraocular, e permitem anexar ligantes específicos à sua superfície. Em relação a suas desvantagens está a dificuldade de obter o material seco devido à agregação de partículas, além da utilização de polímeros não biodegradáveis (JAWAHAR; MEYYANATHAN, 2012).

As nanopartículas lipídicas podem apresentar o lipídeo líquido (nanoemulsões e nanocarreadores lipídicos) ou sólido (nanopartículas lipídicas sólidas – NLS) (SOLDATI, 2015). São partículas que permitem a liberação controlada de substâncias, são bem toleradas, permitem a entrega de substâncias em locais específicos do organismo devido a possibilidade de adição de ligantes específicos, reduzem os efeitos colaterais por permitirem a liberação controlada de substâncias ativas, possuem facilidade de produção em escala industrial, protegem substâncias ativas contra degradação, podem ser esterilizadas por filtração, permitem a liofilização para remoção do excesso de água utilizado na fabricação e não utilizam quase nenhum ou nenhum solvente orgânico no preparo (depende da técnica de preparo utilizada) (MUKHERJEE; RAY; THAKUR, 2009; MEHNERT; MADER, 2012; YADAV et al., 2014). Entre as suas desvantagens, pode-se citar principalmente a sua limitada capacidade de carga de fármacos, a possível liberação do fármaco durante a armazenagem e aumento do tamanho da partícula devido à agregação. A possível liberação de fármacos durante a estocagem está relacionada com a recristalização dos lipídeos em formas menos energéticas (forma β), expulsando as substâncias encapsuladas (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012). As nanopartículas lipídicas têm adquirido significativa importância na área farmacêutica devido a maioria dos lipídeos utilizados serem biocompatíveis e de composição semelhante à fisiológica (SOLDATI, 2015).

A nanotecnologia já foi empregada para o tratamento de algumas parasitoses, como a leishmaniose, malária e toxoplasmose (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007). Para a esquistossomose, alguns estudos vêm sendo desenvolvido durante os últimos anos e obtendo resultados promissores, porém em menor quantidade. Conforme demonstrado na tabela 4, a

maioria dos estudos com nanocompostos para tratar a esquistossomose utilizou o praziquantel como substância ativa e estudos envolvendo alternativas para o tratamento ainda são reduzidos.

Tabela 4 - Estudos envolvendo nanotecnologia para tratamento de esquistossomose

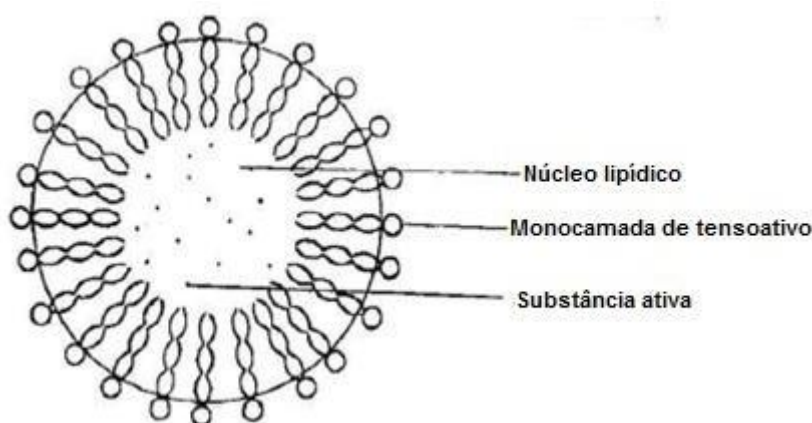
Sistema nanoestruturado	Substância encapsulada	Resultados	Referências
Nanoemulsão	Ácido 2-(butilamino)-1-fenil-1-etanotiosulfurico	A nanoemulsão possibilitou maior biodisponibilidade da substância, quando comparado com a substância livre	ARAÚJO et al., 2007.
	Epiisopiloturina	A nanoemulsão aumentou a biodisponibilidade da substância após administração oral, melhorou a atividade esquistossomicida e melhorou a farmacocinética da substância.	LIMA et al., 2018.
Lipossomas	Tartar emético	Os lipossomas reduziram significativamente a toxicidade do tratamento e reduziram a carga parasitária em 82% (via intraperitoneal) em ratos infectados com <i>S. mansoni</i> .	MELO et al., 2003.
	Praziquantel	Os lipossomas com PZQ apresentaram maior atividade esquistossomicida contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , quando comparados com o PZQ livre em ensaio <i>in vivo</i> .	MOURÃO et al., 2005.
	α -D-glucano sulfatado	Lipossomas reduziram significativamente a quantidade de granulomas hepáticos, causados por ovos de <i>S. mansoni</i> , em um ensaio <i>in vivo</i> .	ARAÚJO et al., 2011.
	Praziquantel	Os lipossomas apresentaram maior atividade esquistossomicida <i>in vivo</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , reduzindo a carga parasitária em 68%, granulomas hepáticos em 98,4% em relação ao grupo controle não tratado. Foi observada atividade superior dos lipossomas, quando comparada a substância livre.	FREZZA et al., 2013.
	Epiisopiloturina	Os lipossomas apresentaram boa capacidade para a liberação do fármaco. Em um ensaio <i>in vitro</i> , provocaram a mortalidade de 100% dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , além de provocarem danos no tegumento do parasito.	GUIMARÃES et al., 2014.
	Praziquantel	Em estudo <i>in vivo</i> , os lipossomas apresentaram maior atividade esquistossomicida contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , reduzindo em 48,0% a carga parasitária e o número de ovos em 83,3% em relação a outros tratamentos.	FREZZA et al, 2015.

Sistema nanoestruturado	Substância encapsulada	Resultados	Referências
Nanocápsulas poliméricas	Praziquantel	As nanopartículas com PZQ mostraram boa atividade <i>in vitro</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , mostrando que a atividade do PZQ permanece inalterada quando o mesmo está encapsulado nas nanopartículas, não comprometendo a eficiência do fármaco.	FONSECA, 2012.
Nanoesferas poliméricas	Curcumina	As nanoesferas causaram 100% de mortalidade <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em 24 horas, na concentração de 50 μ M, além de danos no tegumento do parasito.	LUZ et al., 2011.
Nanocápsulas lipídicas	Miltefosina	As nanocápsulas apresentaram melhor atividade via oral contra <i>S. mansoni</i> , maior redução da carga de vermes e maior proteção hepática quando comparadas com a substância livre.	EISSA et al., 2015.
Nanopartículas Lipídicas Sólidas	Praziquantel	As NLS aumentaram a biodisponibilidade do PZQ e aumentou o tempo de meia vida do medicamento após administração oral, subcutânea e intramuscular em camundongos.	XIE et al., 2010a.
	Praziquantel	Na cultura <i>in vitro</i> de <i>S. mansoni</i> , as NLS foram mais eficazes do que o PZQ livre, causando a morte dos vermes adultos em tempo menor, nas doses de 25 e 50 μ g/mL. O encapsulamento do PZQ diminuiu a toxicidade em células HepG2 em comparação com o PZQ livre.	SOUZA et al., 2014.
	Praziquantel	As nanopartículas apresentaram melhor atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> e menor toxicidade quando comparadas com PZQ livre.	KOLENYAK-SANTOS et al., 2015.

1.4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas

Existem relatos do desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) desde 1990. Essas nanopartículas apresentam um tamanho coloidal entre 50 e 1000 nm e carregam fármacos hidrofóbicos e, em menor capacidade de carga, fármacos hidrofílicos. Geralmente, elas possuem um núcleo hidrofóbico sólido (lipídeo) e possuem uma monocamada de revestimento de tensoativo (Figura 14). O fármaco pode estar no núcleo lipídico ou disperso na matriz (PIZZOL et al., 2014). A grande vantagem de manter o lipídeo sólido é que assim ocorre menor mobilidade dos ativos no núcleo das NLS, permitindo maior controle da liberação das substâncias encapsuladas. Em geral, o ponto de fusão dos lipídeos empregados nas NLS são os gatilhos de liberação desse sistema, ou seja, quando o lipídeo funde, permite a liberação das substâncias encapsuladas (MEHNERT; MADER, 2012).

Figura 14 - Estrutura de nanopartícula lipídica sólida



Fonte: Adaptado de YADAV et al., 2014.

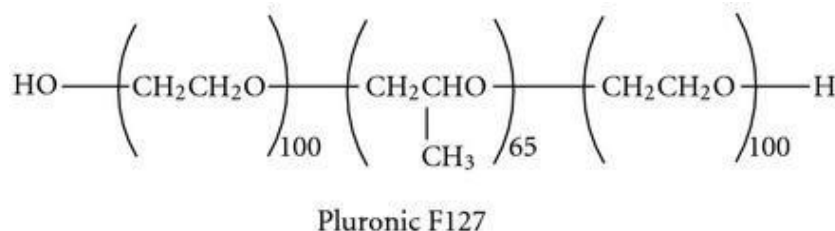
Os lipídeos utilizados nas NLS podem ser naturais ou sintéticos, incluindo triglicerídeos (tricaprina, trilaurina, trimiristina, tripalmitina, triestearina), tipos de gordura, monoestearato de glicerila, palmitato de cetila, ácidos graxos (por exemplo, ácido esteárico, ácido palmítico, decanóico), esteroides (por exemplo, colesterol) ou ceras (por exemplo, cera microcristalina de parafina, cera de éster de baleia, palmitato de cetila) (PIZZOL et al., 2014; YADAV et al., 2014). Quando constituídos por um único tipo de ácido graxo, os lipídeos cristalizam rapidamente e formam sistemas com poucos locais para acomodar os fármacos. Sendo assim, quanto maior a organização do sistema lipídico, menor é a taxa de encapsulação

do fármaco, uma vez as substâncias ativas serão expulsas da matriz durante a cristalização. Lipídeos complexos como manteigas naturais, constituem uma mistura de vários tipos de ácidos graxos e o sistema é mais desorganizado, aumentando a chances de acomodação do fármaco entre os espaços lipídico (MULLER; MADER; GOHLA, 2000; MULLER et al., 2007).

A manteiga de *Theobroma grandiflorum*, popularmente conhecida como cupuaçu, é obtida através do processamento de sementes, amplamente utilizada em cosméticos e foi utilizada por Soldati (2015) como núcleo lipídico para preparar nanopartículas de resveratrol destinadas aplicação tópica. Essa manteiga é uma mistura complexa de ácidos graxos saturados e insaturados, o que confere um baixo ponto de fusão e grande quantidade de espaço para acomodação de substâncias (YANES et al., 2017). Além disso, a sua composição de ácidos graxos é compatível com as propriedades biológicas, sendo mais uma vantagem do uso da manteiga de cupuaçu no preparo de NLS (HURST et al., 2002).

Os tensoativos utilizados no preparo de NLS incluem os fosfolipídeos (lecitina de soja, lecitina de ovo), fosfatidilcolinas (lecitina, Epikuron® 170, Epikuron® 200), Pluronic® F 68, 127, colatos (por exemplo, colato de sódio, glicocolato de sódio, taurocolato de sódio, taurocolato de sódio-desoxi), polissorbato 20, polissorbato 60, polissorbato 80 e outros (PIZZOL et al., 2014; YADAV et al., 2014). Em especial, o Pluronic® F-127 é um tensoativo não iônico, derivado de polióxidoetileno e polioxidopropileno, que forma estruturas micelares em solvente aquoso, devido à diferença de hidrofobicidade entre os seus monômeros (Figura 15). A organização micelar ocorre de forma que a porção polioxidopropileno se localize no núcleo e o polióxidoetileno, na superfície (ALMEIDA et al., 2012).

Figura 15 - Esquema ilustrativo do monômero de Pluronic F-127



Fonte: BUTT et al., 2012.

Existem várias técnicas de preparo de NLS e a maioria interfere em sua forma final. As principais formas de preparo incluem homogeneização sob alta pressão à quente ou a frio, ultrassonicação, métodos baseados em microemulsão e técnicas de precipitação da dispersão.

A homogeneização por alta pressão possui a vantagem de ser uma técnica com boa reprodução e não utiliza solventes orgânicos. Os homogeneizadores de alta pressão empurram o líquido com pressão elevada (100-2000 bar) através de uma abertura estreita (na gama de alguns micras). Então, o fluido acelera em uma distância muito curta em alta velocidade (mais de 1.000 km/h) (YADAV et al., 2014). Na técnica a frio, o lipídeo é utilizado no estado sólido misturado com a substância ativa (congelado e moído), em seguida misturado em solução de tensoativos e então, submetidos à homogeneização. Na técnica a quente, o lipídeo fundido e a substância ativa são misturados, adicionados em solução de tensoativos e submetidos à homogeneização (DEMIREL et al., 2001).

A ultrassonicação gera nanopartículas devido a ondas de baixa e alta pressão que se alternam e provocam cavitação nos líquidos. Uma das desvantagens da técnica é que a temperatura aumenta conforme maior tempo de exposição às ondas ultrassônicas (SOLDATI, 2015).

As NLS produzidas pela técnica de microemulsão são obtidas pela mistura de um sistema de duas fases. Geralmente, a microemulsão quente, formada por lipídeos de baixo ponto de fusão, é dispersa em água fria. É um processo que envolve grande quantidade de água, mas pode ser removida por ultracentrifugação ou liofilização (YADAV et al., 2014).

Outra técnica utilizada é a precipitação da dispersão, que se caracteriza pela necessidade de solventes orgânicos. Os lipídeos são dissolvidos em solvente orgânico e a solução é emulsionada em fase aquosa. Após a evaporação do solvente orgânico, o lipídeo precipita, formando as nanopartículas (YADAV et al., 2014).

A caracterização de NLS é uma etapa muito importante, pois além de pequenas, o sistema coloidal é muito complexo. A caracterização deve levar em consideração os parâmetros que podem interferir na estabilidade e na liberação das nanopartículas. Vários ensaios podem ser realizados para caracterizar um sistema de NLS, entretanto os mais comuns são a análise de tamanho médio de partícula, potencial zeta, avaliação morfológica por técnicas de microscopia, eficiência de encapsulação, estudo de liberação e estudo de estabilidade no decorrer do tempo (YADAV et al., 2014).

O tamanho médio da partícula pode ser medido por diversas técnicas, como técnicas de microscopia, mas a mais comum é a DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering*). Essa técnica, também conhecida por espectroscopia de correlação de fótons, utiliza o movimento

browniano das partículas e o espalhamento do feixe de luz dinâmica provocado por esse movimento. De acordo com o movimento browniano, as partículas pequenas se movem mais rapidamente em um sistema coloidal. Na técnica de DLS, um feixe de luz é emitido lançando luz em todas as direções do coloide. Como as partículas menores se movimentam mais rapidamente, dispersam menos luz do que as partículas maiores. As flutuações de intensidade de luz espalhada gerada pela movimentação das partículas são medidas em um correlator, que permite gerar informações sobre o tamanho de partículas através da equação de Stokes-Einstein (HOFFMAN et al., 1997; HEURTAULT et al., 2003; YADAV et al., 2014):

Onde, d é o raio hidrodinâmico, K é a constante de Boltzman, T é a temperatura, η é a viscosidade, D é o coeficiente de difusão.

Além do tamanho das partículas obtido pelo diâmetro hidrodinâmico médio, a técnica também fornece o valor de PDI (do inglês, *Polydispersion Index*). Esse índice fornece informações sobre a homogeneidade da amostra, podendo variar de 0 (amostra totalmente homogênea) a 1 (amostra com distribuição aleatória). Um sistema homogêneo ideal deve apresentar valores de PDI menores que 0,3 (LIU; WU, 2010).

O potencial zeta é medido pela mobilidade eletroforética (mobilidade em um campo de tensão). A técnica fornece informações sobre a carga superficial das partículas, que afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, podendo gerar uma concentração de contra-íons elevada na superfície. Quando um campo elétrico é aplicado na solução, cada partícula se move em direção a um eletrodo de carga oposta. Essa mobilidade eletroforética é chamada de potencial zeta. Quanto maior a carga superficial de uma partícula, mais rápido ela irá se mover para o eletrodo oposto. Através dessa medida, é possível prever o efeito da carga da partícula em fenômenos de agregação e sedimentação (HUNTER, 1993). Vários fatores podem alterar o potencial zeta, como a concentração de tensoativos, pH e força iônica. Os valores de potencial zeta podem ser positivos ou negativos, o que depende da carga superficial da partícula e da carga do tensoativo que estará no envoltório da nanopartícula. Valores, em módulo, acima de 30 mV já possuem estabilidade por si só. Entretanto, em alguns sistemas coloidais, tensoativos não iônicos podem não contribuir para o valor do potencial zeta, mantendo ainda assim a estabilidade coloidal, devido ao impedimento estérico provocado por suas cadeias monoméricas. Além disso, algumas NLS mantêm a carga negativa do potencial zeta, devido à presença dos ácidos graxos (dos lipídeos utilizados núcleo) desprotonados na superfície da nanopartícula (WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) são técnicas importantes para a caracterização de NLS, pois permitem a observação direta das nanopartículas, podendo caracterizá-las quanto ao diâmetro e o formato das partículas (YADAV et al., 2014).

A eficiência de encapsulação determina se um sistema é ou não adequado para carrear as substâncias de interesse. Uma técnica amplamente utilizada é a ultrafiltração-centrifugação associada a técnicas analíticas quantitativas, como espectrofotometria. A ultrafiltração-centrifugação se baseia no método de utilização de uma membrana microporosa, submetida à centrifugação em elevada rotação, visando a separação de substância livre e de substância encapsulada. A quantidade de substância livre é calculada por várias técnicas analíticas no ultrafiltrado, como CLAE-UV/Vis (SOLDATI, 2015).

A taxa de liberação *in vitro* permite conhecer como a partícula se comporta em relação a liberação da substância encapsulada. Esse ensaio é essencial, pois permite uma correlação do *in vitro* com o que poderá ocorrer *in vivo* e assim conhecer melhor o desempenho da formulação, porém ainda hoje não existe consenso entre os pesquisadores sobre qual o melhor método para esse estudo. As técnicas mais utilizadas são o método da diálise, método da diálise reversa, ultracentrifugação, ultrafiltração e adaptação de aparatos de células de difusão, seguidas por quantificação por métodos analíticos, como espectroscopia por ultra-violeta (SOPPIMATH et al., 2001; ZAMBITO; PEDRESCHI; DI COLO, 2012; MODI; ANDERSON, 2013).

O método de diálise consiste em acondicionar as nanopartículas em uma membrana de diálise com poro reduzido, por exemplo, de 12.000 Da, que impede a passagem da nanopartícula para o meio receptor e permite a passagem substância liberada. A grande vantagem de usar essa técnica é que a etapa para separar a substância livre da substância encapsulada é eliminada em vários tempos de um estudo cinético. Além disso, a pressão externa aplicada para a separação em outros métodos, pode perturbar o equilíbrio e a separação incompleta pode levar a erros de medição significativos. A desvantagem do uso da diálise dinâmica é que o valor medido é uma liberação aparente, já que o resultado é equivalente ao transporte da substância em duas barreiras em série, sendo que a taxa obtida pode não refletir necessariamente a taxa de liberação das substâncias das nanopartículas (MODI; ANDERSON, 2013). Em ensaios de liberação *in vitro*, é importante que a condição *sink* seja atendida o tempo todo, para evitar que ocorra uma saturação e alteração da velocidade de dissolução (D'SOUZA; DELUCA, 2006).

Algumas pesquisas evidenciaram as vantagens da utilização das NLS para tratamento de esquistossomose, principalmente para a entrega de substâncias no tegumento do verme adulto (SOUZA et al., 2014; XIE et al., 2010a). Devido à característica hidrofóbica do tegumento em associação com a característica lipídica das nanopartículas é esperado e já relatado em literatura, a capacidade de nanopartículas lipídicas aderirem ao tegumento (EISSA et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral pretendido com esse trabalho foi o desenvolvimento de formulação de nanopartículas lipídicas sólidas para o tratamento de esquistossomose mansônica utilizando cardamonina e licochalcona A, potenciais agentes esquistossomicidas frente ao *S. mansoni*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar a cardamonina e a licochalcona A;
- Desenvolver NLS contendo cardamonina e licochalcona A;
- Caracterizar as NLS obtidas por potencial zeta, tamanho da partícula, taxa de encapsulação, perfil de liberação *in vitro* e estabilidade;
- Avaliar a toxicidade *in vitro*, em células do hospedeiro, das NLS obtidas;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* e realizar a análise morfológica do tegumento dos parasitos adultos de *S. mansoni*, frente às substâncias livres e encapsuladas nas NLS;
- Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* da licochalcona A livre e encapsulada em NLS, por via oral e intraperitoneal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os procedimentos realizados neste trabalho foram desenvolvidos nos laboratórios do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN), CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA), EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora, Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Farmácia da UFJF, Departamento de Química da UFJF e Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- NIPPAN:

- Balança analítica: marca Marte, modelo BL320H;
- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220;
- Bomba a vácuo: marca Primatec, modelo 132;
- Rotaevaporador: marca Buchi, modelo RII;
- Bomba a vácuo: marca Buchi, modelo V-700;
- Banho ultratermostático: marca Cientec, modelo CT-281-28;
- Estufa com circulação e renovação de ar: marca Solab, modelo SL102;
- Lanterna de emissão de radiação ultravioleta: marca Boitton.
- Coluna de vidro para cromatografia à vácuo de 10 cm de diâmetro,

contendo placa de 2,5 cm de espessura.

- CentralBio:

- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2;
- Microcentrífuga: marca Kasvi;
- Bomba a vácuo: marca Gast, modelo DOA-P704-AA;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência de bomba binária: marca Waters, modelo 1525; injetor automático: marca Waters, modelo 2707; Detector de arranjos de diodos (DAD): marca Waters, modelo 2998.
- Cromatógrafo de fase gasosa GCEM-QP2010 Plus: marca Shimadzu, modelo QP2010 Plus; injetor automático: AOC-20i; Detector de Espectrômetro de massas.

- Microscópio de fluorescência ZEISS, Axio Scope A1.
- NIQUA:
 - Homogeneizador SilentCrusher M, Heidolph.
 - Sonda de Ultrassom Vibra Cell, Sonics.
- Laboratório de Bioatividade Celular e Molecular
 - Centrífuga refrigerada de bancada Nova Técnica, NT 815.
 - pHmetro Hanna, modelo HI 2210.
 - Espectrofotômetro SP 1105, Bel Photonics.
- EMBRAPA Gado de Leite:
 - Zetasizer Nano, Malvern.
- Laboratório de Cultura Celular:
 - Centrífuga Eppendorf® 5810R.
- Instituto de Ciências Biológicas da UFJF:
 - Microscópio Confocal Leica Microsystems, TSC SP5.
- Departamento de Química da UFJF:
 - RMN Brucker Avance III, 500 MHz.

3.2 MATERIAIS QUÍMICOS UTILIZADOS

Foram utilizados solventes de grau P.A. das marcas Vetec, Cromato Produtos Químicos LTDA, Quimis, Isofar e Alphatec. Para realização do processo de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizados água ultra purificada e metanol grau HPLC da marca J. T. Baker.

Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatoplasmas de sílica gel 60 GF254 (Merck). A revelação das mesmas foi obtida por meio de irradiação no ultravioleta (UV) (254 e 366 nm), bem como do revelador químico, solução de anisaldeído sulfúrico. Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H utilizou-se clorofórmio deuterado da marca Cambridge Isotope Laboratories.

Para realização de CLAE utilizou-se coluna analítica de fase reversa (Sun Fire C₁₈; 4,6 x 250 mm; 5 µm), na presença de pré-coluna (Sun Fire C₁₈; 4,6 x 20 mm; 5 µm) e coluna semi-preparativa de fase reversa (SunFire C₁₈, 10 x 250 mm, 5 µm), na presença de pré-coluna (SunFire C₁₈ 10 x 20 mm, 5 µm). Para cromatografia de fase gasosa (CGM) utilizou-se

coluna capilar Restek Rtx-5MS de sílica fundida (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano), 30 m de comprimento, diâmetro interno de 25 mm e 0,25 µm de espessura do filme.

Para o preparo de nanopartículas, foi utilizada manteiga natural de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu) e Pluronic® F-127 da Sigma, ambos gentilmente cedidos pelo professor Dr. Frederico Pittella em parceria com o Laboratório NIQUA. Além disso, foram utilizados o corante lipofílico vermelho do nilo (Sigma), falcon Amicon (MWCO) com membrana filtrante de 30 KDa, da marca Millipore (Alemanha) e membrana para diálise da marca Servapor (12000 a 14000 MWCO). Para isolamento das substâncias, foram utilizados padrões da cardamonina e licochalcona A, cedidos pelos membros do NIPPAN (CARVALHO, 2013; DE CASTRO et al., 2015). Para o isolamento da licochalcona A foi utilizado extrato seco comercial das raízes de *G. inflata* e sílica (40 a 63 µm), da marca Merck.

3.3 ISOLAMENTO DA CARDAMONINA

3.3.1 Obtenção de extrato bruto das raízes de *A. speciosa*

Raízes de *A. speciosa* Schum (Figura 16), conhecida popularmente como “Pacová Colônia”, foram coletadas no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A exsicata da espécie foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ – da UFJF, sob o número de tombo 49199.

Figura 16 – *A. speciosa*, popularmente conhecida como Pacová Colônia



Fonte: Elaborado pela própria autora.

As raízes foram cortadas finamente e secas à temperatura ambiente e à sombra. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas, rendendo um total de 234,50 g de pó. O material foi submetido à maceração com metanol (MeOH), seguida de rotaevaporação, gerando o extrato bruto metanólico das raízes de *A. speciosa* (EAS-L, 30 g).

A presença da cardamonina, já descrita nessa espécie por Gonçalves e colaboradores (2014), foi verificada no extrato bruto por meio de CCD, utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila (1:1 v/v).

3.3.2 Fracionamento do EAS-L por partição líquido-líquido

O extrato EAS-L (30 g) foi solubilizado em 100 mL de uma mistura hidrometanólica (9:1 v/v) com auxílio de agitador magnético. A solução foi filtrada à vácuo e, em seguida, particionada (Figura 17) com hexano, previamente saturado com água (3 vezes). Foi obtida uma fração hexânica (FHAS-L) (1,05 g), a qual foi seca com adição sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e, posteriormente filtrada e concentrada em rotaevaporador à temperatura de 50 ± 5 °C.

Figura 17 – Partição líquido-líquido do extrato metanólico de raízes de *A. speciosa*



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Em seguida, a fração aquosa remanescente foi recolhida e submetida à partição com diclorometano, previamente saturado com água (3 vezes). A fração orgânica (FDAS-L, 1,78 g) foi concentrada em rotaevaporador à temperatura de 50 ± 5 °C. Para a verificação da presença de cardamonina nas frações orgânicas, foi realizada CCD, utilizando fase móvel de hexano e acetato de etila (1:1 v/v) acidificada com ácido acético glacial.

3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.3.3.1 *Análise qualitativa do extrato bruto e fração FDAS-L por CLAE*

O extrato bruto metanólico (EAS-L) foi analisado por CLAE, sendo que o gradiente de eluição consistiu de fase binária composta de água (acidificada com ácido acético glacial) e MeOH em um gradiente linear de 40 a 100% de MeOH em 60 minutos e mantendo um sistema isocrático de 100% de MeOH até 65 minutos. O fluxo utilizado foi 1 mL/min, o volume de injeção foi 30 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A análise de dados foi feita a partir do *Software* Empower 3, no qual a partir da varredura (190 – 400 nm) foi selecionada o comprimento de onda de 345 nm para leitura. O padrão de cardamonina e a fração FDAS – L foram analisados nas mesmas condições descritas.

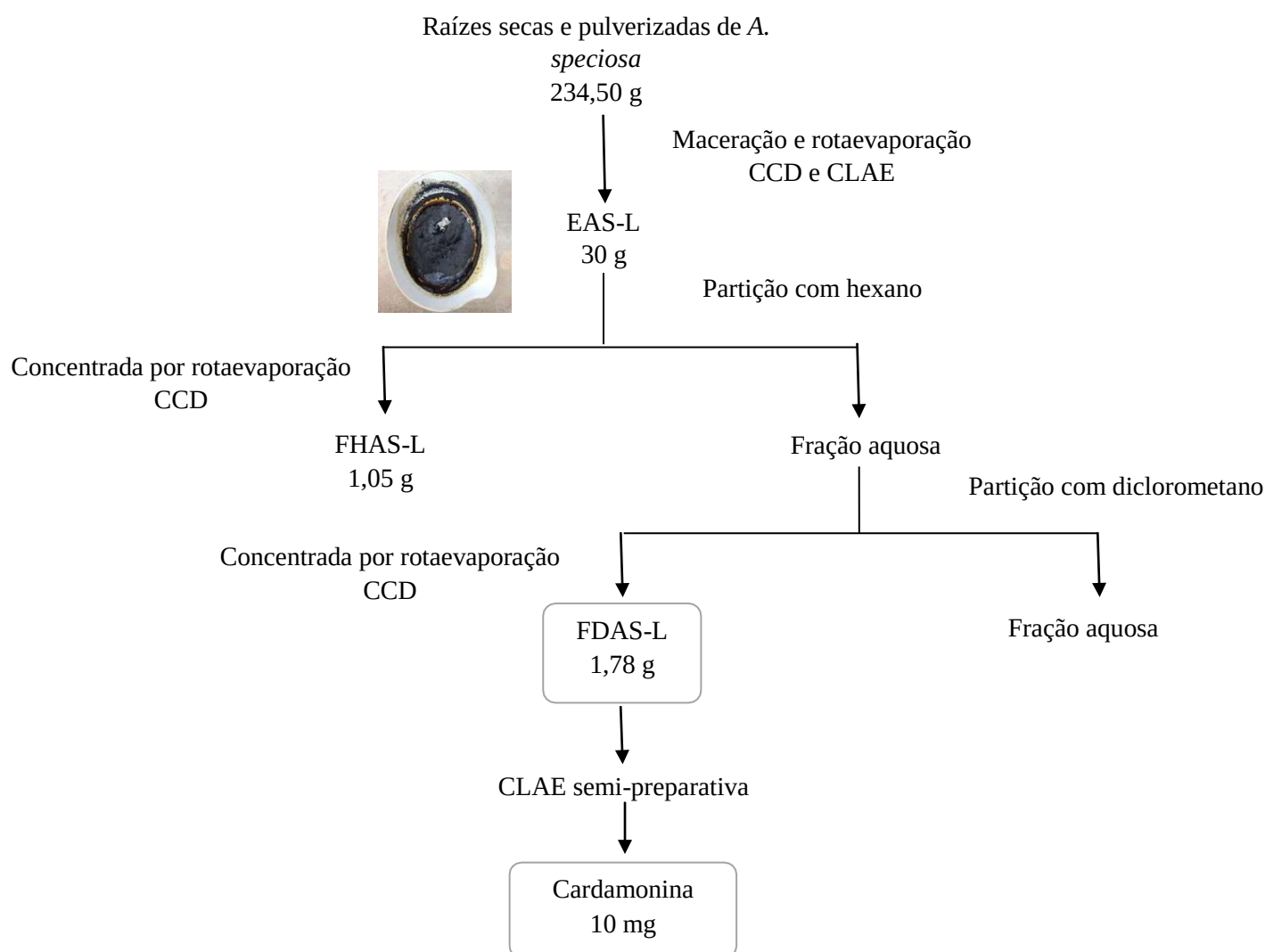
As amostras foram preparadas para injeção no sistema CLAE através de solubilização em MeOH, com auxílio de banho ultrassônico aquecido a 35 °C por 15 minutos. Em seguida, foram diluídas com água até obter a proporção de 9:1 v/v (9 MeOH:1 água). A concentração final das amostras de extrato EAS-L e fração FDAS-L foi 2 mg/mL, e do padrão foi 1 mg/mL. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) e filtradas em unidade filtrante de poro 0,45 µm.

A partir do sistema gradiente, foi determinado um sistema isocrático de solvente para realizar o isolamento da cardamonina por CLAE semi-preparativa. Foram selecionados os sistemas isocráticos de 70 e 80% de metanol em água acidificada com 0,1% de ácido acético, utilizando o mesmo fluxo, volume de injeção e temperatura da coluna utilizados anteriormente. De acordo com a resolução e tempo de eluição das duas condições, foi selecionando o melhor sistema de separação para o isolamento de cardamonina (Figura 18) em CLAE semi-preparativa.

3.3.3.2 CLAE semi-preparativa da fração FDAS-L

Em escala semi-preparativa, a fração orgânica FDAS-L foi solubilizada em MeOH 90%, com auxílio de ultrassom aquecido a 35 °C por 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) e filtrada em unidade filtrante de poro 0,45 µm. A amostra foi injetada utilizando eluição isocrática MeOH 70% em água (acidificada com ácido acético), fluxo de 5 mL/min e volume de injeção variando de 100 a 200 µL de acordo com a detecção do pico de interesse. Foram realizadas 40 injeções no total, coletando o pico correspondente à cardamonina e obtendo 10 mg da substância.

Figura 18 - Fracionamento do extrato metanólico das raízes de *A. speciosa*



Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.4 ISOLAMENTO DA LICOCHALCONA A

3.4.1 Cromatografia líquida à vácuo (CLV)

Inicialmente, o extrato seco *G. inflata* (10g) foi submetido a CLV para fracionamento. A coluna de CLV foi empacotada com sílica (40 a 63 μm) até obter altura de 12 cm. Em seguida, a coluna foi submetida à eluição com fases móveis de polaridade crescente e volumes variados, conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Fases móveis utilizadas na cromatografia líquida à vácuo do extrato seco de *G. inflata*

Fração	Fases Móveis	Proporção (%)	Peso da Fração (g)
1	Hex:AcOEt	80:20	0,61
2	Hex:AcOEt	70:30	0,43
3	Hex:AcOEt	50:50	1,14
4	Hex:AcOEt	30:70	1,26
5	MeOH	100	0,75

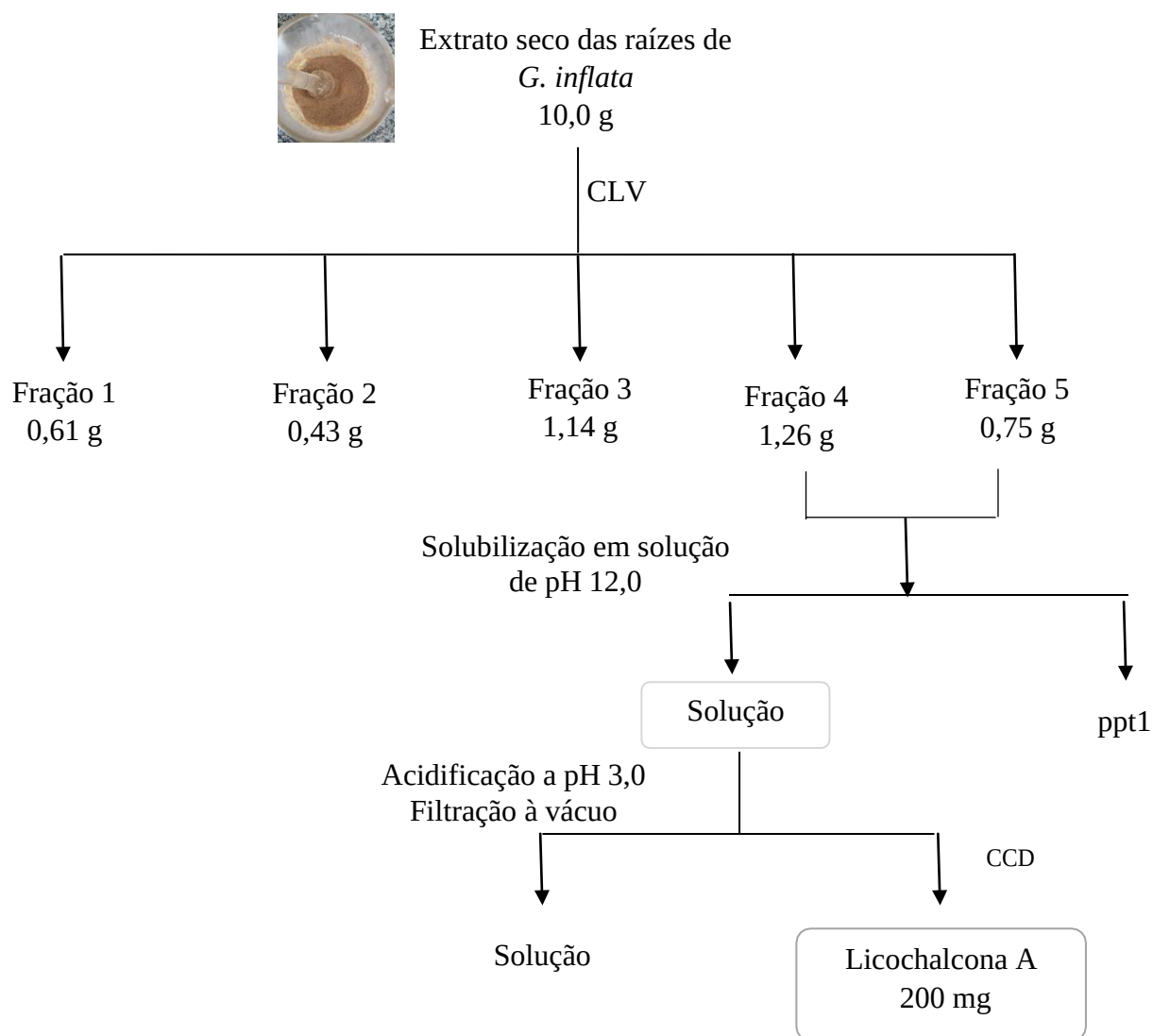
As frações foram analisadas por CCD em comparação com o padrão da licochalcona A para verificar a presença da substância nas amostras. Foi utilizada fase móvel de hexano:acetato de etila (1:1 v/v), acidificada com ácido acético glacial. Em seguida, foi evidenciada a presença da licochalcona A nas frações 4 e 5, que foram reunidas e submetidas ao prosseguimento do isolamento.

3.4.2 Isolamento da licochalcona A por partição ácido-base

As frações 4 (1,26 g) e 5 (0,75 g) foram reunidas e solubilizadas com auxílio de banho ultrassônico em solução básica de hidróxido de sódio (NaOH 1,0M) pH igual a 12,0, gerando um precipitado (ppt1). A solução foi filtrada para separar o precipitado, gerando solução remanescente. Essa solução foi acidificada com ácido clorídrico (HCl) 1,0M até pH igual a 3,0, gerando outro precipitado (ppt2). Posteriormente, a solução foi novamente filtrada à vácuo para separar o precipitado (ppt2) da solução. O precipitado (ppt2) foi lavado com diclorometano e concentrado em rotaevaporador à temperatura de $50 \pm 5^\circ \text{C}$. Para a

verificação da presença e isolamento da licochalcona nas frações foi realizada uma CCD, utilizando fase móvel de hexano e acetato de etila (1:1 v/v) acidificada com ácido acético glacial (Figura 19).

Figura 19 – Fracionamento do extrato seco das raízes de *G. inflata*



Fonte: Elaborado pela própria autora.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DA CARDAMONINA E LICOCHALCONA A

As amostras obtidas foram analisadas por RMN de H^1 , utilizando espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE III 500 MHz, localizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF e operado a 500 MHz. O solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) para os compostos e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os dados obtidos foram tratados no programa NMRTEC e comparados com dados obtidos na literatura.

3.6 DESENVOLVIMENTO DAS NLS

As NLS foram preparadas pelo método já descrito em literatura, conhecido como homogeneização por alto cisalhamento com algumas modificações. As concentrações dos constituintes das NLS foram previamente definidas em trabalho realizado por Soldati (2015), no qual o autor encapsulou outras substâncias.

Para as NLS carreadoras das chalconas de interesse, a fase orgânica (FO) foi constituída separadamente por uma mistura da manteiga de cupuaçu e as substâncias (licochalcona A – NLS-L; e Cardamonina – NLS-C). Já para as NLS brancas (NLS-B), ou seja, sem nenhuma substância encapsulada, a fase orgânica consistiu apenas na manteiga de cupuaçu. Foram preparadas NLS com corante vermelho Nilo (NLS-RN) para avaliação da permeação das nanopartículas e neste caso, a fase orgânica consistiu na manteiga cupuaçu e o corante vermelho do nilo (Tabela 6).

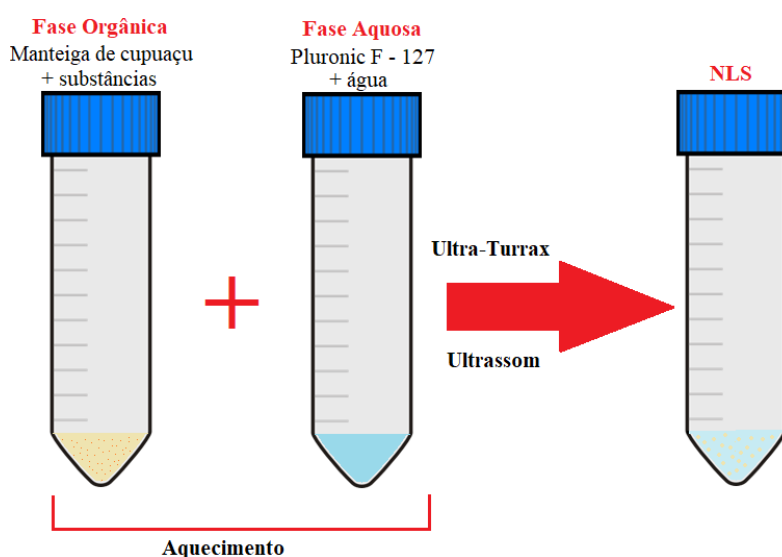
Tabela 6 – Composição das nanopartículas lipídicas sólidas

Composição % (m/v)	NLS-B	NLS-RN	NLS-C	NLS-L
Manteiga de cupuaçu	1,0	1,0	1,0	1,0
Pluronic® F-127	0,7	0,7	0,7	0,7
Vermelho do Nilo	-	0,05	-	-
Licochalcona A	-	-	0,05	-
Cardamonina	-	-	-	0,05

As fases orgânicas foram aquecidas até a completa fusão dos lipídeos da manteiga, chegando a uma temperatura de 45 °C. A fase aquosa (FA) consistiu numa solução de

Pluronic® F-127 e foi aquecida à mesma temperatura da fase orgânica. Em seguida, a fase aquosa foi vertida na fase orgânica e a dispersão foi submetida à homogeneização por agitação de 8.000 rpm por 1 minuto. A dispersão obtida foi submetida a irradiação ultrassônica por 5 minutos, com intensidade de 30%, auxiliado por uma ponta de ultrassom de 6,0 mm de diâmetro (Figura 20). As NLS obtidas foram mantidas à temperatura ambiente por 24 horas para garantir a solidificação de lipídeos.

Figura 20 – Esquema representativo do preparo de NLS



Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NLS

3.7.1 Caracterização físico-química

As NLS obtidas foram caracterizadas quanto a potencial zeta, PDI e tamanho, na Embrapa Gado de Leite, através da técnica de DLS e mobilidade eletroforética no equipamento ZetaSizer Nano (HOFFMAN et al., 1997; HEURTAULT et al., 2003; YADAV et al., 2014). Para realizar a leitura, a amostra foi diluída cem vezes com água purificada para evitar agregados, gerando falsos resultados. Os resultados foram obtidos através de uma média de 5 leituras, todas realizadas em triplicata. Para a análise de resultados, foi considerada média e desvio-padrão.

3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As nanopartículas foram avaliadas por microscopia de transmissão eletrônica, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, utilizando o equipamento JEM – 1011 TEM (Jeol LTD., Tokyo, Japão). O microscópio foi operado em voltagem de aceleração de 80 kV. A amostra foi depositada em grids de níquel malha 200 (CF200-Ni, SEM), revestidos com Parlodion ® e carbono amorfo. Após secagem por 24 horas à temperatura ambiente, o TEM foi operado em modo de campo brilhante com ampliação de até 50.000 vezes.

3.7.3 Eficiência de encapsulação (% EE)

A eficiência de encapsulação (% EE) foi determinada através da quantificação de substância ativa na fase aquosa. Triplicatas de 2,0 mL de NLS-C e NLS-L, separadamente, foram transferidas para o tubo de filtração-centrifugação Amicon e submetidas à centrifugação por 30 minutos à 1800 x g (ARAÚJO et al., 2012). Em seguida, um volume de 500 µL foi recolhido do filtrado e diluído com 500 µL de MeOH para determinação da % EE em CLAE/UV-Vis.

Inicialmente, foi preparada curva analítica para posterior quantificação das substâncias livres. A solução-mãe de concentração 0,16 mg/mL foi diluída com MeOH e as seguintes concentrações foram obtidas: 0,0045, 0,0259, 0,0473, 0,0687, 0,09 mg/mL. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e filtradas em filtro de 0,45 µm e injetadas no sistema CLAE-DAD, gerando curvas analíticas para quantificação da licochalcona A e cardamonina, ambas de 5 pontos. Para a cardamonina, foi utilizada fase móvel MeOH:água (70:30 v/v), acidificada com 0,1% de ácido acético, volume de injeção de 50 µL, fluxo de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e detecção no UV a 345 nm. Já para a licochalcona A, foi utilizada fase móvel MeOH:água (65:35 v/v), acidificada com 0,1% de ácido acético, volume de injeção de 50 µL, fluxo de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e detecção no UV a 382 nm.

3.7.4 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo do perfil de liberação *in vitro* foi realizado com as NLS-L, NLS-C, NLS-B e solução de licochalcona A e cardamonina livres. As soluções das substâncias livres foram

preparadas na mesma concentração das NLS, ou seja, 0,45 mg/mL, em solução salina de cloreto de sódio 0,9% com 10% de etanol (para garantir a condição *sink*). Foram utilizados sacos de diálise previamente hidratados e devidamente fechados, com 10 cm de comprimento e 4 mL de solução ou suspensão de NLS. O saco foi imerso em um tubo falcon contendo 10 mL de meio receptor, neste caso, em solução salina com 10% de etanol, mantendo o saco completamente submerso (MODI; ANDERSON, 2013).

Os tubos falcon foram submetidos à temperatura de 37 °C e à agitação de 100 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas nos seguintes intervalos de tempo: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 horas, com reposição de meio. Posteriormente procedeu-se com a quantificação por espectroscopia de UV, com detecção a 382 nm para licochalcona A e 345 nm para a cardamonina. Foram elaboradas curvas analíticas com as concentrações de 1 a 100% de cardamonina e licochalcona A para a quantificação das substâncias liberadas e o experimento foi realizado em triplicata. Quantidades cumulativas de licochalcona A e cardamonina liberadas foram plotadas em função do tempo para determinar o perfil de liberação e a cinética de liberação foi determinada utilizando modelos matemáticos de regressão linear. Foi avaliada a porcentagem cumulativa de substância livre em função do tempo, para avaliar se a liberação seguia a cinética de ordem zero; em função da raiz quadrada do tempo para verificação da cinética de pseudo-primeira ordem (modelo de Higuchi); e o log da porcentagem de substância livre em função do tempo para cinética de primeira ordem. Coeficientes maiores que 0,99 foram considerados lineares e para estes, o fluxo estacionário (J_s) foi determinado a partir do coeficiente de linear da curva plotada para a porcentagem de substância livre em função do tempo. O tempo de latência (T_L) demonstra o tempo necessário para atingir o fluxo em estado estacionário (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014; RAMTEKE et al., 2014).

3.8 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

3.8.1 Estudo de estabilidade das NLS de curta duração

Para verificar a estabilidade de curto prazo das NLS, as amostras de NLS-B, NLS-L e NLS-C (n = 3) foram mantidas em tubos de polipropileno (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) de 2,0 mL, sob refrigeração a 4 °C e temperatura ambiente. As amostras foram avaliadas nos tempos 0 (24 h após preparo), 7, 15, 21 e 30 dias de armazenamento quanto ao tamanho da partícula, PDI e potencial zeta.

3.8.2 Avaliação da composição lipídica da manteiga de cupuaçu frente à exposição UV por CG-EM

Para a determinação da estabilidade da manteiga de cupuaçu frente à radiação UV, uma amostra de 30 g foi espalhada em placa de petri, submetida à exposição UV por 30 minutos em capela de fluxo laminar Thermo Scientific e, em seguida, foi solubilizada em hexano e analisada qualitativamente por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM).

Para a análise em CG-EM foram utilizados coluna capilar Restek Rtx-5MS de sílica fundida (5% fenil, 95% dimetil polisiloxano) e hélio como gás de arraste. As condições definidas foram: temperatura de injeção 150 °C, ou seja, a amostra foi aquecida até essa temperatura para ser volatilizada; modo de injeção Split 1:10, pressão 57,4 Kpa e fluxo da coluna 1 mL/min.; temperatura do forno foi de 60 °C a 240 °C, em um intervalo de 40 minutos e em gradiente linear, com manutenção da temperatura por 5 minutos na primeira e última temperatura; tempo de corte do solvente foi 3 minutos. Para o módulo de espectroscopia de massas (EM) a temperatura da fonte de íon foi de 260 °C, o tempo de início da análise foi em 3 minutos e o fim em 50 minutos. O intervalo de registro de m/z foi de 40 a 600. A identificação dos componentes foi realizada com base nos espectros de massa, associação realizada pela biblioteca NIST11.s.lib e descrição dos constituintes na literatura. Para verificar a estabilidade da manteiga, foram comparadas amostras sem e após a exposição à radiação UV, tratadas e analisadas nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.9 TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

3.9.1 Viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados no Laboratório de Imunologia do ICB da UFJF, sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Gilson Costa Macedo.

Foram cultivados macrófagos da linhagem celular J774 em garrafas com meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de estreptomicina e penicilina) até atingirem a confluência. Em seguida, as células foram removidas e contadas em câmara de Neubauer com corante Azul de Tripan (Sigma). As células foram transferidas para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de 2×10^5 células por poço, sendo que essa concentração já foi descrita na literatura por HUO e colaboradores (2012). As células

foram incubadas por 24 horas para garantir sua manutenção e sobrevivência antes da adição dos compostos a serem testados.

As células mortas foram removidas dos poços, o meio (2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) foi substituído e os compostos (NLS-B, NLS-C, NLS-L, cardamonina e licochalcona A) a serem testados foram adicionados em diferentes concentrações (5, 20 e 50 μ M). Os controles utilizados foram o próprio meio de cultura e DMSO a 0,5% (solvente utilizado no preparo da diluição dos compostos).

Após 48 horas de incubação a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5%, o sobrenadante foi removido e a solução do reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (5 mg/mL, Invitrogen) a 10% (m/v) foi adicionada. A placa foi novamente incubada nas mesmas condições anteriores por 2 horas e 30 minutos. Ao término desse intervalo, o sobrenadante foi descartado, o cristal de formazan foi ressuspensionado em DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, CA, EUA) a 595 nm. O cálculo do percentual de células viáveis expostas ao tratamento foi obtido comparando os grupos tratados com os controles não tratados, considerados como 100% de viabilidade celular. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente.

3.9.2 Teste de hemólise

A hemólise foi avaliada para as amostras de NLS-B, NLS-C, NLS-L, cardamonina e licochalcona A, de acordo com método descrito por Wang e colaboradores (2009) com alterações. As amostras de sangue foram coletadas de indivíduos saudáveis voluntários, do sexo feminino, por punção venosa em tubos contendo EDTA. Os eritrócitos foram separados por centrifugação a 2000 x g por 5 minutos, lavados 3 vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9% e ressuspensionados em 10 mL de solução salina (eritrócitos correspondentes a 1 mL de sangue). As suspensões de eritrócitos foram divididas em sete grupos (A-G), os quais foram tratados com as suspensões das amostras. Ao grupo A foi adicionado 10% (v/v) de solução de cloreto de sódio (0,9%), sendo considerado o controle negativo; ao grupo B, foi adicionado 10% (v/v) de água purificada, sendo considerado 100% de hemólise, ou seja, o controle positivo; ao grupo C foi adicionado 10% (v/v) de NLS-B; aos grupos D e E foram adicionados 10% (v/v) de uma suspensão de cardamonina e licochalcona A (0,45 mg/mL) respectivamente, previamente preparadas com água salina e glicerina. Aos grupos F e G foram adicionados 10% (v/v) de NLS-C e NLS-L, respectivamente. Em seguida as amostras

foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação, e centrifugadas por 5 minutos a 2000 x g. O sobrenadante foi retirado e analisado por espectrometria UV/Vis a 415 nm. A taxa de hemólise em porcentagem foi obtida pela fórmula:

3.10 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* foram efetuados no Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP), sob a colaboração e supervisão do Prof. Dr. Josué de Moraes. Todos os ensaios foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) número 05/2015.

3.10.1 Linhagem do *S. mansoni* e animais hospedeiros utilizados

Para a realização de testes *in vitro*, foi utilizada a linhagem BH (Belo Horizonte, MG) de *S. mansoni*, mantida no Núcleo de Enteroparasitos do IAL por meio de ciclo evolutivo estabelecido (DE MORAES et al., 2012). Os hospedeiros intermediários utilizados foram caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, acondicionados em aquários de polietileno (55 x 22 x 17 cm) contendo cerca de 20 litros de água decolorada, à temperatura de 24 °C e alimentados com alface fresca. Os aquários foram arejados com bombas de 1,5 W. Também foram utilizados hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839, de sexo único, de 21 dias de idade e massa aproximada de 20 g, fornecidos pelo biotério do IAL e utilizados como hospedeiro definitivo. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica, acomodados em maravalha com duas trocas semanais e alimentados com ração e água *ad libitum*.

3.10.2 Manutenção de vida do *S. mansoni*

O ciclo evolutivo do parasito foi mantido e os vermes foram recuperados devido a metodologias já descritas na literatura (SMITHERS; TERRY, 1965; PELLEGRINO; KATZ, 1968). Os hamsters foram infectados por meio de injeção subcutânea de um concentrado de cercárias. Após 49 dias de infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e

perfundidos com meio RPMI 1640 (Roswell Memorial Park Institute, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) com L-glutamina, vermelho de fenol e heparina sódica 5 UI/mL (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), através do sistema porta hepático para a recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni*.

Após a eutanásia, os animais foram seccionados longitudinalmente na região ventral. Em seguida, a veia porta foi seccionada e com auxílio de uma agulha acoplada em bomba peristáltica, injetou-se o meio de cultura, coletando-se os vermes adultos (SMITHERS; TERRY, 1965).

Paralelamente, miracídios foram recolhidos de um macerado hepático para a reinfecção de caramujos (PELLEGRINO; KATZ, 1968). Após 30 a 40 dias de infecção, os caramujos são expostos à água de clorada e luz artificial por 2 a 3 horas, para a liberação de cercárias. As cercárias são concentradas para a infecção dos hamsters (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

3.10.3 Preparo das amostras

As NLS e substâncias isoladas foram acondicionadas em microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e umidade. Para diluir e solubilizar as substâncias isoladas foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e adicionou-se meio RPMI 1640 para obter as concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μ M, sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5%. As NLS foram diluídas com meio de RPMI 1640 para obter as mesmas concentrações. O controle positivo (PZQ 2 μ M) foi preparado da mesma forma.

3.10.4 Ensaios *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni*

Inicialmente, os vermes foram lavados com meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 UI/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e estreptomicina 200 μ g/mL (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), em placa de Petri de polietileno estéril (90 mm x 15 mm). Posteriormente, os parasitos foram transferidos para placas de cultura de células com 24 poços contendo 1 casal por poço em 2 mL do meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich).

Em seguida, as substâncias livres e as NLS foram adicionadas e os parasitos foram incubados em estufa (Thermo Scientific 8000 WJ, CA, EUA) a 37 °C e atmosfera de CO₂ a

5%. Para cada grupo experimental, utilizou-se um grupo controle negativo (casais de parasitos cultivados somente em meio RPMI 1640 com NLS-B ou meio RPMI 1640 com DMSO a 0,5%) e um grupo controle positivo (PZQ a 2 μ M) (DE CASTRO et al., 2015; DE MORAES et al., 2013a; DE MORAES et al., 2013b).

Os casais de vermes adultos foram monitorados por 72 horas, diariamente, com auxílio de estereomicroscópio. A mortalidade dos parasitos foi avaliada pela ausência de movimentos por 2 minutos. Além disso, também foi avaliada a redução da atividade motora, classificado em moderada e significativa. Após a morte dos parasitos ou ao término do estudo, os parasitos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, para determinar os danos nos tegumentos (DE MORAES et al., 2011a; DE MORAES et al., 2011b; DE MORAES et al., 2012).

3.11 ENSAIO *IN VITRO* DE PERMEABILIDADE DE NLS NO TEGUMENTO DE *S. mansoni*

As NLS- RN foram acondicionas em microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e umidade. Para diluir as NLS-RN, foi utilizado meio de cultura RPMI 1640 para obter a concentração de 50 μ M de corante. Em seguida, as NLS-RN foram adicionadas em poços contendo um casal de parasitos em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal, tamponado com HEPES 25 mM e foram incubados em estufa a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5%. Para cada grupo experimental, utilizou-se um grupo controle negativo (casais de parasitos cultivados somente em meio RPMI 1640 com NLS-B). Após 2 horas de exposição, os vermes foram recolhidos dos poços, lavados com meio RPMI 1640 e adicionados em microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL protegidos da luz com papel alumínio, contendo meio RMPI 1640.

Os parasitos foram observados em microscópio confocal em filtro de excitação de λ = 552 nm e observação da radiação em 578 nm, a 10 e 15 ms. As observações microscópicas foram realizadas no Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob a colaboração e supervisão da Prof^a. Dr^a. Priscila de Faria Pinto.

3.12 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

Considerando o melhor desempenho da formulação de NLS-L e licochalcona A isolada nos ensaios *in vitro* e de toxicidade, essas amostras foram submetidas aos ensaios *in vivo*. Foram realizados ensaios por duas vias de administração, a via oral e a via intraperitoneal. A via oral foi realizada no Instituto René Rachou (Fiocruz – MG), sob a colaboração da Prof.^a Dr.^a Priscila Faria Pinto, e os ensaios foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local, número LW21/16. A via intraperitoneal foi realizada no Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP), sob a colaboração do Prof. Dr. Josué de Moraes, e os ensaios foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) local, número 031/2017.

3.12.1 Manutenção de vida do *S. mansoni*

3.12.1.1 Via oral

Para a realização de testes *in vivo* com administração realizada via oral, foi utilizada a linhagem BH (Belo Horizonte, MG) de *S. mansoni*, mantida no Laboratório de Esquistossomose do centro de Pesquisas René Rachou Fiocruz/MG. Os hospedeiros intermediários utilizados foram caramujos *Biomphalaria glabrata*, acondicionados em aquários de polietileno (55 x 22 x 17 cm) contendo cerca de 20 litros de água decolorada, à temperatura de 24 °C e alimentados com alface fresca. Camundongos fêmeas da linhagem Swiss foram submetidos à infecção via subcutânea por cercárias de *S. mansoni*. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica, acomodados em maravalha e alimentados com ração e água *ad libitum*. Após 55 dias pós-infecção, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (115 mg/Kg) e perfundidos pelo sistema porta-hepático para recuperação dos vermes adultos (SMITHERS; TERRY, 1965; PELLEGRINO; KATZ, 1968). Miracídeos foram recolhidos de um macerado hepático para a reinfecção de caramujos e início de um novo ciclo (PELLEGRINO; KATZ, 1968). Após 30 a 40 dias de infecção, os caramujos são expostos à água decolorada e luz artificial, para a liberação de cercárias. As cercárias são concentradas para a infecção dos camundongos (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

3.12.1.2 Via intraperitoneal

Para a realização de testes *in vivo* com a administração realizada via intraperitoneal, o protocolo seguido para a manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni* foi o mesmo descrito no item 3.10.2 desse trabalho (DE MORAES et al., 2012).

3.12.2 Preparo das amostras

As suspensões de NLS-B e NLS-L foram administradas diretamente, sem nenhum preparo prévio, por via oral e intraperitoneal. Para a administração oral, a licochalcona A foi solubilizada em água destilada com 10% de glicerina, com auxílio de agitador tipo vórtex, resultando em uma solução com concentração igual a 0,45 mg/mL. Já para a administração intraperitoneal, a licochalcona A foi solubilizada em água para injeção com 1% de DMSO e 1% de Tween 80 (polissorbato 80), com auxílio de agitador tipo vórtex, resultando em uma solução com concentração igual a 0,45 mg/mL.

3.12.3 Grupos experimentais de animais

3.12.3.1 Grupos experimentais de animais com administração via oral

Camundongos fêmeas, da linhagem Swiss, pesando aproximadamente 20 g foram infectadas com 50 cercárias/animal. Os animais foram divididos em grupos de 10 animais (Tabela 7). Como controles negativos foram utilizados dois grupos, sendo um de animais não tratados e outro tratado com NLS-B. O controle positivo consistiu em um grupo tratado com PZQ na concentração de 400 mg/Kg de peso. Para o tratamento com NLS-L, os animais foram divididos em quatro grupos, tratados com 1,25 ou 2,50 mg/Kg em esquema de dose única ou dupla. Já para a licochalcona A, os animais foram divididos em dois grupos, tratados com 2,50 mg/Kg em esquema de dose única ou dupla. O início do tratamento ocorreu após 45 dias de infecção, com intervalo de 7 dias entre doses (FELICISSIMO, 2014).

Tabela 7 – Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral

Grupo	Nº de animais tratados	Nº de animais avaliados	Tratamento	Nº de doses administradas
Grupo A - Controle	10	7	-	-
Grupo B – PZQ	10	7	400 mg/Kg	Uma
Grupo C - NLS-B	10	7	110 µL	Uma
Grupo D - NLS-L	10	7	1,25 mg/Kg	Uma
Grupo E - NLS-L	10	7	2,50 mg/Kg	Uma
Grupo F - NLS-L	10	7	1,25 mg/Kg	Duas
Grupo G - NLS-L	10	7	2,50 mg/Kg	Duas
Grupo H - Licochalcona A	13	7	2,50 mg/Kg	Uma
Grupo I - Licochalcona A	14	7	2,50 mg/Kg	Duas

3.12.3.2 Grupos experimentais de animais com administração via intraperitoneal

Camundongos fêmeas, da linhagem Balb/c, pesando aproximadamente 20 g foram infectadas com 70 cercárias/animal. Os animais foram divididos em grupos de 5 animais (Tabela 8). Como controles negativos foram utilizados dois grupos, sendo um de animais não tratados e outro tratado com NLS-B. Em relação aos grupos tratados com NLS-L e licochalcona A, a dose administrada foi de 5 mg/Kg, por 5 dias seguidos. O início do tratamento ocorreu após 47 dias de infecção. Além disso, um grupo de animais recebeu 200 µL de NLS-RN duas horas antes da eutanásia. Os parasitos desses animais foram recolhidos e avaliados em microscopia de fluorescência.

Tabela 8 – Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via intraperitoneal

Grupo	Nº de animais tratados	Nº de animais avaliados	Tratamento	Nº de doses administradas
Controle	5	5	Sem tratamento	-
NLS-B (branca)	5	5	200 µL	5
NLS-L	5	5	5 mg/Kg	5
Licochalcona A	5	5	5 mg/Kg	5

3.12.4 Avaliação de carga parasitária

Após o tratamento, os animais foram eutanasiados com cloridrato de xilazina (0,6 mg/animal) e cloridrato de cetamina (3,0 mg/animal). Os animais foram seccionados longitudinalmente na região ventral e perfundidos com solução salina de cloreto de sódio 0,9% e heparina pela veia porta. Os vermes foram recolhidos conforme a localização (veias mesentéricas ou hepáticas) e comparados aos obtidos nos grupos controle.

3.12.5 Oograma

Foram recolhidas amostras de uma porção da junção ileocecal dos animais dos dois ensaios (tratamento via oral e via intraperitoneal) para a realização do oograma qualitativo e análise da evolução dos ovos dos parasitos. As porções foram pressionadas entre lâminas e lamínulas, observadas sob microscópio óptico comum com aumento de 200 vezes e fotografadas.

3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

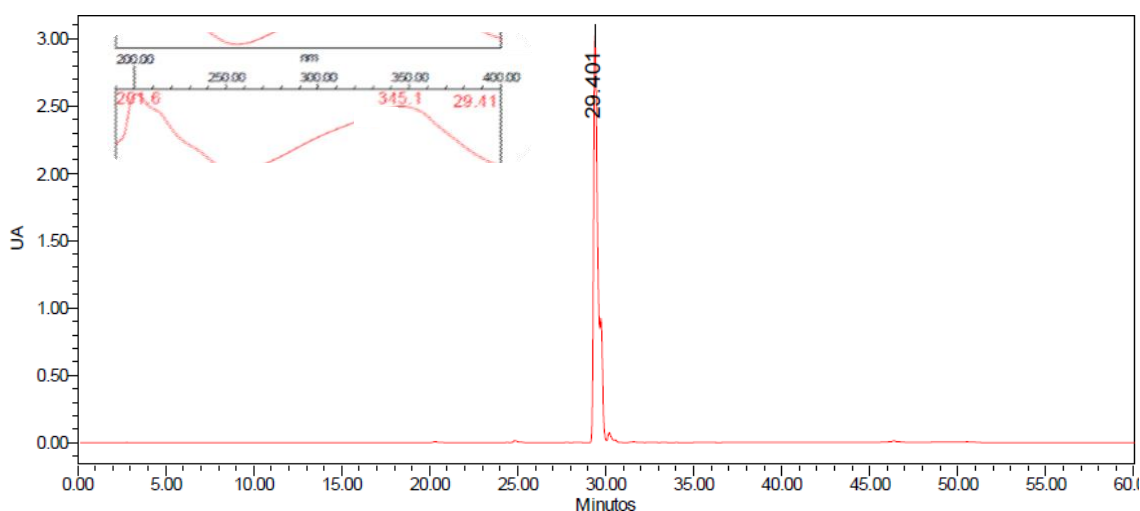
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DA CARDAMONINA

A cardamonina é uma chalcona presente em diversas espécies vegetais, entre elas a *A. speciosa*. Assim, ela foi obtida a partir das raízes de *A. speciosa*, as quais foram coletadas no Horto da Faculdade de Farmácia da UFJF. O pó das raízes (234, 50 g), obtido após secagem e moagem, foi submetido à extração com metanol, gerando o extrato EAS-L, que foi concentrado com auxílio de rotaevaporador à temperatura de $50 \pm 5^\circ \text{C}$, gerando 30 g de EAS-L.

Para confirmar a presença da cardamonina no extrato EAS-L, o padrão da substância (Figura 21) e uma amostra do extrato (Figura 22) foram analisados por CLAE nas mesmas condições. A obtenção de pico de mesmo tempo de retenção (aproximadamente 29,4 minutos) e mesmo espectro de absorção no UV (máximo de absorção na região de 345 nm) que o padrão, comprova a existência da cardamonina no EAS-L. Assim, prosseguiu-se com o isolamento da substância.

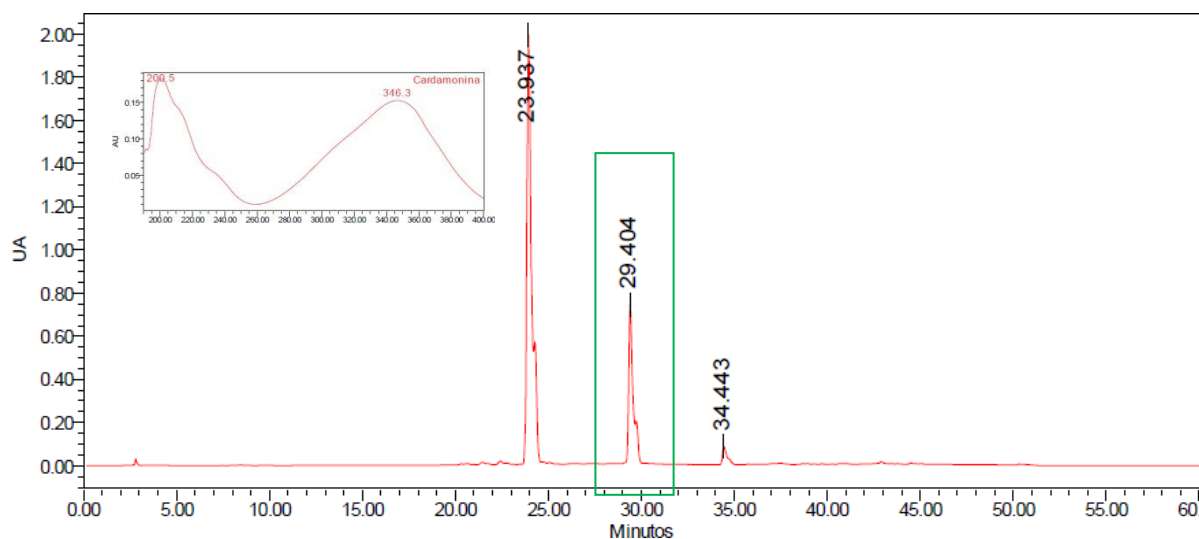
Figura 21 – Perfil cromatográfico do padrão de cardamonina em CLAE-DAD, tempo de retenção e espectro de absorção no UV



Condição cromatográfica: eluição em gradiente linear 40 a 100 % v/v de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100 %; Detecção: 345 nm.

Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 22 – Perfil cromatográfico do extrato EAS-L de raízes de *A. speciosa* em CLAE-DAD e espectro de absorção no UV do pico destacado em verde, correspondente à cardamonina

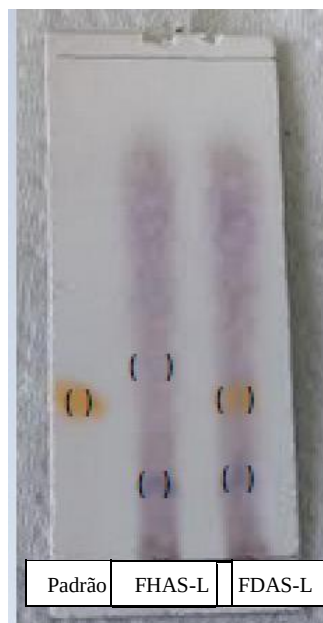


Condição cromatográfica: eluição em gradiente linear 40 a 100 % v/v de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100%; Detecção: 345 nm.

Fonte: Elaborado pela própria autora

Em estudos anteriores, foi observado pelo nosso grupo de estudos, NIPPAN, baixo rendimento de cardamonina quando eram utilizados vários processos cromatográficos para isolar a substância (DE CASTRO et al., 2015). Na tentativa de aumentar o rendimento no processo de isolamento, foi realizada uma partição líquido-líquido com o extrato EAS-L, que gerou duas frações, uma hexânica (FHAS-L) e diclorometânica (FDAS-L). Essas frações foram submetidas à CCD para determinar qual fração continha cardamonina. A presença da cardamonina na fração FDAS-L foi confirmada pela evidência de banda de mesma coloração e mesmo R_f que o padrão de cardamonina (Figura 23).

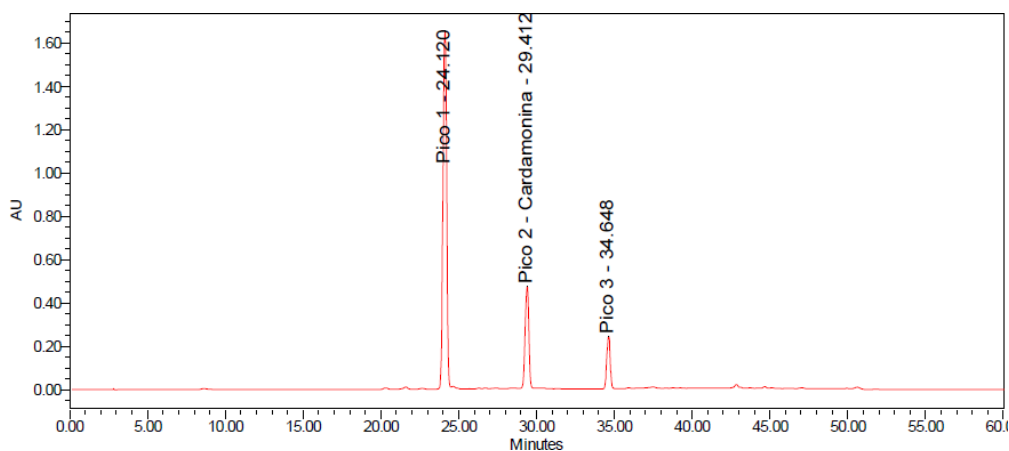
Figura 23 – CCD da fração diclorometânica (FDAS-L), fração hexânica (FHAS-L) e padrão de cardamonina



Eluente: hexano e acetato de etila (1:1); Revelador: Anisaldeído
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Dessa forma, a fração FDAS-L foi analisada em CLAE, gerando cromatograma como mostrado na figura 24, no qual foi possível identificar pico referente à cardamonina, comprovando a existência dessa substância na fração.

Figura 24 – Perfil cromatográfico da eluição da fração FDAS-L em CLAE-DAD e o tempo de retenção dos picos

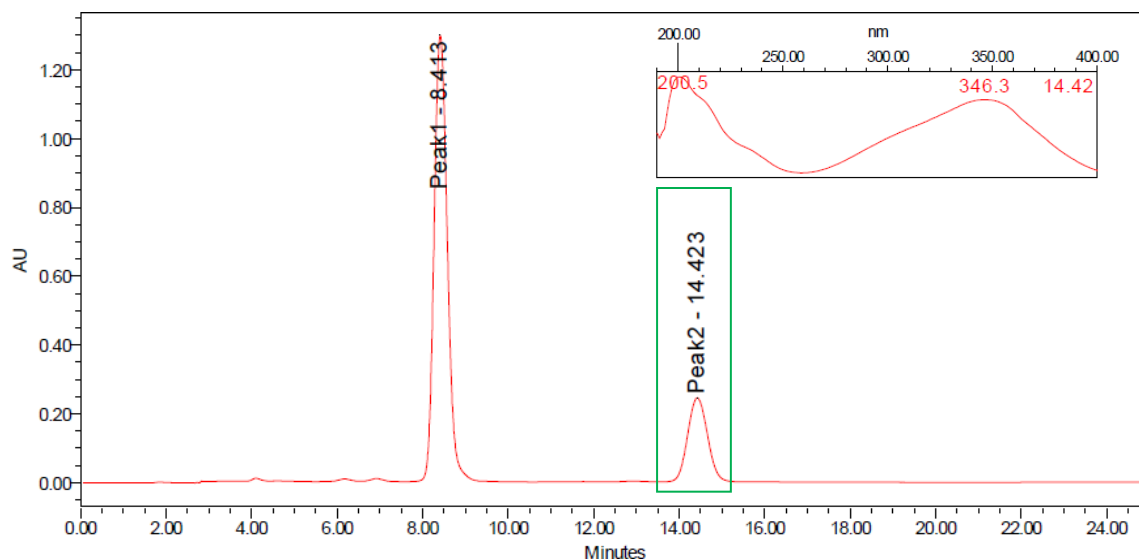


Condição cromatográfica: eluição em gradiente linear 40 a 100 % v/v de MeOH em 60 minutos e 5 minutos de sistema isocrático MeOH 100 %; Detecção: 345 nm.

Fonte: Elaborado pela própria autora

No intuito de isolar a cardamonina por CLAE semi-preparativa foram realizadas várias análises para se encontrar a fase móvel isocrática adequada. Por isso, através da análise em gradiente, foi obtida a equação ($y = 1,0x + 40$) do tempo de retenção em função da concentração de metanol na fase móvel. Assim, observou-se que a cardamonina eluiu em fase móvel com 69,4% v/v de metanol. Dessa forma, foram testados sistemas isocráticos de 70 e 80% v/v de metanol em água acidificada com 0,1% de ácido acético. No cromatograma obtido com utilização da fase móvel de 70% v/v metanol (Figura 25), foram obtidos 2 picos, sendo a cardamonina correspondente ao pico 2, com tempo de retenção igual a 14,4 minutos.

Figura 25 – Perfil cromatográfico da fração FDAS-L em CLAE-DAD, tempo de retenção dos picos e o espectro de absorção no UV do pico destacado em verde, equivalente à cardamonina, com fase móvel 70% de metanol

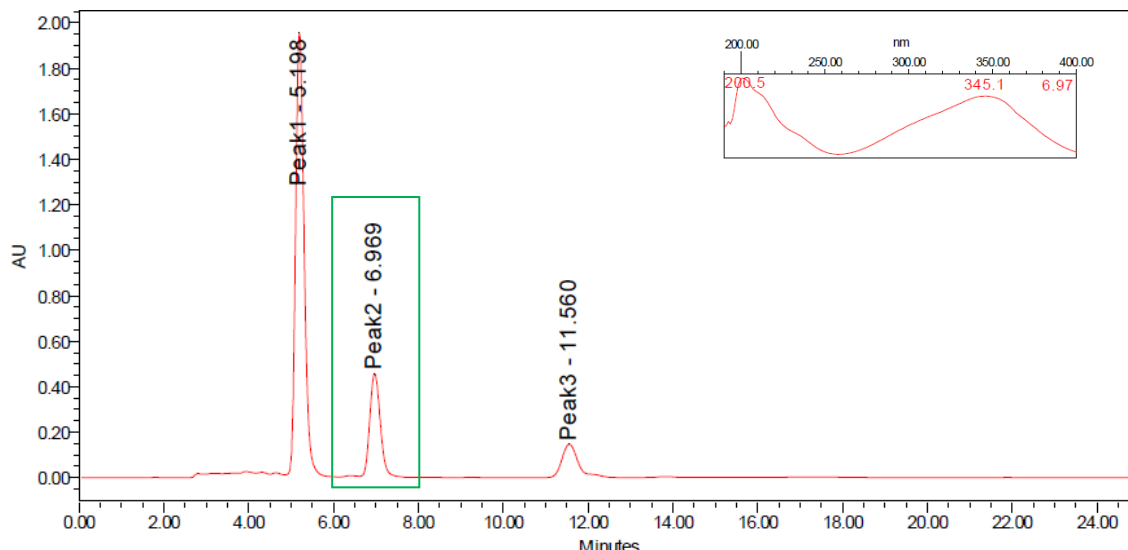


Condição cromatográfica: eluição isocrática, 70% v/v de MeOH em água acidificada com 0,1 % v/v de ácido acético. Detecção: 345 nm.

Fonte: Elaborado pela própria autora

Já no cromatograma obtido com fase móvel com 80% de metanol (Figura 26) foram observados 3 picos, sendo a cardamonina correspondente ao pico 2 (tempo de retenção igual a 6,97 minutos e espectro de UV com máximo de absorção em 345 nm).

Figura 26 – Perfil cromatográfico da fração FDAS-L em CLAE-DAD, tempo de retenção dos picos e o espectro de absorção no UV do pico destacado em verde, correspondente à cardamonina, com fase móvel 80% metanol



Condição cromatográfica: eluição isocrática, 80% v/v de MeOH em água acidificada com 0,1% de ácido acético.
Detecção: 345 nm.

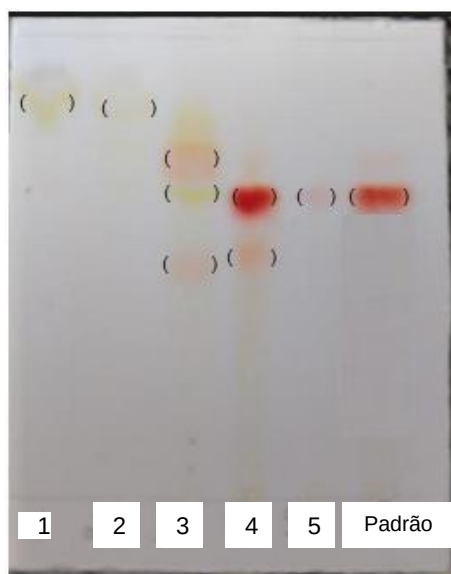
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Nesse contexto, para realizar o isolamento da cardamonina por CLAE semi-preparativa, optou-se pela fase móvel cujo cromatograma apresentou melhor resolução, ou seja, de 70% v/v de metanol em água. Assim, a fração FDAS-L foi injetada em CLAE, variando o volume de injeção de acordo com a detecção, em um total de 40 injeções. O pico referente à cardamonina foi coletado e concentrado com auxílio de rotaevaporador. Em seguida, foi seco à temperatura ambiente, resultando em 10 mg de pó amarelo o qual foi identificado como cardamonina (item 4.3.1).

4.2 ISOLAMENTO DA LICOCHALCONA A

Inicialmente, o extrato seco de *G. inflata* (10,0 g) foi submetido cromatografia líquida à vácuo (CLV), sendo recolhidas 5 frações de acordo com a polaridade da fase móvel e analisadas por CCD. A presença da licochalcona A nas frações 4 e 5 foi confirmada pela presença de bandas de mesma coloração e mesmo R_f que o padrão de licochalcona A (Figura 27). Assim, as frações 4 (1,26 g) e 5 (0,75 g) foram reunidas para prosseguir no isolamento da substância.

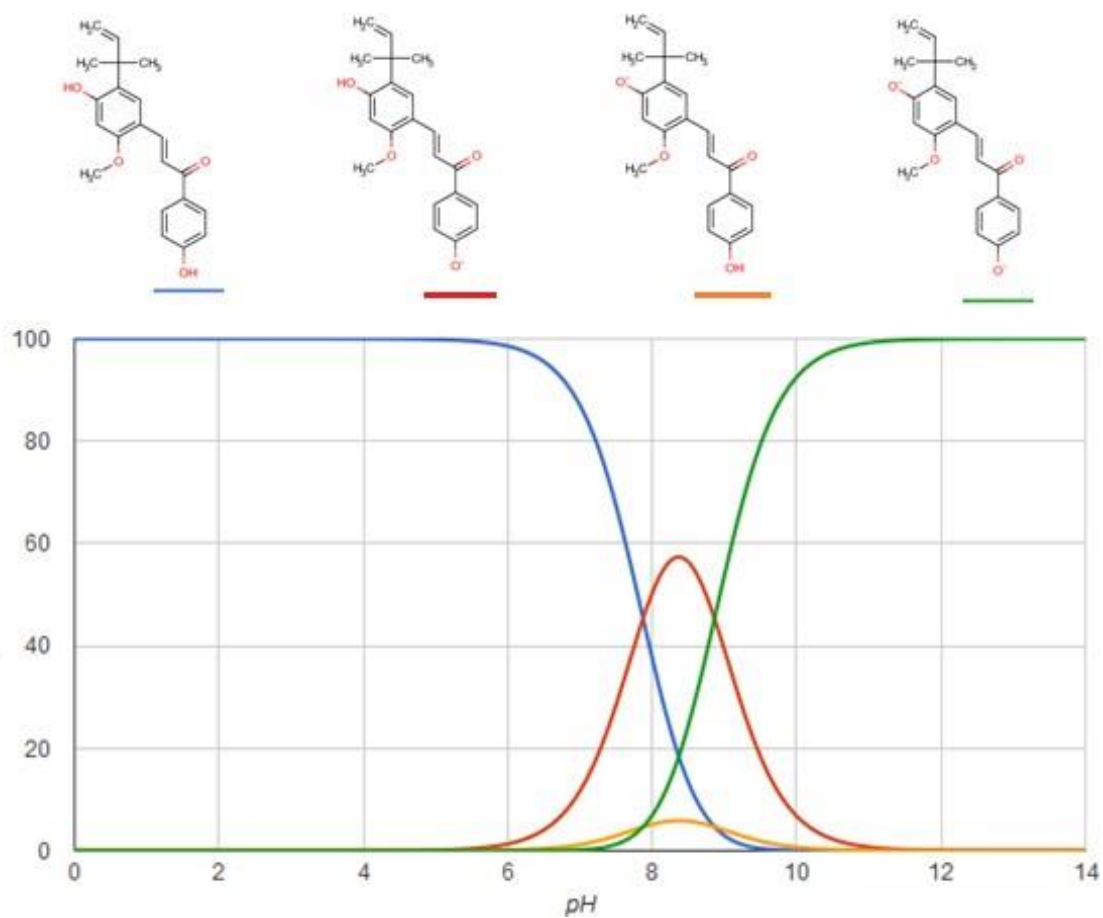
Figura 27 – CCD das frações obtidas por CLV a partir do extrato seco de *G. inflata* e padrão de licochalcona A



Eluente: hexano e acetato de etila (1:1); Revelador: Anisaldeído
 Fonte: Elaborado pela própria autora.

Na tentativa de realizar poucas etapas para o isolamento da licochalcona A, optou-se por realizar uma partição ácido-base. Até o momento, não há relatos do isolamento da licochalcona A por técnicas de partição ácido-base, sendo uma possível alternativa aos métodos já descritos para o isolamento da substância. A figura 28 mostra o diagrama de distribuição da licochalcona A de acordo com o pH do meio em que se encontra. Por isso, inicialmente as frações 4 e 5 foram solubilizadas em pH básico ($\text{pH} = 12$), no qual a licochalcona A se encontra na forma ionizada, permanecendo solúvel em meio aquoso. Em seguida, após a extração e filtração, a solução básica foi acidificada com ácido clorídrico até $\text{pH} 3$, obtendo um precipitado laranja (Figura 29). De acordo com a figura 28, nessa faixa de pH , a substância encontra-se 100% na sua forma não ionizada, justificando a precipitação observada. Este precipitado foi analisado por CCD em comparação com o padrão para confirmar a presença da licochalcona A (Figura 30). Foi possível confirmar a extração da licochalcona A, uma vez que, por CCD foi possível observar única mancha de coloração laranja e mesmo R_f que o padrão da substância.

Figura 28 – Diagrama de distribuição da licochalcona A em função do pH



Fonte: Adaptado de Chemicalize (2018).

Figura 29 – Precipitado obtido após a extração por partição ácido-base



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 30 – CCD do padrão de licochalcona A e precipitado obtido (ppt)



Eluente: hexano e acetato de etila (1:1 v/v); Revelador: Anisaldeído
Fonte: Elaborado pela própria autora.

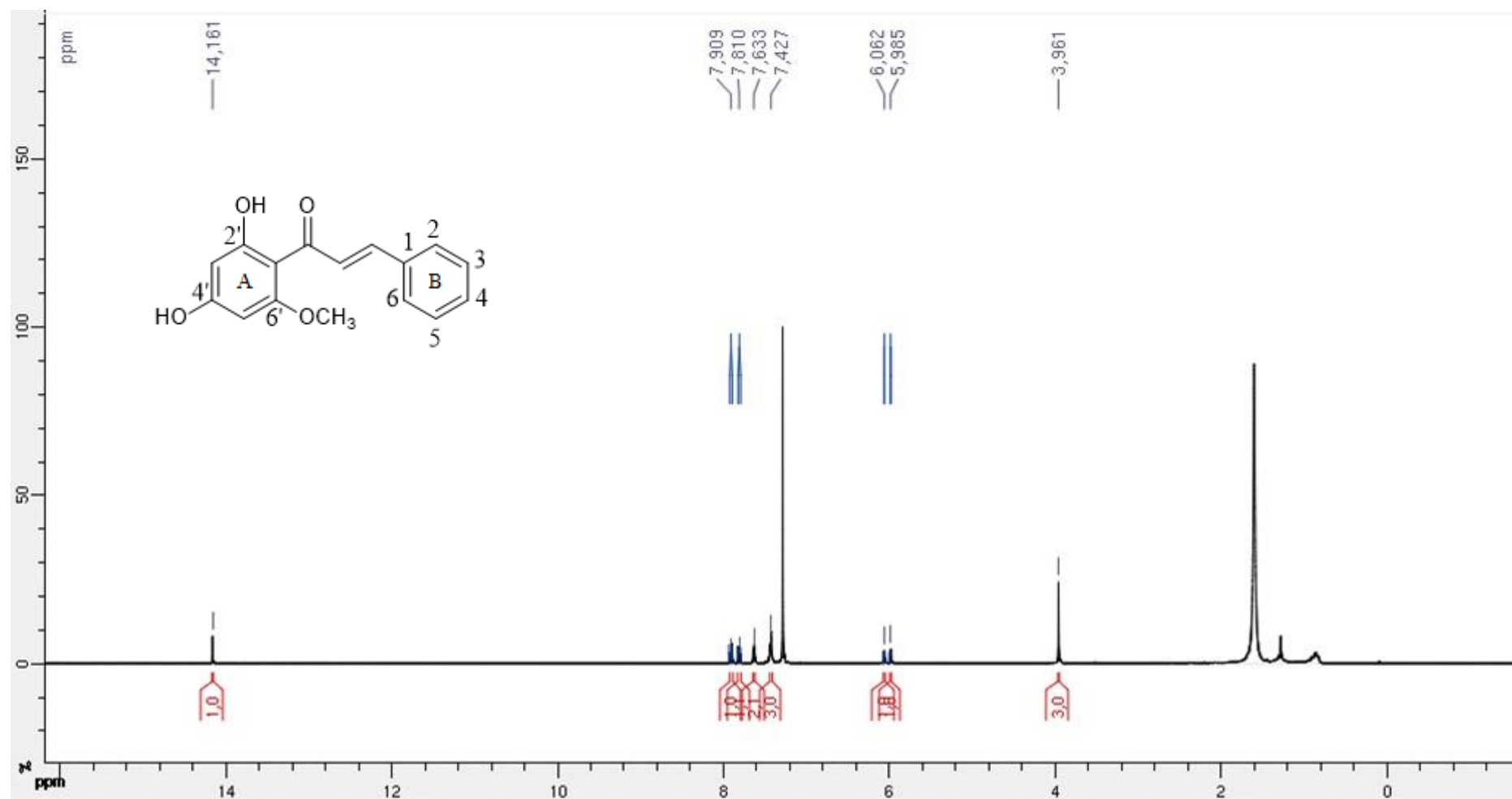
4.3 IDENTIFICAÇÃO DA CARDAMONINA E LICOCHALCONA A

4.3.1 Cardamonina

A substância isolada foi submetida a técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e os resultados obtidos foram comparados com a literatura, sendo confirmada a identificação da cardamonina. Os espectros obtidos, bem como suas expansões, estão mostrados nas figuras 31 a 33. Os sinais observados com deslocamento químico (δ) entre 0 e 2 equivalem a compostos lipídicos, ao solvente utilizado e/ou TMS (padrão interno).

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 31) revela a presença de um simpleto em δ 14,16 ppm, integrado para 1 hidrogênio. Esse sinal é compatível com o sinal de hidrogênio da hidroxila 2'.

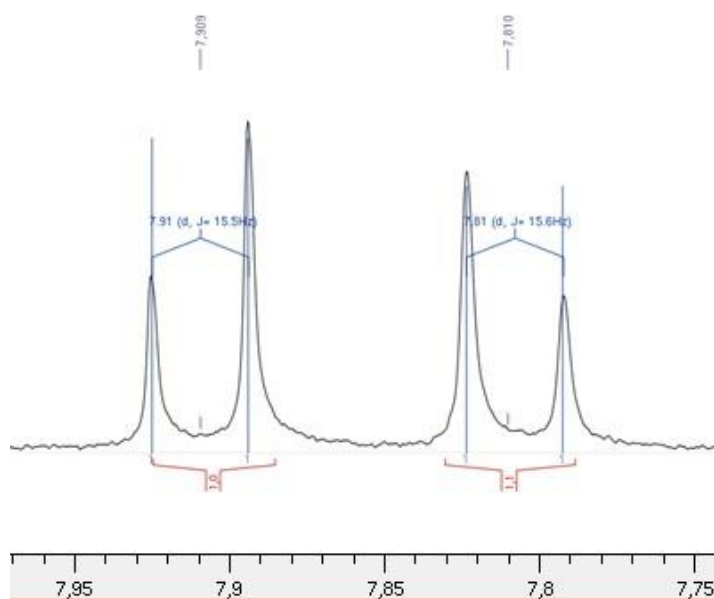
Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Além disso, é possível observar a ocorrência de dois dupletos em δ 7,81 ppm (1H, $J = 15,5$ Hz) e δ 7,91 ppm (1H, $J = 15,5$ Hz) (Figura 32). Esses sinais são compatíveis com os hidrogênios olefínicos H_α e H_β . Essa constante de acoplamento permite inferir que a chalcona encontra-se na conformação *trans* (PAVIA; KRIS; LAMPMAN, 2010).

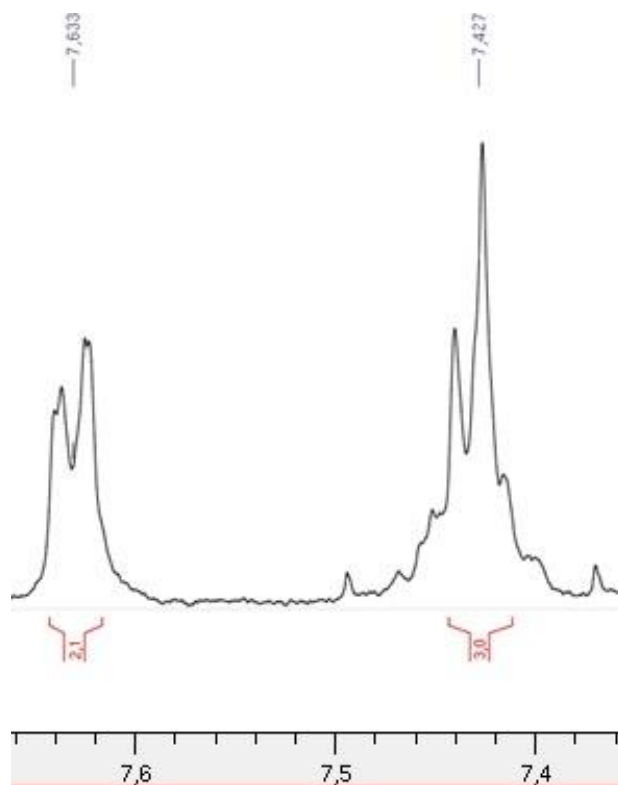
Figura 32 - Expansão da região dos hidrogênios olefínicos H_α e H_β do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Também foram observados multipletos em δ 7,43 ppm (3H) e δ 7,63 ppm (2H) (Figura 33), sendo estes sinais correspondentes aos hidrogênios (H-1 a H-6) do anel aromático B, confirmando se tratar de um anel mono substituído.

Figura 33 - Expansão da região dos hidrogênios do anel aromático B do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Ainda foi observada a presença de dois dupletos em δ 6,06 ppm (1H, $J = 2,1$ Hz) e δ 5,99 ppm (1H, $J = 2,1$ Hz). Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-5' e H-3', do anel aromático A. Para finalizar, foi observada a presença de um simpleto em δ 3,96 ppm (3H), evidenciando a presença de metoxila na molécula. Comparando os dados obtidos na análise de RMN de ^1H com os citados em literatura (Tabela 9), sugere-se que essa substância seja a cardamonina (2'4'-diidroxí-6'-metoxi-chalcona) (KRISHNA; CHAGANTY, 1972; ADEROGBA et al., 2012).

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da cardamonina e dados descritos em literatura

Hidrogênios	Dados obtidos	Dados de literatura
2' – OH	δ 14,16 ppm (s, 1H)	δ 13,71 ppm (s, 1H)
H α	δ 7,81 ppm (d, 1H, $J = 15,5$ Hz)	δ 7,72 ppm (d, 1H, $J = 15,5$ Hz)
H β	δ 7,91 ppm (d, 1H, $J = 15,5$ Hz)	δ 7,87 ppm (d, 1H, $J = 15,5$ Hz)
H-1 a H-6	δ 7,43 ppm (m, 3H) e δ 7,63 ppm (m, 2H)	δ 7,32 ppm (m, 3H) e δ 7,37 ppm (m, 2H)
3'	δ 5,99 ppm (d, 1H, $J = 2,1$ Hz)	δ 5,94 ppm (d, 1H, $J = 2$ Hz)
5'	δ 6,06 ppm (d, 1H, $J = 2,1$ Hz)	δ 6,02 ppm (d, 1H, $J = 2$ Hz)
- OCH $_3$	δ 3,96 ppm (s, 3H)	δ 3,87 ppm (s, 3H)

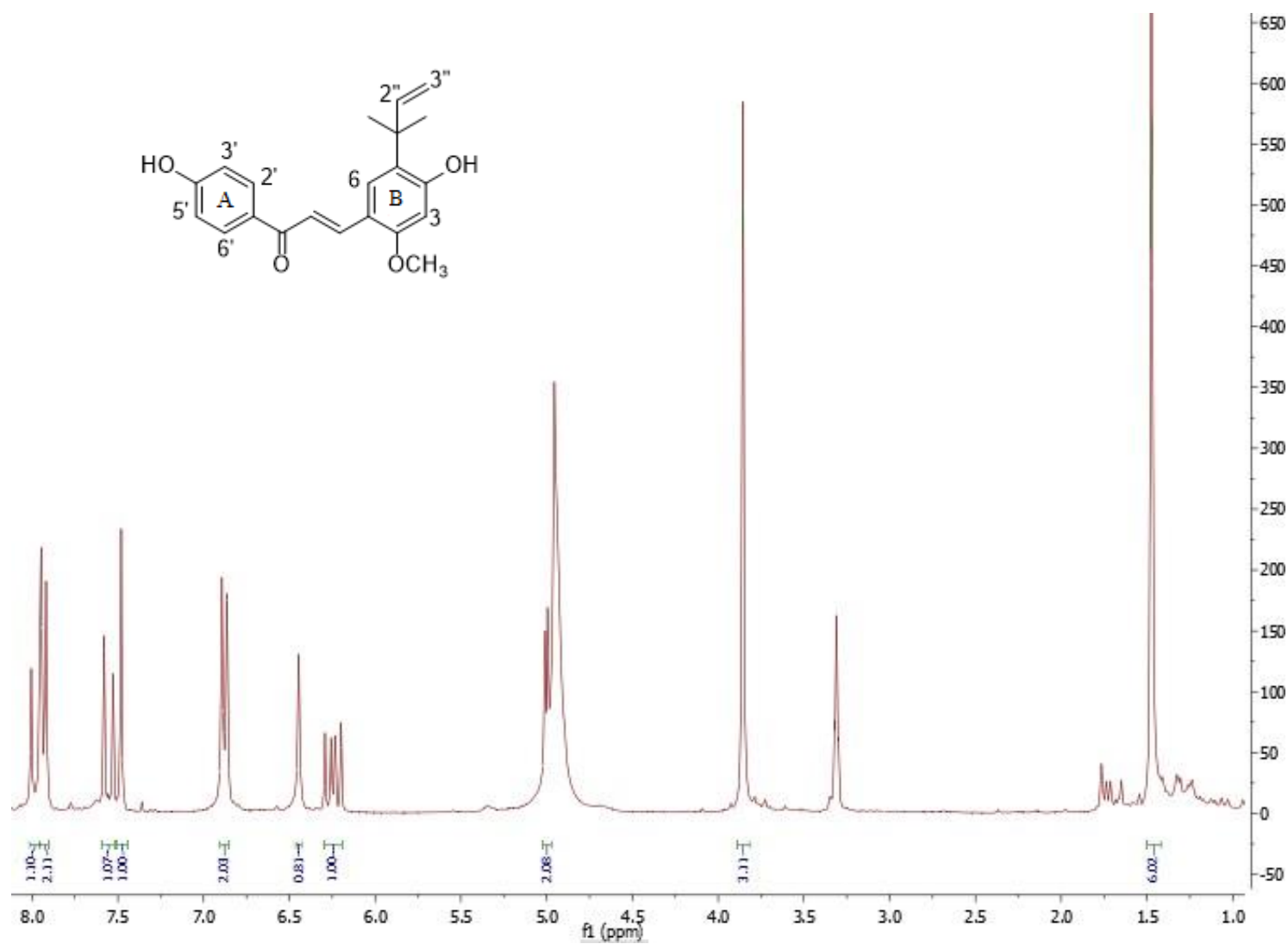
4.3.2 Licochalcona A

A licochalcona A isolada foi submetida a técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e os resultados obtidos foram comparados com a literatura, sendo confirmada a identificação da substância. Os espectros obtidos, bem como suas expansões, estão mostrados na figura 34. Os sinais observados indicam a presença de pelo menos 10 hidrogênios magneticamente diferentes. Após a integração, verificou-se a presença de 20 hidrogênios.

A análise do espectro de RMN de ^1H revela a presença dois dupletos em δ 7,57 (1H, $J = 15,6$ Hz) e δ 7,99 (1H, $J = 15,6$ Hz), que correspondem aos hidrogênios da α , β insaturação. Essa constante de acoplamento permite inferir que a chalcona encontra-se na conformação *trans* (PAVIA; KRIS; LAMPMAN, 2010).

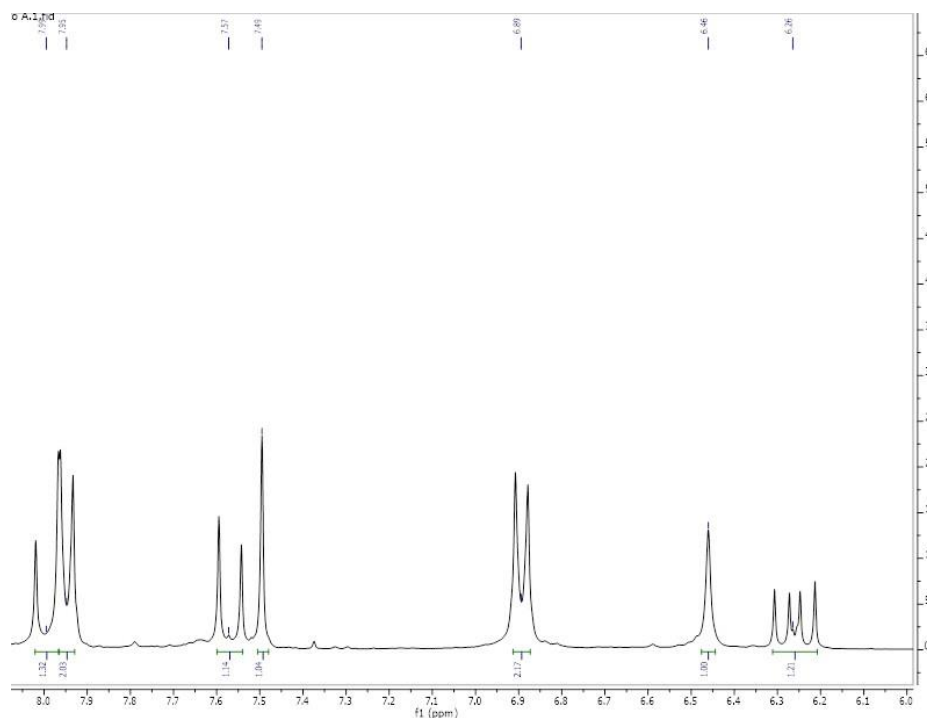
Na região de δ 7,00 ppm (Figura 35), é possível observar os sinais dos hidrogênios aromáticos (anéis A e B), da seguinte forma: um duplete correspondente aos hidrogênios H2' e H6' (δ 7,95 ppm, 2H, $J = 8,7$ Hz); um duplete correspondente aos hidrogênios H3' e H5' (δ 6,89 ppm, 2H, $J = 8,7$ Hz); um simpleto correspondente ao H6 (δ 7,49 ppm, 1H); e um simpleto correspondente ao H3 (δ 6,46 ppm, 1H). Os sinais referentes aos hidrogênios H2' e H6', assim como H3' e H5', aparecem no mesmo deslocamento químico devido a simetria do anel A da licochalcona A. O par de hidrogênios H2' e H6' apresenta maior deslocamento químico que o par H3' e H5', porque estão em posição orto e sofrem desblindagem pela conjugação com os hidrogênios da α , β insaturação (PAVIA; KRIS; LAMPMAN, 2010).

Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da licochalcona A



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Figura 35 - Expansão da região de δ 7,00 ppm do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da licochalcona A



Fonte: Elaborado pela própria autora.

Outros sinais observados no espectro referem-se aos hidrogênios do substituinte na posição 5 da licochalcona A. Pode-se observar um simpleto de δ 1,48 ppm, integrado para 6 hidrogênios. Além disso, há um sinal de multipletto integrado para dois hidrogênios com δ 5,02 ppm, que corresponde aos H3'' , e um duplo dupletto integrado para 1 H em δ 6,26 ppm ($J_{\text{cis}} = 10,5 \text{ Hz}$; $J_{\text{trans}} = 17,7 \text{ Hz}$), correspondente ao H2'' . O maior deslocamento observado para o H2'' é justificado pela desblindagem gerado pelos elétrons π do anel B.

Por fim, observa-se um simpleto em δ 3,87 ppm, integrado para 3H, característico do grupo metoxila.

Comparando os dados obtidos na análise de RMN de ^1H com os citados em literatura (Tabela 10), sugere-se que essa substância seja a licochalcona A (NALDEMAN et al., 1997).

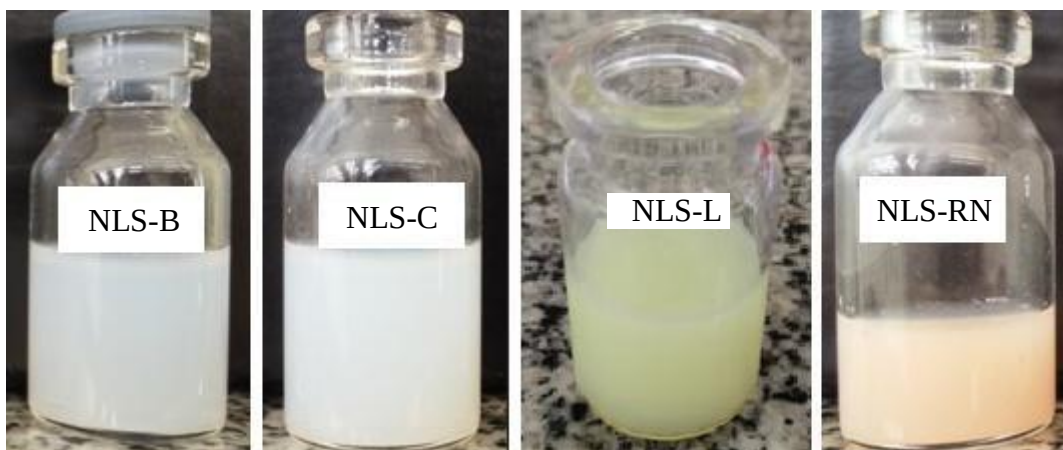
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da licochalcona A e dados descritos em literatura

Hidrogênios	Dados obtidos	Dados de literatura
H β	δ 7,99 ppm (d, 1H, J = 15,6 Hz)	δ 7,95 ppm (d, 1H, J = 15,5 Hz)
H2' e H6'	δ 7,95 ppm (d, 2H, J = 8,7 Hz)	δ 7,95 ppm (d, 2H, J = 9,0 Hz)
H α	δ 7,57 ppm (d, 1H, J = 15,6 Hz)	δ 7,59 ppm (d, 1H, J = 15,5 Hz)
H-6	δ 7,49 ppm (s, 1H)	δ 7,55 ppm (s, 1H)
H3' e H5'	δ 6,89 ppm (d, 2H, J = 8,7 Hz)	δ 6,93 ppm (d, 2H, J = 9,0 Hz)
H3	δ 6,46 ppm (s, 1H)	δ 6,51 ppm (s, 1H)
H2''	δ 6,26 ppm (dd, 1H, J = 10,5; 17,5 Hz)	δ 6,23 ppm (dd, 1H, J = 10,5; 17,5 Hz)
H3''	δ 5,02 ppm (m, 2H)	δ 4,96 ppm (d, 1H, J = 10,5 Hz) δ 4,9 ppm (d, 1H, J = 17,5 Hz)
OCH $_3$	δ 3,87 ppm (s, 3H)	δ 3,85 ppm (s, 3H)
CH $_3$	δ 1,48 ppm (s, 6H)	δ 1,44 ppm (s, 6H)

4.4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NLS

4.4.1 Caracterização físico-química

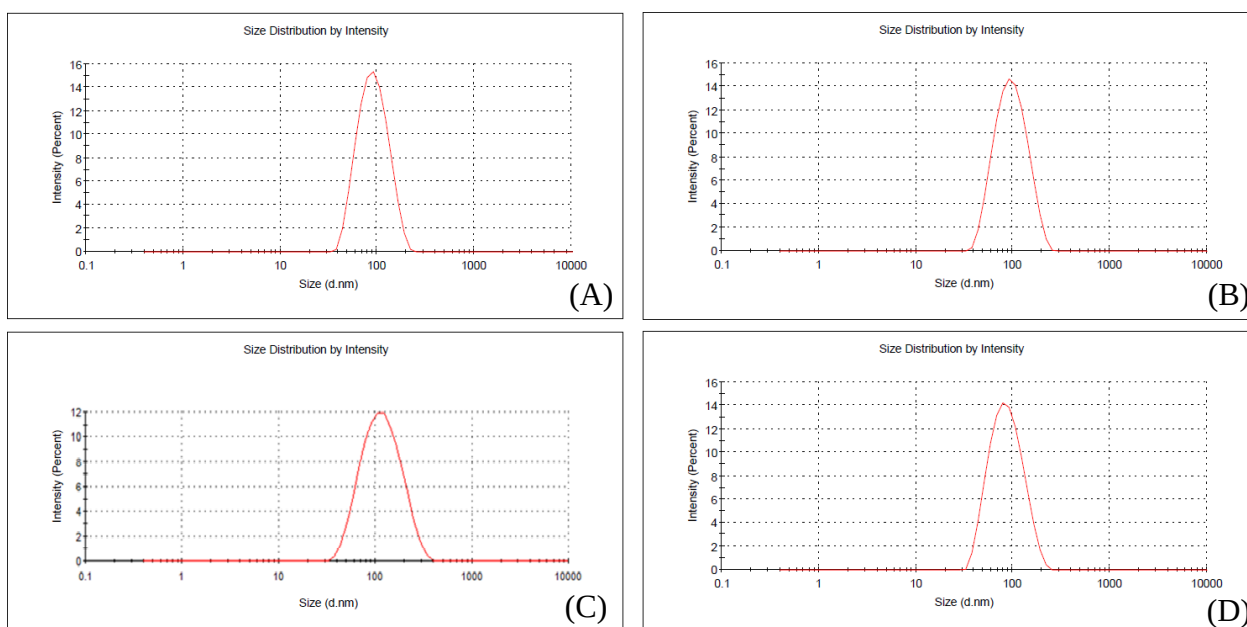
A caracterização de nanopartículas envolve diversas etapas, desde a avaliação macroscópica até a visualização microscópica. Visualmente, é possível identificar se o sistema disperso obtido é homogêneo (Figura 36), não sendo evidenciada a separação de fases ou precipitados. As nanopartículas (NLS - C e NLS - L) obtidas apresentaram coloração levemente amarelo a branco perolado e boa fluidez. Já as NLS - B apresentaram aspecto branco perolado. As NLS - RN apresentaram coloração levemente rosa. A coloração observada nas nanopartículas é causada pelas cores das substâncias encapsuladas e da própria manteiga natural utilizada, uma vez que a presença de lipídeos de baixo ponto de fusão facilita a sua dispersão em moléculas menores, diminuindo a viscosidade do meio e provocando o efeito perolado (SOLDATI, 2015). A boa fluidez das NLS é uma característica importante para a administração das nanodispersões, pois permite a escolha de várias vias de administração.

Figura 36 – Caracterização visual de NLS

Sendo: NLS-B = nanopartícula lipídica sólida branca; NLS-C = nanopartícula lipídica sólida com cardamonina; NLS-L = nanopartícula lipídica sólida com licochalcona A; NLS-RN = nanopartícula lipídica sólida com vermelho do nilo.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A homogeneidade das NLS também pode ser comprovada pelos resultados obtidos com a técnica DLS conforme demonstrado nos histogramas de intensidade (Figura 37), nos quais é possível observar a distribuição das partículas em um pico unimodal e simétrico.

Figura 37 – Histogramas de intensidade de NLS

Sendo (A): NLS-B; (B): NLS-C; (C): NLS – L; (D): NLS – RN.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Conforme os dados apresentados na tabela 11, as formulações de NLS apresentaram-se como sistemas dispersos, com baixos valores de Pdl, satisfatório tamanho de partícula,

além de reprodutíveis. Por isso, o método utilizado para o desenvolvimento das nanopartículas pode ser considerado eficaz. O tamanho médio das nanopartículas NLS-B foi igual a $89,66 \pm 1,3$ nm. A incorporação de substâncias isoladas (cardamonina e licochalcona A) e do corante vermelho do nilo alterou o tamanho da partícula quando comparada ao sistema NLS-B devido às interações da substância com os constituintes da manteiga e pelo preenchimento de espaços vazios, gerando tamanhos médios iguais a $90,57 \pm 3,3$ nm para NLS-C, $101,01 \pm 1,8$ nm para NLS-L e $81,28 \pm 0,5$ para NLS-RN.

Tabela 11 – Resultados obtidos na caracterização físico-química das NLS

	NLS – B	NLS – C	NLS – L	NLS – RN
Tamanho de partícula (nm)	$89,66 \pm 1,3$	$90,57 \pm 3,3$	$101,07 \pm 1,8$	$81,28 \pm 0,5$
PdI	$0,23 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,02$
Potencial Zeta (mV)	$-34,8 \pm 3,6$	$-31,58 \pm 4,3$	$-32,34 \pm 2,9$	$-31,2 \pm 4,6$
pH	6,26	6,30	6,32	--

NLS-B: nanopartículas lipídica sólida branca; NLS-C: nanopartículas lipídica sólida com cardamonina; NLS-L: nanopartícula lipídica sólida com liochalcona A; NLS-RN: nanopartícula lipídica sólida com vermelho do nilo.

Todos os valores representam média + desvio padrão (n=5)

O tamanho das nanopartículas é um fator muito importante para a obtenção da atividade esquistossomicida. Em alguns estudos anteriores foram descritas nanopartículas de 55 a 500 nm, sendo observado que partículas menores geraram melhores resultados esquistossomicidas (SOUZA et al., 2014; EISSA et al., 2015). Supostamente, partículas menores possuem melhor capacidade de permeação no tegumento do parasito promovendo maior atividade. Além disso, para atravessar facilmente a barreira de células intestinais, quando administradas oralmente, as nanopartículas precisam ter um tamanho médio inferior que 400 nm (SUH et al., 2009). De acordo com Bhandari e Kaur (2013), partículas menores que 200 nm geralmente são invisíveis ao sistema retículo endotelial e permanecem no sistema circulatório por um período maior. Assim, o tamanho médio das SLN obtidas foi satisfatório para ensaios esquistossomicidas.

O PdI também alterou quando comprados o sistema branco e encapsulados, porém nos quatro nanosistemas manteve-se menor que 0,3, indicando homogeneidade das amostras (LIU; WU, 2010). Os valores de PdI obtidos foram: para NLS-B, $0,23 \pm 0,04$; para NLS-C, $0,13 \pm 0,03$; para NLS-L, $0,17 \pm 0,01$; e para NLS-RN, $0,15 \pm 0,02$. Assim, a incorporação das substâncias reduziu o valor de PdI, contribuindo para a homogeneidade do sistema.

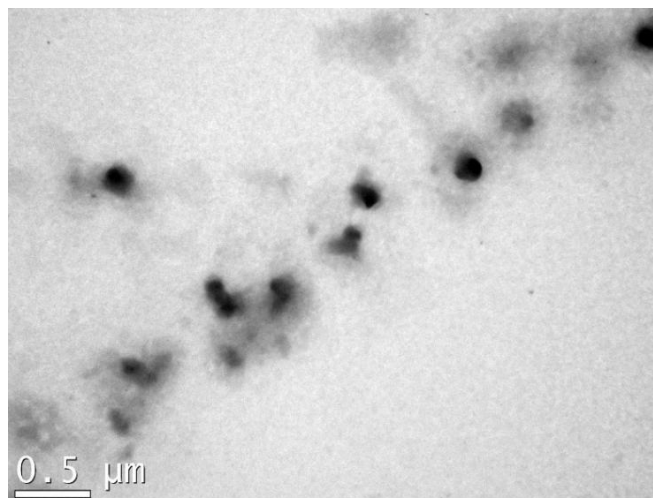
Finalmente, os valores de potencial zeta obtidos foram $-34,8 \pm 3,6$ mV para NLS-B; $-31,58 \pm 4,3$ mV para NLS-C; $-32,34 \pm 2,9$ mV para NLS-L; e $-31,2 \pm 4,6$ mV para NLS-RN. Todos os sistemas apresentaram valores maiores do que 30 mV em módulo, indicando boa estabilidade dos sistemas devido à repulsão eletrostática entre partículas (MOHANRAJ; CHEN, 2006). A classe de tensoativo utilizado no preparo das NLS foi o Pluronic F-127, um copolímero não iônico e que, por isso, pouco contribui para a carga observada nas nanodispersões. Entretanto, contribui para a estabilidade dos sistemas devido ao impedimento estérico gerado pela extensa cadeia monomérica em torno nas nanopartículas. Em relação à carga negativa observada na superfície das nanopartículas, a manteiga de cupuaçu é uma mistura de ácidos graxos que, em ambiente aquoso, desprontonam e tornam a superfície da nanopartícula carregada negativamente, contribuindo para a estabilidade do sistema. Além do tamanho, potencial zeta e PDI satisfatórios, o pH das nanodispersões foi próximo ao pH fisiológico, sendo um importante fator a ser considerado para o uso posterior em ensaios *in vivo*.

4.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

No intuito de confirmar e complementar os resultados obtidos pela técnica DLS, a morfologia das NLS foi determinada por MET. A imagem (Figura 38) obtida mostrou que as nanopartículas da dispersão NLS-L apresentam formato esférico, distribuídas homogeneamente, com tamanho médio de partícula igual a 90 nm, indicando correspondência entre as técnicas de MET e DLS. Esse resultado confirma o resultado obtido por DLS, sendo que as técnicas atuaram de forma complementar.

Durante a microscopia eletrônica só é possível observar o núcleo devido à sua maior densidade eletrônica. Assim, a pequena diferença de tamanho observado entre as técnicas de DLS e MET deve-se a quantidade de polióxi-etileno em torno da nanopartícula.

Figura 38 – Eletromicrografia de transmissão das NLS-L



Fonte: Imagem gentilmente concedida pelo Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

4.4.3 Eficiência de encapsulação (% EE)

A eficiência de encapsulação é um item importante para a caracterização de sistemas nanoestruturados, porque permite conhecer a quantidade real de fármaco envolvida nos processos biológicos estudados. Quanto maior a taxa de encapsulação, menor a quantidade de nanopartículas a ser utilizada em formas farmacêuticas. Uma EE acima de 70% indica um elevado processo de incorporação das substâncias nas nanopartículas (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

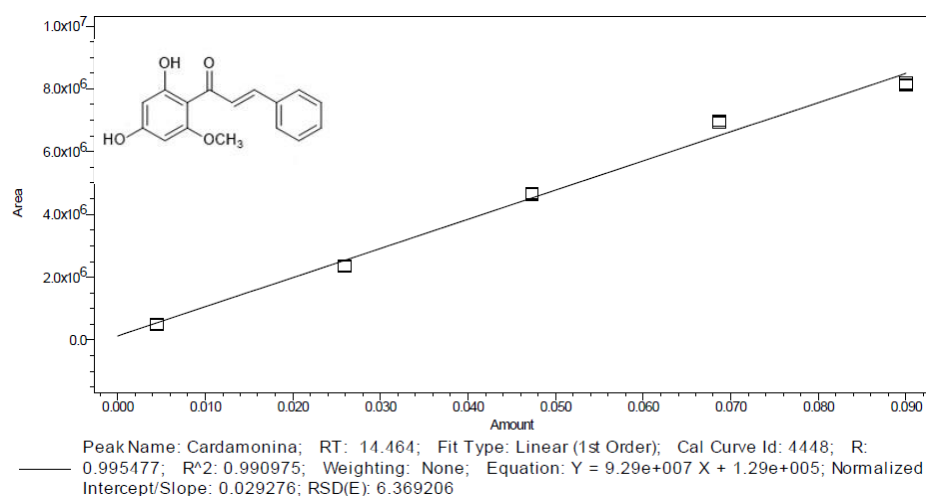
A filtração sob centrifugação é uma etapa anterior à quantificação das substâncias encapsuladas e consiste na separação do que foi encapsulado e o que não foi, ou seja, a quantidade de substância que se encontra livre no meio (EISSA et al., 2015). Essa etapa foi realizada nas NLS-C e NLS-L, já que são as nanopartículas com substâncias de interesse biológico. Após a centrifugação, foi obtido um filtrado transparente e parte da suspensão ficou retida.

Para a quantificação das substâncias não encapsuladas, foi desenvolvida uma curva analítica contemplando de 1 a 20% do teor total de fármaco, analisada por CLAE-DAD. A técnica foi escolhida porque foi utilizada anteriormente para quantificação dessas substâncias e por já ser utilizada pelo grupo de pesquisa do NIPPAN rotineiramente (DE CARVALHO, 2013; DE CASTRO et al., 2015).

4.4.3.1 Cardamonina

Para realização da quantificação de cardamonina livre, foi desenvolvida uma curva analítica com padrão da substância. Para a elaboração da curva, foi selecionado o comprimento de onda para leitura de 345 nm e a fase móvel composta por um sistema isocrático 70% de MeOH em 25 minutos. A curva analítica (Figura 39) obtida para a cardamonina foi $y = 9,29e+007 x + 1,29e+005$, com R^2 igual a 0,990975.

Figura 39 – Curva analítica obtida para quantificação de cardamonina em filtrados de NLS

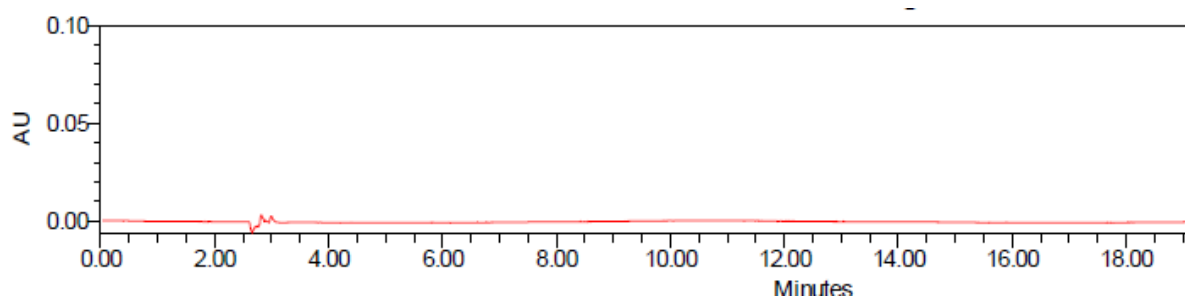


Condição cromatográfica: eluição isocrática, 70 % v/v de MeOH em água acidificada com 0,1 % v/v de ácido acético. Detecção: 345 nm. Volume de injeção: 50 μ L.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

As amostras resultantes dos filtrados foram analisadas por CLAE gerando cromatogramas, nos quais não foi evidenciada a presença de cardamonina (Figura 40), o que pode ser comprovado pela ausência de picos no mesmo tempo de retenção ($TR = 14,4$ minutos) do padrão.

Figura 40 – Perfil cromatográfico do filtrado de NLS-C em CLAE-DAD



Condição cromatográfica: eluição isocrática, 70 % v/v de MeOH em água acidificada com 0,1% v/v de ácido acético. Detecção: 345 nm. Volume de injeção: 50 μ L.

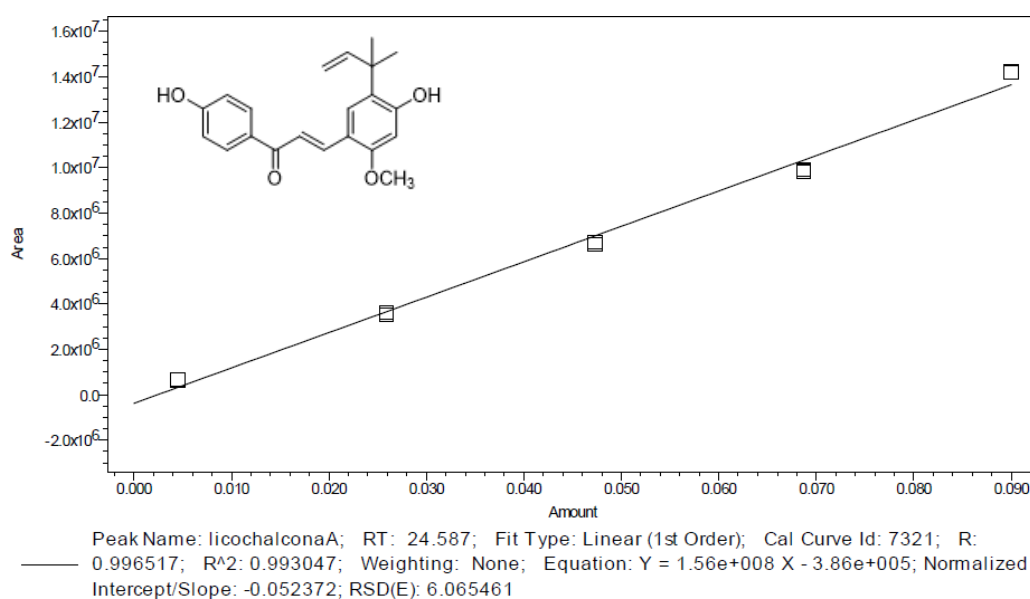
Fonte: Elaborado pela própria autora

Como a curva analítica contemplou de 1 a 20%, o resultado obtido significa uma taxa de encapsulação maior que 99%. Essa taxa de encapsulação é alta e indica que o sistema nanoestruturado proposto foi satisfatório para encapsular a cardamonina.

4.4.3.2 Licochalcona A

Para realização da quantificação de licochalcona livre nas NLS-L, foi desenvolvida uma curva analítica com padrão da substância. O padrão utilizado foi isolado anteriormente pelo grupo de pesquisa do NIPPAN (DE CARVALHO, 2013; XIE et al., 2010b). Para a elaboração da curva, foi selecionado o comprimento de onda para leitura de 382 nm e a fase móvel foi um sistema isocrático 65% de MeOH em 30 minutos. A curva analítica (Figura 41) obtida para a licochalcona A foi $y = 1,56e+008 X - 3,86e+005$, com R^2 igual a 0,993047.

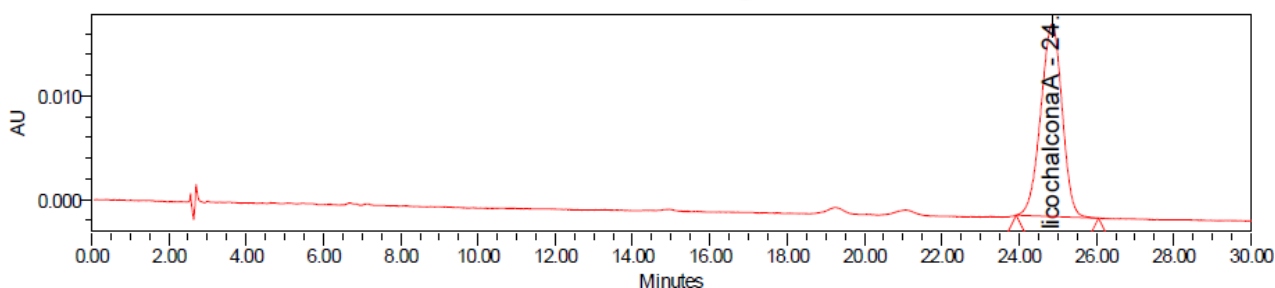
Figura 41 – Curva analítica obtida para quantificação de licochalcona A em filtrados de NLS



Condição cromatográfica: eluição isocrática, 65 % v/v de MeOH em água acidificada com 0,1 % v/v de ácido acético. Detecção: 382 nm. Volume de injeção: 50 µL.

Fonte: Elaborado pela própria autora.

As amostras resultantes dos filtrados foram analisadas por CLAE gerando cromatogramas, nos quais foi evidenciada a presença de licochalcona A (Figura 42), o que pode ser comprovado pela presença de pico no mesmo tempo de retenção (TR = 24,6 minutos) do padrão.

Figura 42 - Perfil cromatográfico do filtrado de NLS-L

Condição cromatográfica: eluição isocrática, 65 % v/v de MeOH em água acidificada com 0,1% v/v de ácido acético. Detecção: 382 nm. Volume de injeção: 50 µL.

Fonte: Elaborado pela própria autora

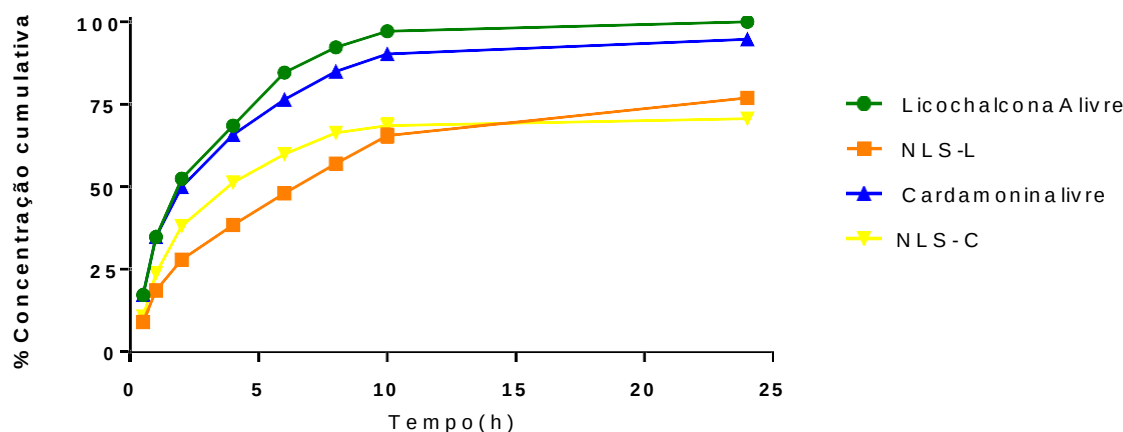
Com a utilização da curva analítica, foi possível obter a concentração de licochalcona A livre na amostra, sendo esse valor igual a 0,0075 mg/mL, o que corresponde a 1,67% da quantidade de licochalcona presente na amostra inicial. Isso significa que a taxa de encapsulamento foi igual a 98,33%. Assim como a cardamonina, o sistema nanoestruturado foi satisfatório para encapsular a licochalcona A.

Por apresentar uma mistura de ácidos graxos diferentes, a composição da manteiga de cupuaçu provoca algumas imperfeições na estrutura lipídica, permitindo maior incorporação de substâncias nas nanopartículas (MULLER; MADER; GOHLA, 2000). Assim, a estrutura lipídica justifica a elevada eficiência de encapsulação observada para as NLS-C e NLS-L.

4.4.4 Ensaio de liberação *in vitro*

Através do ensaio de liberação *in vitro*, é possível calcular a quantidade de massa da substância liberada por unidade de tempo. O estudo do perfil de liberação *in vitro* foi realizado a fim de observar a quantidade de substância liberada por unidade de tempo. A membrana de diálise foi escolhida para a realização do teste por ser quimicamente inerte e não interagir com a formulação ou meio receptor (SOARES, 2009).

O meio receptor utilizado foi solução de cloreto de sódio a 0,9% com 10% de etanol, devido a solubilidade das substâncias livres. Os valores de leitura de absorbância do grupo NLS-B foram utilizados como branco nas leituras de NLS-L e NLS-C. A curva analítica obtida por espectroscopia para a licochalcona A foi $y = 1,108x + 0,065$, com R^2 igual a 0,997. Já para a cardamonina, a curva foi $y = 1,092x + 0,022$, com R^2 igual a 0,992. Os perfis de liberação das NLS e das substâncias livres estão demonstrados da figura 43.

Figura 43 – Perfis de liberação da cardamonina, licochalcona A, NLS-C e NLS-L

Todos os valores representam a média $\pm$ EPM (n=3).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A licochalcona A e cardamonina livres difundiram-se rapidamente pela membrana de diálise, sendo que mais de 90% ($97,16\% \pm 0,21$ da licochalcona A e $90,28\% \pm 0,21$ da cardamonina) foram liberadas do sistema em 10 horas. Em relação às NLS, observou-se que elas possuem liberação não linear, tendo uma rápida liberação nas 2 horas iniciais e depois, uma liberação controlada das substâncias encapsuladas. Após 2 horas iniciais, a NLS-L liberou em média $27,94\% \pm 0,60$ de licochalcona A e a NLS-C liberou em média $38,10\% \pm 0,49$ de cardamonina. Após esse período, foi observada uma liberação controlada alcançando a liberação cumulativa de $76,97\% \pm 1,54$ de licochalcona A e $70,68\% \pm 1,68$ de cardamonina, até o final do estudo (24 horas).

Essa rápida liberação inicial observada deve-se a liberação das substâncias localizadas próximo à superfície da nanopartícula. Considerando que as chalconas possuem hidroxilas na molécula, a explicação para essa localização seria devido a interações com o polióxidoetileno. Esse polímero se localiza externamente na organização micelar, auxiliando a solubilidade das moléculas de licochalcona A e cardamonina e justificando a rápida liberação dessas moléculas (NIE et al., 2011; ALMEIDA et al., 2012; KUPETZ; BUNJES, 2014). A liberação controlada observada nos momentos posteriores deve-se à dispersão das moléculas de licochalcona A e cardamonina na matriz lipídica, comprovada pelo estudo de cinética de liberação. À medida que o lipídeo funde, as moléculas são liberadas lentamente (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014).

Assim, a cinética de liberação foi analisada matematicamente empregando o modelo de regressão linear (Tabela 12). Para isso, foi selecionada a parte linear da curva de liberação

das NLS. Os dados obtidos permitem prever o mecanismo exato de liberação do fármaco, sendo úteis para compreender o comportamento das NLS (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014; RAMTEKE et al., 2014).

Tabela 12 – Modelos matemáticos utilizados para determinação da cinética de liberação da cardamonina e licochalcona A das NLS

Formulação	Modelo cinético	Equação da reta	R ²	J _s (µg cm ⁻² h ⁻¹)	T _L (h)
NLS-C	Ordem-zero	y = 4,672 x + 30,54	0,974		
	Higuchi	y = 20,03 x + 10,36	0,996	20,03	0,48
	Primeira-Ordem	y = 0,039 x + 1,524	0,943		
NLS-L	Ordem-zero	y = 5,053 x + 16,47	0,988		
	Higuchi	y = 21,27 x -2,995	0,997	21,27	0,61
	Primeira-Ordem	y = 0,056 x +1,300	0,922		

J_s: fluxo estacionário; T_L: tempo de latência.

Considerando os resultados obtidos, a liberação da NLS-L e NLS-C seguem o modelo de Higuchi, ou seja, obedece a lei de Fick e depende da raiz quadrada do tempo. Esse modelo indica que a liberação das substâncias é controlada pela difusão através do núcleo lipídico (PEPPAS; NARASIMHAN, 2014). Muitos sistemas de NLS já descritos na literatura seguem a liberação conforme a Lei de Fick (XIE et al., 2010a; KASHANIAN; AZANDARYANI; DERA KHSHANDEH, 2011). No estudo de Xie e colaboradores (2010a), foi observada uma intensa liberação inicial do praziquantel de NLS, seguida de liberação prolongada nas 24 horas seguintes, um perfil semelhante ao observado nesse estudo.

4.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

4.5.1 Estudo de estabilidade das NLS de curta duração

Um dos grandes problemas de estabilidade de NLS é a ocorrência de agregados e a liberação da substância encapsulada no decorrer do tempo. A estabilidade de nanopartículas envolve aspectos físicos químicos e inclui vários fatores como alteração do tamanho e degradação dos constituintes da nanopartícula (MEHNERT; MADER, 2012).

O aumento do tamanho e a variação de potencial zeta durante o decorrer do tempo é um indicativo de instabilidade, por isso esses fatores foram avaliados durante um mês (0, 7,

15, 21 e 30 dias) sob condições de armazenamento diferentes (MULLER; MADER; GOHLA, 2000). Os resultados de potencial zeta, PDI e tamanho de partícula estão representados pelas médias e desvio padrão na tabela 13. Após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente, as NLS-B apresentaram sedimentação em algumas amostras, mas o mesmo não foi observado para NLS-C e NLS-L.

Nos 30 dias avaliados, não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos valores de potencial zeta, PDI e tamanho da partícula das NLS-B e NLS-C, quanto refrigeradas a 4 °C. Entretanto, as NLS-L demonstraram variação significativa de tamanho médio de partícula ($p < 0,05$). Porém essa variação significativa ocorreu na última semana de estudo, indicando que as NLS-L se mantiveram estáveis por pelo menos 21 dias. Além disso, os outros parâmetros avaliados, potencial zeta e PDI, não sofreram variações significativas durante todo estudo.

Quando armazenados em temperatura ambiente, não foi evidenciada nenhuma alteração significativa nos parâmetros avaliados para NLS-B, NLS-C e NLS-L. A diferença entre os resultados observados pode estar relacionada com a solubilidade das substâncias encapsuladas, que pode diminuir em temperaturas menores. De maneira geral, os sistemas nanoestruturados mostraram-se estáveis, principalmente quando mantidos em temperatura ambiente.

Além disso, foi avaliada a influência do meio de cultura RPMI 1640 e DMSO nas nanopartículas (dados não mostrados). Após a incubação das NLS com meio RPMI 1640 e 0,5% de DMSO à 37 °C não foram observadas alterações no meio de cultura e nos parâmetros potencial zeta, tamanho médio da partícula e PDI das NLS.

Tabela 13 – Resultados de potencial zeta, PdI e tamanho médio das NLS submetidas a estudo de estabilidade em temperatura ambiente e refrigeradas a 4 °C

Armazenamento a 4 °C									
Tempo (Dias)	NLS-B			NLS-C			NLS-L		
	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm) *	PdI	Potencial Zeta (mV)
0	89,66 ± 1,3	0,23 ± 0,04	-34,8 ± 3,6	90,57 ± 3,3	0,13 ± 0,03	-31,6 ± 4,3	101,07 ± 1,8	0,17 ± 0,01	-32,3 ± 2,9
7	94,50 ± 13,4	0,40 ± 0,07	-33,1 ± 2,0	93,09 ± 0,4	0,14 ± 0,04	-32,5 ± 0,08	101,70 ± 0,1	0,14 ± 0,006	-32,6 ± 0,28
15	89,40 ± 2,8	0,34 ± 0,02	-33,4 ± 0,4	92,32 ± 2,0	0,17 ± 0,07	-35,7 ± 2,6	107,30 ± 1,8	0,15 ± 0,02	-35,4 ± 0,43
21	88,35 ± 1,9	0,26 ± 0,001	-32,5 ± 0,4	90,18 ± 2,0	0,21 ± 0,008	-31,0 ± 0,4	105,35 ± 1,5	0,21 ± 0,008	-36,2 ± 0,99
30	88,33 ± 2,6	0,26 ± 0,003	-29,3 ± 0,9	96,53 ± 1,3	0,17 ± 0,03	-31,3 ± 1,6	113,70 ± 0,1	0,15 ± 0,03	-31,4 ± 0,92
Armazenamento a temperatura ambiente									
Tempo (Dias)	NLS-B			NLS-C			NLS-L		
	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
0	89,66 ± 1,3	0,23 ± 0,04	-34,8 ± 3,6	90,57 ± 3,3	0,13 ± 0,03	-31,6 ± 4,3	101,07 ± 1,8	0,17 ± 0,01	-32,3 ± 2,9
7	94,50 ± 3,5	0,33 ± 0,008	-33,2 ± 1,3	90,38 ± 2,4	0,16 ± 0,02	- 32,3 ± 0,6	103,70 ± 0,7	0,18 ± 0,004	-33,9 ± 2,1
15	84,25 ± 2,8	0,26 ± 0,008	-30,2 ± 0,4	92,61 ± 1,8	0,18 ± 0,03	-32,3 ± 2,0	102,85 ± 1,5	0,17 ± 0,008	-33,4 ± 1,5
21	87,45 ± 2,3	0,34 ± 0,02	-29,2 ± 0,1	94,97 ± 2,2	0,23 ± 0,04	- 33,2 ± 0,6	103,35 ± 1,5	0,21 ± 0,008	-34,1 ± 4,5
30	93,4 ± 1,1	0,33 ± 0,009	-31,4 ± 0,4	94,69 ± 3,8	0,11 ± 0,02	-30,6 ± 0,1	107,70 ± 0,1	0,15 ± 0,03	-35,7 ± 0,7

Resultados representam a média + desvio padrão (n=3).

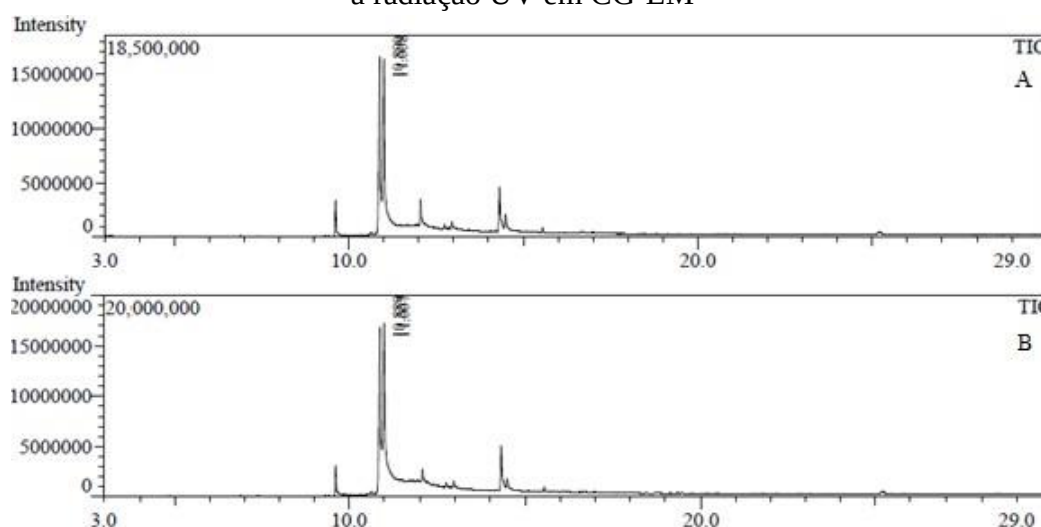
* Diferença significativa quando comparado os resultados de 30 dias com 0 dias (p < 0,05).

4.5.2 Avaliação da composição lipídica da manteiga de cupuaçu frente à exposição UV por CG-EM

Um dos sistemas mais utilizados para a esterilização de nanosuspensões é a filtração em filtro com poro de 0,22 μm . Entretanto muitas vezes não é possível utilizar o sistema devido à viscosidade e quantidade de nanopartículas na suspensão, sendo necessários outros métodos para a esterilização das NLS. Diante disso, a exposição à radiação UV pode ser uma alternativa, já que possui efeito bactericida dependente da intensidade e tempo de exposição. Além disso, a radiação UV é amplamente utilizada em esterilização do ar, superfícies de equipamentos e em embalagens de alimentos (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002; ALEXANDRE; FARIA; CARDOSO, 2008).

Dessa forma, foi analisada a estabilidade das nanopartículas frente à radiação UV, já que esse pode ser um método eficaz de esterilização das suspensões (LI et al., 2013a). Entretanto, considerando a natureza lipídica do núcleo das nanopartículas, é necessário verificar os possíveis impactos dessa radiação, uma vez que pode provocar oxidação dos constituintes do lipídeo. Alterações na constituição lipídica podem ocasionar alterações na estabilidade das nanopartículas, por isso, para verificar o efeito dessa radiação nos lipídeos, a manteiga de cupuaçu foi analisada por CG-EM antes (Figura 44A) e após (Figura 44B) a exposição à radiação UV por 30 minutos (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Figura 44 – Perfil cromatográfico da amostra de manteiga de cupuaçu antes e após exposição à radiação UV em CG-EM



Sendo A: cromatograma obtido antes da exposição à radiação UV; B: cromatograma obtido após a exposição à radiação UV;

Condições Cromatográfica: gás de arraste: hélio; temperatura do forno de 60°C a 240°C, em 40 minutos e em gradiente linear, com manutenção da temperatura por 5 minutos na primeira e última temperatura.

Fonte: Elaborado pela própria autora

A análise dos espectros de massa permitiu identificar os constituintes da manteiga de cupuaçu com o auxílio da biblioteca NIST11.s.lib. Antes da exposição à radiação UV os seguintes constituintes foram observados: ácidos saturados [ácido palmítico (C_{16}); ácido esteárico (C_{18})] e ácidos insaturados [ácido oléico (C_{18}); ácido linoléico (C_{18}); e ácido araquídico (C_{20})], sendo estes constituintes listados como sendo os principais da manteiga de cupuaçu (COHEN et al., 2009; SOLDATI, 2015).

Dessa forma, após a exposição à radiação UV, a composição da manteiga de cupuaçu não se alterou, já que foi obtido cromatograma muito semelhante (Figura 44B) ao obtido antes da exposição (Figura 44A). Assim, a radiação UV pode ser uma alternativa para auxiliar a esterilização dessas nanopartículas lipídicas sólidas.

4.6 TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

4.6.1 Viabilidade celular

As NLS foram avaliadas quanto a citotoxicidade através do método colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que consiste na quantificação do cristal formazan (coloração roxa) devido a ação das enzimas desidrogenases mitocondriais. Essas enzimas estão presentes em células metabolicamente viáveis e clivam o anel de tetrazólio, gerando o formazan (MOSMANN, 1983; RISS et al., 2013).

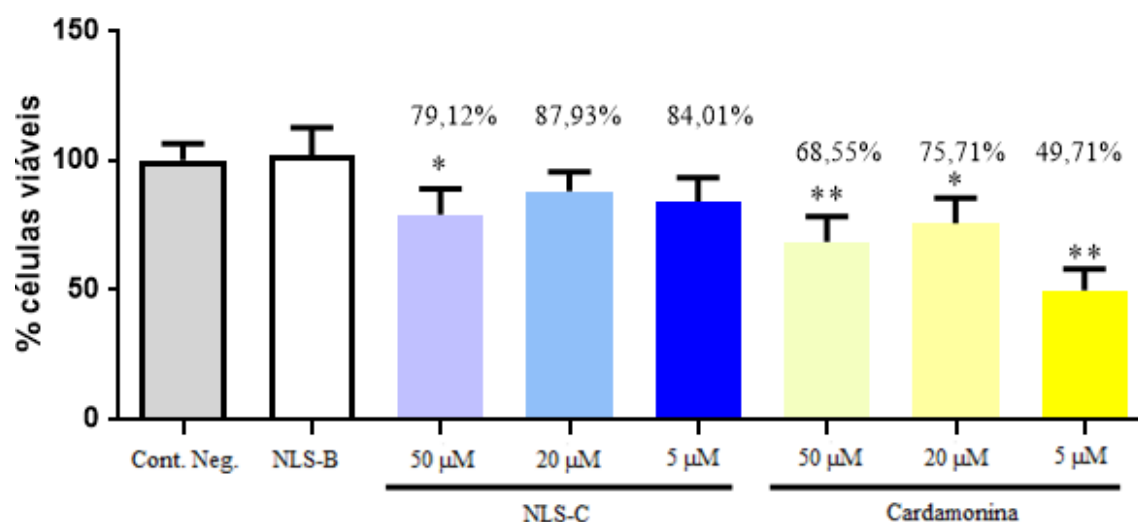
O ensaio de MTT em macrófagos da linhagem celular J774 permitiu avaliar a citotoxicidade das substâncias livres e nanoencapsuladas em diferentes concentrações (5, 20 e 50 μ M). Tanto a cardamonina livre quanto encapsulada demonstraram um perfil de viabilidade celular menor que o controle negativo (meio de cultura) em diferentes concentrações (Figura 45). Porém, em todas as concentrações testadas, as NLS-C apresentaram menor toxicidade do que a substância livre, evidenciando uma diminuição da citotoxicidade para a linhagem de macrófagos J774 da substância quando encapsulada.

Em estudos anteriores, a toxicidade da cardamonina foi avaliada por MTT em células Vero mamíferas (fibroblastos de rim de macacos) (ADEROGBA et al., 2012; DE CASTRO et al., 2015). No estudo de Aderogba e colaboradores (2012), a cardamonina apresentou LC_{50} = 7,29 μ M e inviabilidade celular na concentração de 50 μ g/mL.

Contudo, para as células de macrófagos (linhagem J774), a cardamonina livre apresentou toxicidade nas concentrações de 5, 20 e 50 μ M, quando comparadas com o

controle negativo (meio de cultura). Já as NLS-C mantiveram a viabilidade celular acima de 79% em todas as concentrações testadas.

Figura 45 – Gráfico de viabilidade celular em macrófagos da linhagem celular J774 tratados com cardamonina e NLS-C



Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (barras) dos ensaios em triplicata.

* Diferença significativa quando comparado com meio de cultura ($p < 0,05$), controle negativo.

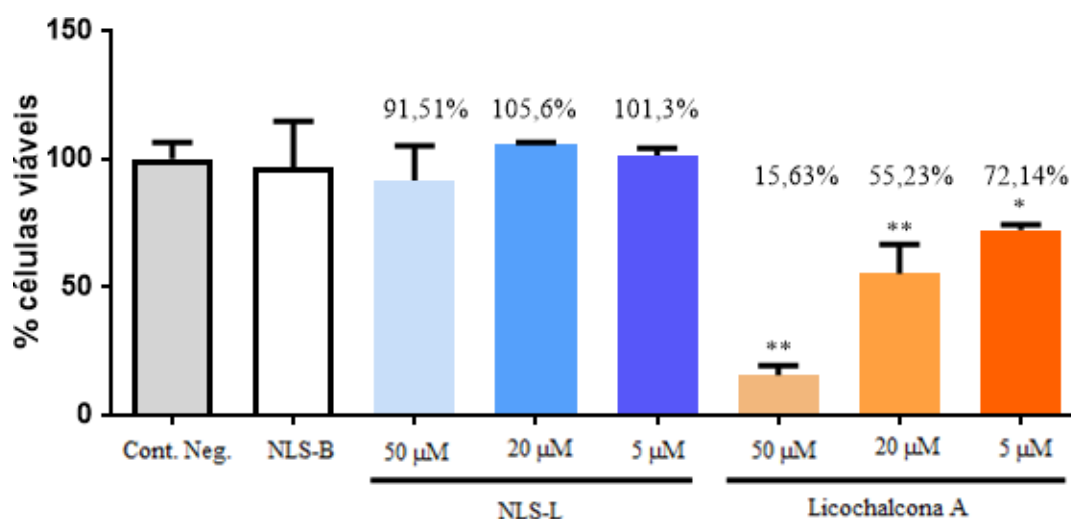
** Diferença significativa quando comparado com meio de cultura ($p < 0,01$), controle negativo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação aos resultados obtidos para a licochalcona A livre, a substância apresentou forte toxicidade frente à linhagem celular utilizada, chegando a apresentar resultados de viabilidade celular inferiores a 20% na concentração de 50 µM. Além disso, os resultados obtidos com a licochalcona A livre mostraram que a substância apresenta um perfil de toxicidade dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração da licochalcona A, maior a toxicidade e menor a viabilidade celular. Estudos anteriores mostram que a licochalcona A apresenta citotoxicidade para células de fibroblasto do prepúcio humano (HFF) em concentrações maiores que 9 µg/mL (SI et al., 2018).

Contudo, quando comparados aos resultados obtidos com controle negativo, as NLS-L mantiveram a viabilidade celular próxima a 100% em todas as concentrações testadas e não apresentaram diferença significativa em relação ao meio de cultura (Figura 46). Assim, a encapsulação reduziu significativamente a toxicidade da licochalcona A para células de macrófago (linhagem J774).

Figura 46 – Gráfico de viabilidade celular em macrófagos da linhagem celular J774 tratadas com licochalcona A e NLS-L



Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (barras) dos ensaios em triplicata.

* Diferença significativa quando comparado com meio de cultura ($p < 0,05$), controle negativo.

** Diferença significativa quando comparado com meio de cultura ($p < 0,01$), controle negativo.

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com a ISO 10993:5 (2009), valores de viabilidade celular inferiores a 70% são atribuídos a substâncias tóxicas. Assim, tanto as NLS-C quanto as NLS-L permitiram viabilidade celular satisfatória, comprovando que a encapsulação das substâncias garante uma vantagem adicional para as células. Além dessas observações, é importante ressaltar que as NLS-B mantiveram 100% de viabilidade celular nos dois estudos, reafirmando a ausência de toxicidade desse sistema nanoparticulado.

4.6.2 Teste de hemólise

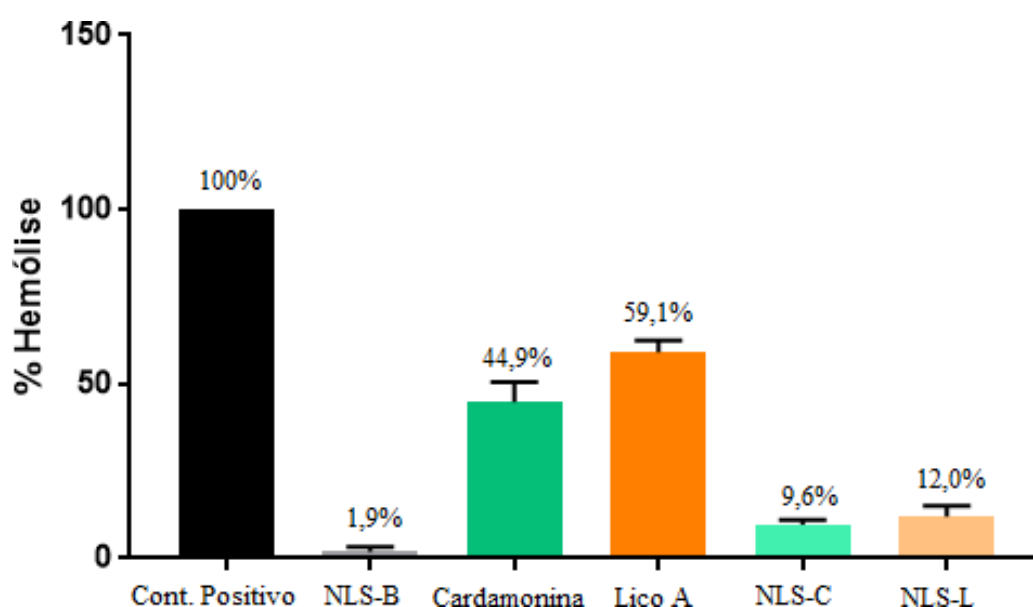
A atividade hemolítica tem sido uma forte aliada no estudo de toxicidade *in vitro* de nanopartículas lipídicas sólidas (JOSHI; MÜLLER, 2009). Ao entrar em contato com o plasma sanguíneo, um material estranho sofre a adsorção de proteínas na superfície e desencadeia a cascata de coagulação, podendo ocasionar danos como trombos, isquemias, além da possibilidade de hemólise (ZAGO; FALCAO; PASQUINI, 2004). A hemólise pode causar anemia severa em algumas situações, sendo um importante parâmetro avaliado na toxicidade de nanopartículas, além de permitir o conhecimento de danos de membrana

provocados pela formulação (JUMAA; MULLER, 2000; BENDER et al., 2012; EISSA et al., 2015).

Como mostrado na figura 47, após uma hora de exposição dos eritrócitos com as substâncias isoladas (cardamonina e licochalcona A) ocorreu indução de hemólise. A licochalcona A livre provocou 59,1% de hemólise após uma hora. Em estudo realizado por Egler e Lang (2015) foi demonstrado que a licochalcona A provoca o encolhimento de eritrócitos e migração na membrana celular com translocação de fosfatidilserina para a superfície dos eritrócitos, causando hemólise. Esse estudo corrobora com o resultado obtido, justificando a hemólise observada para a licochalcona A livre. Entretanto, a encapsulação da licochalcona A em NLS diminuiu a taxa de hemólise provocada pela substância para 12,0%.

A cardamonina livre apresentou menor atividade hemolítica (44,9%) que a licochalcona A. Entretanto, a encapsulação da substância também reduziu a hemólise para 9,6%. O baixo potencial hemolítico das NLS sugere que a nanopartícula diminui a interação das substâncias com componentes do sangue (EISSA et al., 2015).

Figura 47 – Atividade hemolítica da cardamonina, licochalcona A e NLS em eritrócitos humanos



Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (barras) dos ensaios em triplicata. Todos os compostos testados apresentaram diferença significativa quando comparado com o controle positivo e com as NLS-B.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO*

Várias substâncias naturais possuem potencial efeito contra o *S. mansoni* (MAGALHÃES et al., 2009; DIAS et al., 2017; LAGO et al., 2018). Entre elas, podemos citar a cardamonina e a licochalcona A como substâncias esquistossomicidas (CARVALHO et al., 2013; DE CASTRO et al., 2015; SOUZA et al., 2017). Com o auxílio da nanotecnologia, espera-se ampliar essa atividade, reduzindo a quantidade de substância necessária para a obtenção da atividade esquistossomicida e aumentando a entrega das substâncias para o parasito.

Nesse sentido, as NLS-C e NLS-L foram avaliadas contra vermes adultos de *S. mansoni*, nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μM . Essas concentrações foram escolhidas baseadas nos ensaios esquistossomicidas *in vitro* descritos na literatura (MAGALHÃES et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009; DE CASTRO et al., 2015). Além disso, para permitir comparação dos sistemas nanoestruturado, também foram avaliadas as substâncias livres nas mesmas concentrações (100, 50, 25 e 12,5 μM). As NLS-B foram utilizadas como controle para verificar se a atividade esquistossomicida observada nos ensaios com as nanopartículas foi devida às atividades das substâncias encapsuladas ou do núcleo lipídico. Para isso, foram utilizados volumes de suspensão coloidal de NLS semelhante ao utilizado para a NLS-C e NLS-L. Ainda foram utilizados PZQ a 2 μM como controle positivo e meio RPMI 1640, contendo ou não DMSO 0,5% como controles negativos.

De acordo com De Castro e colaboradores (2015), a atividade esquistossomicida da cardamonina está relacionada com a inibição da SmATPase1 e com alterações tegumentares. A substância livre (Tabela 14) ocasionou mortalidade de 100% dos vermes adultos após 24 horas na concentração de 25 μM , e de 50% após 72 horas na concentração de 12,5 μM . O resultado obtido foi semelhante ao já descrito na literatura, onde também foi observada atividade esquistossomicida da cardamonina na concentração de 25 μM após 24 horas (DE CASTRO et al., 2015).

A cardamonina encapsulada em NLS-C também ocasionou a morte de 100% dos vermes adultos após 24 horas de incubação, na concentração de 25 μM . Entretanto, na menor concentração analisada (12,5 μM), a taxa de mortalidade foi menor do que a observada para cardamonina livre, sendo alcançada apenas 10% de mortalidade. Contudo, houve uma redução da atividade motora de 90% dos parasitos nessa concentração, que é um indício de danos ao parasito e importante fator, já que danos na musculatura de helmintos representam um interessante alvo terapêutico, como descrito para a ivermectina e curcumina (NOEL,

2008; MAGALHÃES et al., 2009). Portanto, as atividades esquistossomicidas *in vitro* da cardamonina livre e encapsulada foram semelhantes.

Tabela 14 - Efeitos *in vitro* de cardamonina e NLS-C contra vermes adultos de *S. mansoni*

Grupo	Período de incubação (h)	Mortalidade (%)		Redução da atividade motora (%)			
		M	F	Leve		Significante	
		M	F	M	F	M	F
0,5% DMSO	24 – 72	0	0	0	0	0	0
PZQ 2 µM	24 – 72	100	100	0	0	100	100
NLS-B 50 - 100 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Cardamonina Livre 100 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
12,5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	50	50	0	0
	72	50	50	50	50	50	50
NLS-C 100 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 µM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
12,5 µM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	10	10	90	90	10	10

Por outro lado, a licochalcona A livre (Tabela 15) ocasionou a morte de 100% dos vermes adultos em 24 horas, na concentração de 100 µM. Em concentrações menores de 25 e 50 µM, a substância também ocasionou a morte de 100% dos parasitos, mas em um tempo maior, 72 e 48 horas, respectivamente. Não foi observada atividade esquistossomicida na concentração de 12,5 µM. O resultado obtido é semelhante ao obtido por Carvalho (2013), que também relatou atividade esquistossomicida *in vitro* da substância na concentração de 25

μM , porém em 24 horas. Em outro estudo esquistossomicida, foi relatado que a licochalcona A apresentou $\text{LC}_{50} = 9,12 \mu\text{M}$ (SOUZA et al., 2017).

A licochalcona A possui atividade esquistossomicida conhecida por provocar redução da motilidade do parasito e danos no tegumento do parasito. Recente estudo revelou que a licochalcona A provoca alterações tegumentares na concentração de $10 \mu\text{M}$, como lise tecidual e inchaço mitocondrial (SOUZA et al, 2017). Além disso, a substância também é conhecida por destruir e alterar a função mitocondrial de *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum*, sendo um provável fator associado a mortalidade de parasitos (ZHAI et al., 1995; MI-ICHI et al., 2005).

Tabela 15 - Efeitos *in vitro* de licochalcona A e NLS-L contra vermes adultos de *S. mansoni*

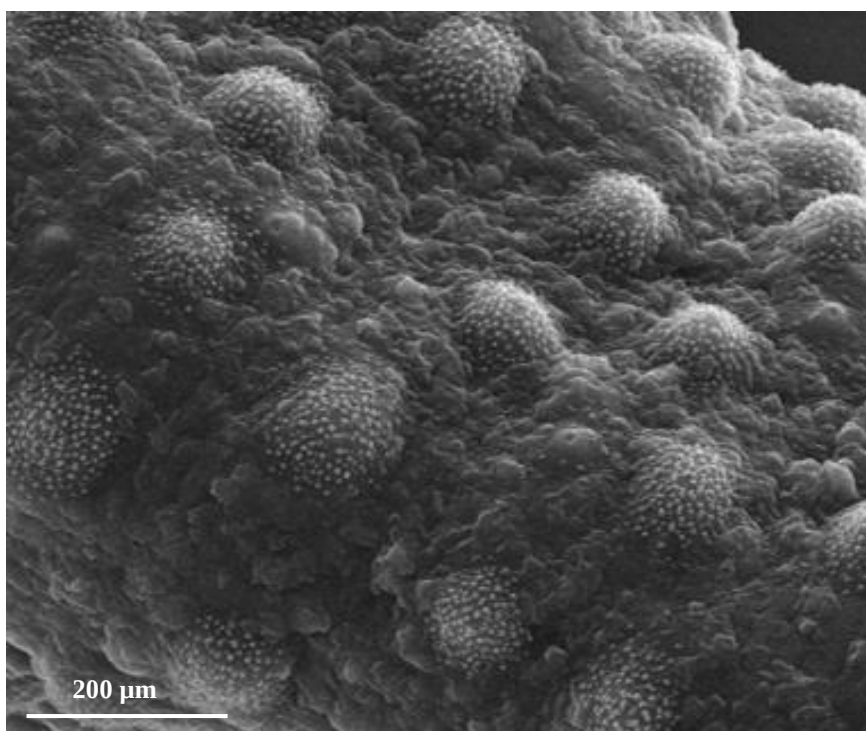
Grupo	Período de incubação (h)	Mortalidade (%)		Redução da atividade motora (%)			
		M	F	Leve		Significante	
		M	F	M	F	M	F
0,5% DMSO	24 – 72	0	0	0	0	0	0
PZQ 2 μM	24 – 72	100	100	0	0	100	100
NLS-B 50 - 100 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Licochalcona A livre 100 μM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	100	0	0	100	100	0
	72	100	100	0	0	100	100
25 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	80	0	0	0
	72	100	0	0	0	100	0
12,5 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	10	0	0	0
NLS-L 100 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
50 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	100	0	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	100	0	0	0	100	0
12,5 μM	24	0	0	0	0	0	0
	48	30	0	0	0	30	0
	72	50	0	0	0	50	0

Conforme observado na tabela 15, as NLS-L também apresentaram atividade esquistossomicida, provocando mortalidade de 100% dos parasitos na concentração de 25, 50 e 100 μM . Porém, o tempo necessário para provocar essa mortalidade foi maior que o observado com a licochalcona A livre. Tal fato deve-se a liberação controlada e prolongada da nanopartícula, gerando atividade tardia em relação a substância livre. Em concentração menor (12,5 μM), as NLS-L causaram a mortalidade de 30% dos parasitos em 48 horas e 50% em 72 horas, resultado melhor do que o observado para a licochalcona A livre nas mesmas condições. Assim, ainda que pouco, as NLS-L potencializaram a atividade esquistossomicida da substância livre.

Por fim, as NLS-B não provocaram nenhuma mortalidade, sugerindo a mortalidade observada nos estudos com nanopartículas está associada à presença das substâncias encapsuladas (licochalcona A e cardamonina).

Além da mortalidade, os parasitos foram avaliados por microscopia de varredura eletrônica para identificação de danos tegumentares. A figura 48 mostra o tegumento de vermes tratados com o controle negativo (DMSO 0,5%), recoberto por tubérculos e espinhos.

Figura 48 – Microscopia eletrônica de varredura do tegumento dos parasitos utilizados como controle negativo



Barras = 200 μm .

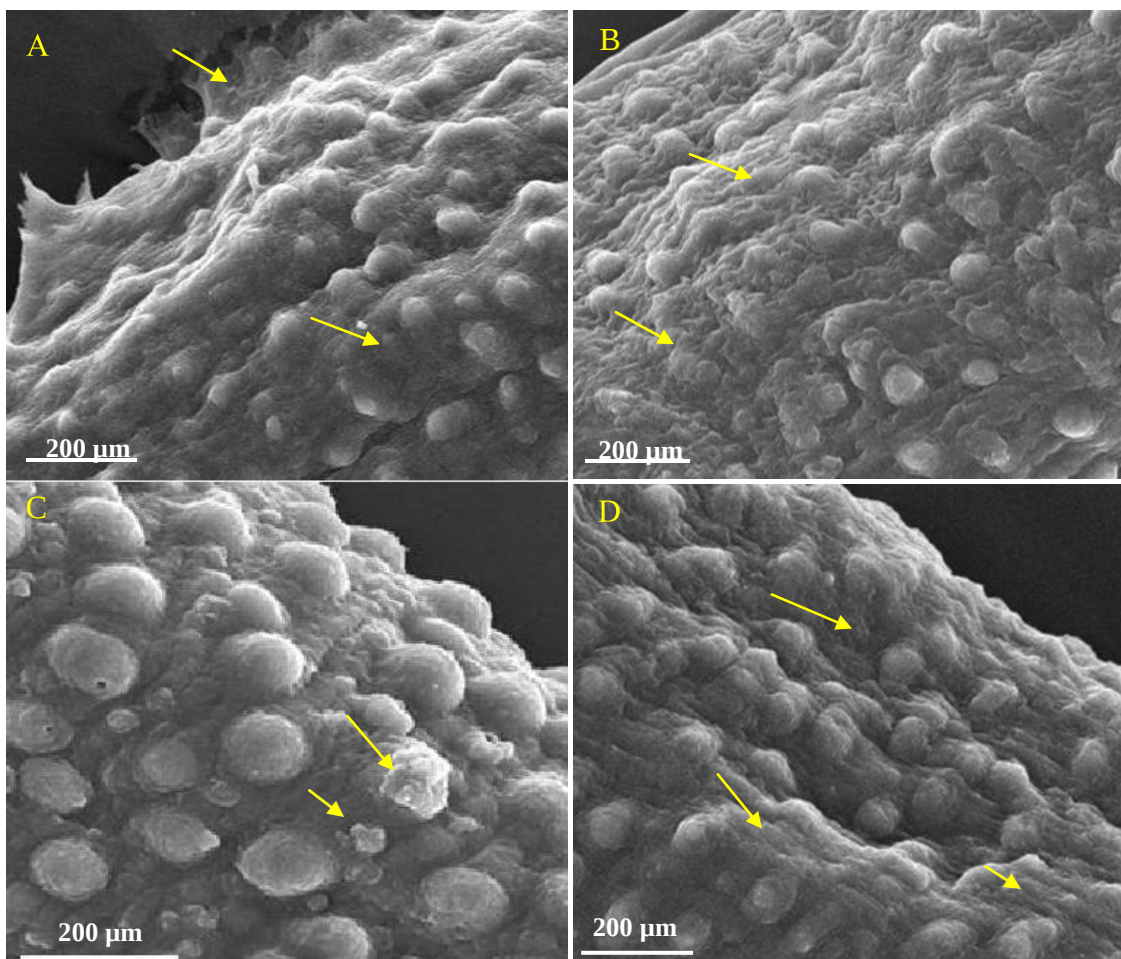
Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP).

Os efeitos da cardamonina, licochalcona A, NLS-C e NLS-L no tegumento também foram avaliados por MEV. Tanto a cardamonina quanto a licochalcona A livres provocaram danos e alterações na superfície tegumentar de vermes adultos machos de *S. mansoni*. A cardamonina livre provocou colapso e ruptura do tecido, além de intensa desintegração de tubérculos (Figura 49A). A licochalcona A também provocou intensa diminuição de tubérculos e espinhos, achatamento de tubérculos e pequenas úlceras no tegumento do parasito (Figura 49 B). Os resultados observados estão em conformidade com outros danos tegumentares já descritos na literatura para substâncias esquistossomicidas (DE CASTRO et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

Quando encapsuladas, a cardamonina e a licochalcona A também provocaram significativos danos no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*. As NLS-C foram capazes de provocar diminuição dos espinhos nos tubérculos, formação de vesículas e rompimento de alguns pontos do tegumento (Figura 49 C). Já as NLS-L provocaram intensa descamação no tegumento, achatamento de tubérculos, além da perda de espinhos (Figura 49 D). Em estudos com nanopartículas destinadas ao tratamento da esquistossomose, já foram citados danos tegumentares semelhantes na literatura (GUIMARÃES et al., 2014; EISSA et al., 2015).

Assim, como o tegumento possui funções essenciais à vida do parasito, a análise do tegumento revela fortes danos à integridade do parasito (SOUZA et al., 2017). Tanto as substâncias livres quanto encapsuladas foram capazes de provocar esses danos, resultados condizentes com a mortalidade observada no ensaio *in vitro* (DE MORAES et al., 2013b; DE MORAES et al., 2014).

Figura 49 – Microscopia eletrônica de varredura do tegumento dos parasitos tratados com cardamonina e licochalcona A livres, NLS-C e NLS-L



Sendo A = tegumento de parasito tratado com cardamonina livre; As setas indicam ruptura do tecido e desintegração de tubérculos.

B = tegumento de parasito tratado com licochalcona A livre; As setas indicam desintegração do tegumento e achatamento de tubérculos.

C = tegumento de parasito tratado com NLS-C; As setas indicam rompimento e vesículas no tegumento.

D = tegumento de parasito tratado com NLS-L; As setas indicam descamação do tegumento e achatamento de tubérculos.

Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Núcleo de Enteroparasitos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo, SP).

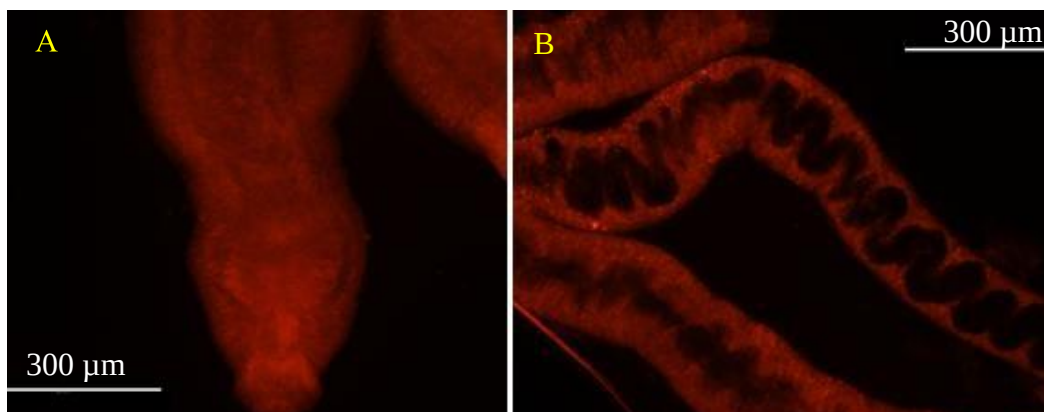
4.8 ENSAIO *IN VITRO* DE PERMEABILIDADE DE NLS NO TEGUMENTO DE *S. mansoni*

A permeabilidade de nanopartículas é essencial para a ocorrência da ação, bem como para a entrega das substâncias nos locais corretos (WANG et al., 2009; JENA et al., 2013). Para determinar a permeação de um sistema nanocarreador, uma das alternativas é a utilização de corantes fluorescentes nas nanopartículas e observação da fluorescência.

As substâncias fluorescentes absorvem radiação eletromagnética devido a sua estrutura molecular. Geralmente compostos que possuem anéis aromáticos fluorescem em grande intensidade e as moléculas alifáticas necessitam de duplas conjugadas para fluorescer (SKOOG et al., 2006). O vermelho do nilo é um corante lipofílico que possui muitas insaturações e anéis conjugados, o que confere a sua fluorescência. Este corante pode ser excitado no comprimento de onda (λ) igual a 450 a 560 nm e sua radiação pode ser medida entre 500 a 750 nm. Além disso, possui alta afinidade com lipídeos, sendo utilizado para marcar nanopartículas lipídicas sólidas (JORES et al., 2005; BATTAGLIA et al., 2010).

Assim, os parasitos recolhidos após a incubação com NLS-RN foram dispostos em lâminas para microscopia e observados por microscopia confocal. Após 1 hora de exposição às NLS-RN, foi possível visualizar fluorescência nos parasitos (Figura 50). Observa-se que a fluorescência ficou delimitada ao tegumento e musculatura do parasito, não atingindo o trato digestivo. Após 2 horas de exposição às NLS-RN, os parasitos continuaram fluorescentes (Figura 51), sendo que a fluorescência continuou delimitada ao tegumento e musculatura do parasito, não atingindo o trato digestivo.

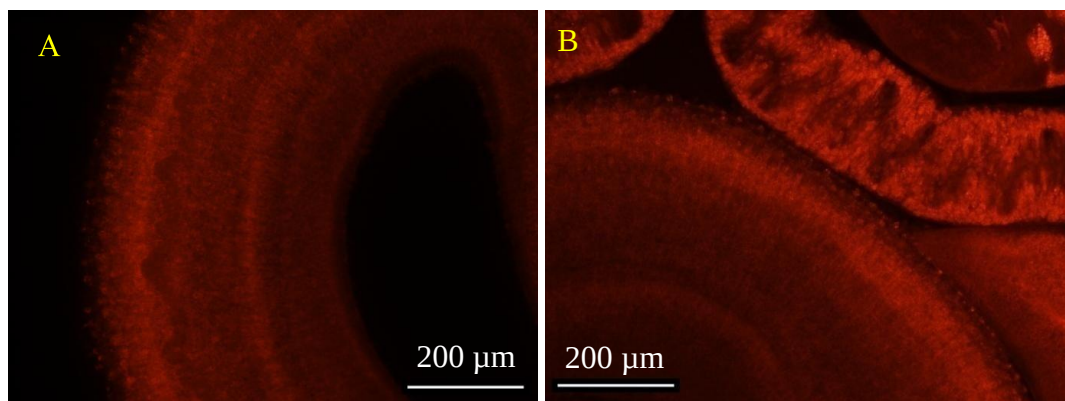
Figura 50 – Imagens demonstrando a fluorescência dos parasitos expostos à NLS-RN por 1 hora, em microscopia confocal



Microscópio confocal em filtro de excitação de $\lambda = 552$ nm e observação da radiação em 578 nm, a 15 ms. Barras = 300 μ m.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 51 – Imagens demonstrando a fluorescência dos parasitos expostos à NLS-RN por 2 horas, em microscopia confocal

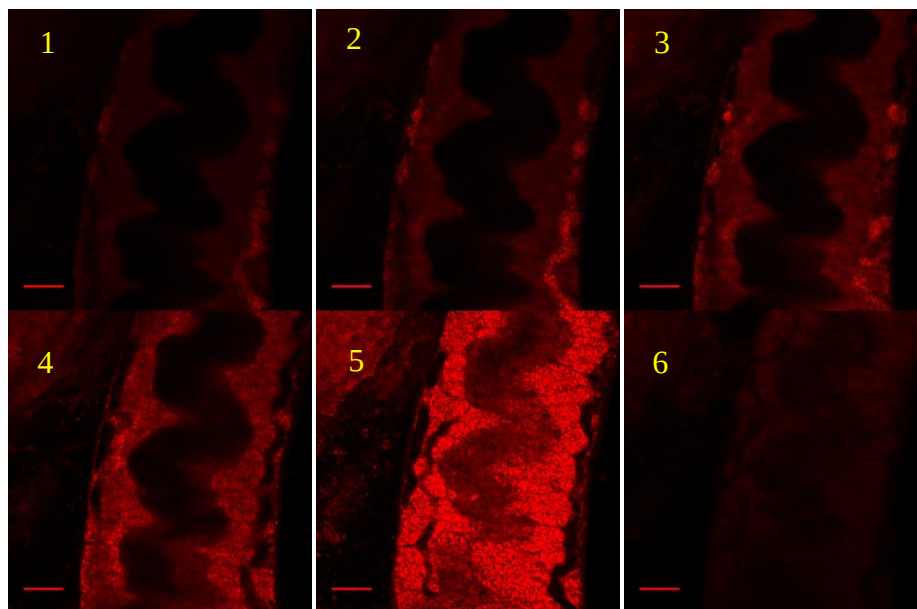


Microscópio confocal em filtro de excitação de $\lambda = 552$ nm e observação da radiação em 578 nm, a 10 ms. Barras = 200 μ m

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Além disso, a análise por microscopia de fluorescência em eixo z (Figura 52), na qual foram realizados 47 análises em camada, confirma o resultado anterior, sendo facilmente distinguível o limite do trato digestivo e a camada muscular do parasito.

Figura 52 - Imagens seriadas, em eixo z, de parasito tratado com NLS-RN, por 1 hora em microscopia confocal



Microscópio confocal em filtro de excitação de $\lambda = 552$ nm e observação da radiação em 578 nm, a 10 ms, seriadas (1-6) em eixo z. Barras = 200 μ m.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Esses resultados demonstram que o sistema NLS é capaz de penetrar no parasito e entregar substâncias no tegumento e na camada muscular dos vermes adultos de *S.*

mansonii. Considerando o tegumento e a camada muscular como importantes alvos terapêuticos, a permeação da nanopartícula nessas estruturas permite o aprimoramento da atividade esquistossomicida de muitas substâncias, como a licoflavona A, cardamonina, licochalcona A e PZQ (CARVALHO et al., 2015; DE CASTRO et al., 2015; SOUZA et al., 2017).

4.9 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

Os ensaios esquistossomicidas *in vivo* foram realizados apenas com a licochalcona A e NLS-L, porque essas apresentaram melhores resultados nos ensaios de toxicidade, além da abundância de amostra.

Durante a realização dos ensaios *in vivo*, observou-se que a recuperação dos parasitos em camundongos é uma etapa difícil e influenciada por vários fatores. Por exemplo, durante a perfusão, muitos animais apresentaram sinais de uma infecção ineficaz, apresentando fígado com tamanho e coloração normais, além da ausência de granulomas. Tal fato justifica-se pela heterogeneidade da apresentação da doença, relacionada a imunidade inata efetiva na destruição inicial do inoculo (FELICISSIMO, 2014). Além disso, em alguns casos, o próprio processo de perfusão pode ter sido falho na recuperação total dos parasitos. Para minimizar a influência desses animais no experimento, os dados que apresentaram desvio padrão maior que 5,0 ou não apresentaram sinais hepáticos condizentes com a infecção foram removidos do grupo de análise.

No experimento *in vivo* com administração via oral, ocorreram algumas perdas durante o experimento, principalmente no período anterior ao início dos tratamentos. Foram perdidos animais dos grupos sem tratamento, tratado com PZQ e tratados com licochalcona A, entretanto todas as perdas ocorreram antes da administração dos tratamentos. Assim, essa mortalidade pode estar relacionada com a da agressividade da doença (GRYSEELS; STRICKLAND, 2012). Após o início dos tratamentos, os animais não apresentaram nenhuma reação anormal. Os animais foram perfundidos e os vermes foram recolhidos do mesentério e do fígado. Os parasitos recolhidos de todos os grupos de animais foram localizados em maior quantidade no mesentério do que no fígado.

Assim, a tabela 16 mostra as médias e desvios-padrão da recuperação dos parasitos em cada grupo que recebeu o tratamento via oral. O grupo sem tratamento (controle negativo) apresentou uma média de $12,14 \pm 2,73$ parasitos por animal, sendo

que 85,50% estavam distribuídos no mesentério. Já no grupo tratado com PZQ (controle positivo), a recuperação de vermes foi muito baixa ($0,86 \pm 1,07$) e, em alguns animais, foi observada a cura parasitológica total (nenhum parasito foi encontrado). Dessa forma, os grupos controles mostraram o resultado esperado.

Já nos animais que receberam tratamentos com licochalcona A livre foi possível encontrar grande quantidade de parasitos, 8 a 11 vermes por animal no grupo tratado com dose única de 2,50 mg/Kg e 16 a 20 vermes por animal no grupo tratados com dose dupla oral. Nesses grupos não foi observada redução parasitária quando comparados com o grupo sem tratamento. Assim, não foi possível atribuir atividade esquistossomicida *in vivo* à licochalcona A administrada via oral em dose única ou dupla de 2,5 mg/Kg.

Tabela 16 – Recuperação de parasitos após tratamento oral

Grupo	Tratamento	Nº de doses administradas	Número de animais avaliados	Média de vermes $\pm$ desvio padrão	% Distribuição		% de redução de carga parasitária **
					Fígado	Mesentério	
Sem tratamento	-	-	7	$12,14 \pm 2,73$	14,50%	85,50%	-
PZQ	400 mg/Kg	Uma	7	$0,86 \pm 1,07$	33,33%	66,66%	93%
NLS-B	110 μ L	Uma	7	$9,71 \pm 4,23$	13,06%	86,94%	20%
NLS-L	1,25 mg/Kg	Uma	7	$9,43 \pm 3,78$	7,14%	92,86%	22%
NLS-L	2,50 mg/Kg	Uma	7	$12,57 \pm 4,47$	16,32%	83,68%	*
NLS-L	1,25 mg/Kg	Duas	7	$11,71 \pm 4,64$	4,76%	95,24%	4%
NLS-L	2,50 mg/Kg	Duas	7	$8,57 \pm 3,26$	4,76%	95,24%	29%
Licochalcona A	2,50 mg/Kg	Uma	7	$12,29 \pm 2,50$	25,94%	74,06%	*
Licochalcona A	2,50 mg/Kg	Duas	7	$18,00 \pm 2,65$	10,59%	89,41%	*

* Nesses grupos ocorreu aumento da carga parasitária em relação ao grupo sem tratamento.

** Calculado em relação à média de recuperação de vermes e comparada com o grupo sem tratamento.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

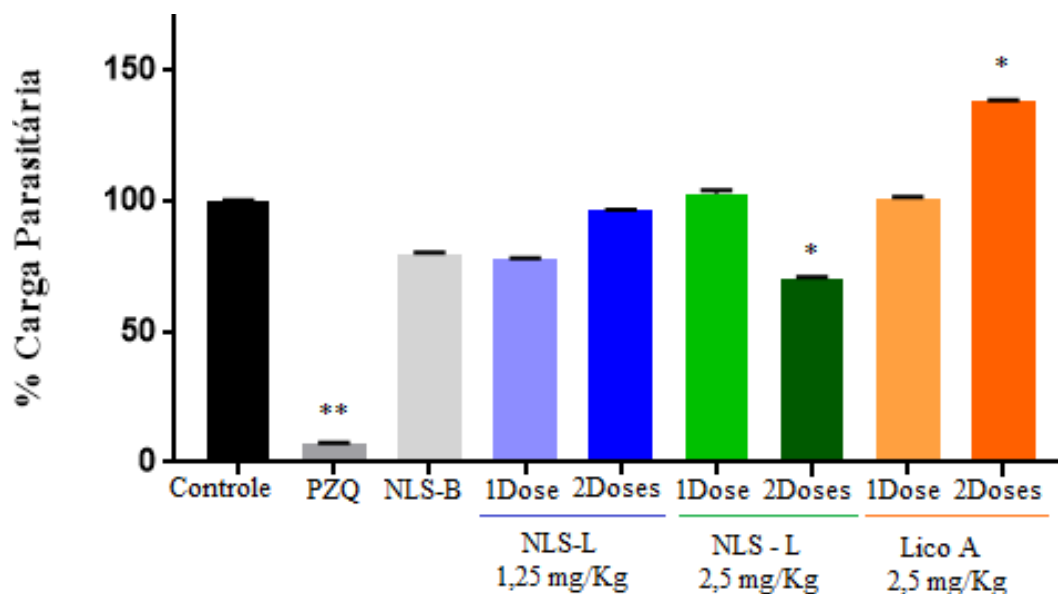
Algumas substâncias já foram avaliadas *in vivo* por via oral contra vermes adultos de *S. mansoni*. Um deles foram os sais de trifelnilfosfônio, que provocaram a redução de 22% da carga parasitária após dose única oral de 400 mg/Kg. Os autores desse trabalho atribuíram a limitada atividade *in vivo* observada à baixa solubilidade aquosa dos compostos testados (ERAKY et al., 2016). Como a licochalcona A também

possui limitada solubilidade aquosa, esse pode ser um dos motivos da ausência de atividade observada para a substância. Outro exemplo é a epiisopiloturina, que provocou a redução de 70% da carga parasitária em camundongos após a administração oral em dose única de 40 mg/Kg (SPIVAK et al., 2014). O limoneno também reduziu a carga parasitária em 60,27% após administração oral de dose única de 100 mg/Kg (GUIMARÃES et al., 2015). Assim, diante desses exemplos, observa-se que a dose de licochalcona A utilizada foi muito baixa quando comparada com outros experimentos, sendo também uma possível explicação para a ausência de atividade esquistossomicida observada via oral.

Em relação aos grupos tratados com a NLS-L, embora a maioria dos grupos tenha apresentado redução da carga parasitária, apenas um grupo apresentou resultado diferente e estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle sem tratamento. O grupo que recebeu a dose dupla de 2,50 mg/Kg apresentou redução de carga parasitária de 29% (Figura 53) e foi observada uma média de 4 a 12 parasitos por animal nesse grupo, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo sem tratamento ($p < 0,05$). Em estudo realizado por XIE e colaboradores (2010a), NLS com PZQ administradas via oral, com dose igual a 30 mg/Kg, provocaram a redução da carga parasitária, revelando também a baixa dosagem utilizada nos tratamentos com NLS.

Embora o grupo de NLS-L dose dupla de 2,50 mg/Kg tenha apresentado diferença estatística quando comparado com o grupo sem tratamento, essa redução ainda é pequena e necessita de novas investigações com doses maiores (LAGO et al., 2018). Contudo, as NLS possuem como característica a possibilidade de proteger a substância de possível degradação e a entrega de substâncias em locais apropriados, permitindo sua atividade (PIZZOL et al., 2014). Assim, como as NLS-L foram mais eficazes na redução parasitológica do que a substância livre, pode-se atribuir a atividade observada a uma das vantagens em utilizar sistemas nanoencapsulados.

Figura 53 – Gráfico representando a carga parasitária em média por grupo experimental do estudo *in vivo* com administração oral



* Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$).

** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,01$).

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Por outro lado, o experimento *in vivo* via intraperitoneal ocorreu sem grandes perdas de animais. A tabela 17 mostra as médias e desvios-padrão da recuperação dos parasitos em cada grupo de tratamento intraperitoneal.

Tabela 17 – Recuperação de parasitos após tratamento via intraperitoneal

Grupo	Tratamento (µg/animal)	Nº de doses administradas	Número de animais avaliados	Média de vermes ± desvio padrão	% de redução de carga parasitária *
Sem tratamento	Sem tratamento	-	5	24,20 ± 2,39	-
NLS-B	200 µL	Cinco	5	23,20 ± 2,77	4%
NLS-L	5 mg/Kg	Cinco	5		52%
Licochalcona A	5 mg/Kg	Cinco	5	11,40 ± 6,88	53%

* Calculado em relação à média de recuperação de vermes e comparada com o grupo sem tratamento.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

O grupo sem tratamento (controle negativo) apresentou uma média de $24,20 \pm 2,39$ parasitos por animal. A quantidade de vermes observados nesse grupo foi maior

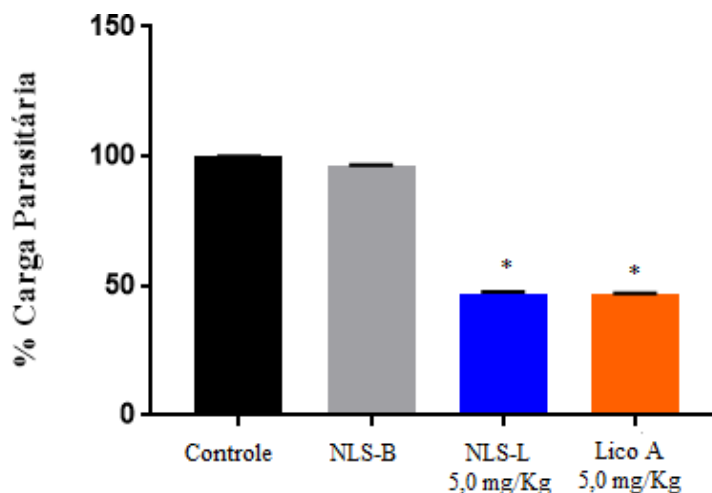
quando comparado com o grupo similar do tratamento oral, devido a quantidade de cercárias utilizadas na infecções dos animais ter sido em número maior. Dessa forma, o grupo controle mostrou o resultado esperado.

Nos animais que receberam a licochalcona A livre (5 mg/Kg em doses múltiplas) foi possível encontrar grande quantidade de parasitos (5 a 23 vermes por animal). Além disso, foi observada uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de 53% (Figura 54) da carga parasitária quando comparada com o grupo sem tratamento. Sendo assim, diferentemente do observado no tratamento oral, a licochalcona A (5 mg/Kg) apresentou atividade esquistossomicida satisfatória. Em estudo anterior, a licochalcona A já havia sido avaliada via intraperitoneal em dose dupla de 50 mg/Kg e provocou a redução de 20% da carga parasitária (FELICISSIMO, 2014). Assim, considerando que a dose administrada foi menor, mas em repetidas vezes, o resultado obtido foi satisfatório.

Em outros estudos, outros compostos foram avaliados seguindo esquema terapêutico semelhante ao proposto nesse trabalho. Em estudo de Sayed e colaboradores (2008), 2-óxidos oxidiazólicos foram administrados 5 vezes por via intraperitoneal na dosagem de 10 mg/Kg e provocaram a redução de 88% da carga parasitária. A β -lapachona também foi avaliada *in vivo* por administração intraperitoneal repetida (5 vezes) de 50 mg/Kg e reduziu 41% da carga parasitária (AIRES ADE et al., 2014). Assim, é importante ressaltar que a licochalcona A apresentou resultado satisfatório em uma dosagem menor que as citadas em literatura, destacando o potencial esquistossomicida da substância.

Em relação ao grupo tratado com a NLS-L, foram recuperados de 6 a 16 parasitos por animal e observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo sem tratamento. Além disso, as NLS-L (5 mg/Kg) provocaram a redução de carga parasitária em 52% (Figura 53). A comparação entre os grupos tratados com a licochalcona A livre e as NLS-L não demonstrou diferença significativa entre eles. Assim, tanto as NLS-L quanto a licochalcona A livre foram eficazes na redução parasitológica quando administradas via intraperitoneal em esquema terapêutico de 5 doses a 5 mg/Kg.

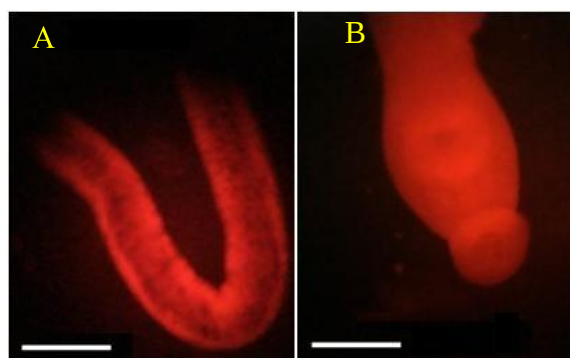
Figura 54 – Gráfico representando a carga parasitária em média por grupo experimental do estudo *in vivo* com administração intraperitoneal



* Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$).
 Fonte: Elaborada pela própria autora.

Além da avaliação da carga parasitária, parasitos dos animais que receberam NLS-RN intraperitoneal foram avaliados por microscopia de fluorescência. Após 2 horas da administração foi possível verificar a fluorescência característica nos vermes adultos, indicando que as NLS-RN já haviam alcançado os parasitos (Figura 55). Esse resultado demonstra que as nanopartículas, quando administradas por via intraperitoneal, alcançam o alvo desejado e permitem a entrega de substâncias, podendo potencializar a ação de compostos esquistossomicidas (PIZZOL et al., 2014; EISSA et al., 2015).

Figura 55 – Parasitos recolhidos por perfusão 2 horas após a administração *in vivo* intraperitoneal de NLS-RN



A: Ventre de *S. mansoni* marcado com NLS-RN.
 B: Ventosas oral e ventral de *S. mansoni* marcado com NLS-RN.
 Barras = 100 μ m

Fonte: Elaborado pela autora

Por fim, nas duas vias de administração avaliadas *in vivo* não houve diferença significativa entre a proporção de machos e fêmeas recuperados durante a perfusão dos grupos. Além disso, não foi observada atividade esquistossomicida das NLS-B indicando que a atividade observada pode ser diretamente relacionada a presença da licochalcona A nas nanopartículas. Além disso, vale ressaltar que a dose de licochalcona A utilizada nesse experimento foi muito inferior ao utilizado usualmente em experimentos esquistossomicidas, 50 a 200 mg/Kg (LAGO et al., 2018). A utilização dessas dosagens baixas ocorreu devido à baixa concentração da licochalcona A nas nanopartículas, sendo administrada o volume máximo possível pela via oral e intraperitoneal, sem colocar o experimento e os animais em risco. Assim, a baixa redução parasitária observada, principalmente no tratamento via oral, pode estar associada a baixa dosagem utilizada.

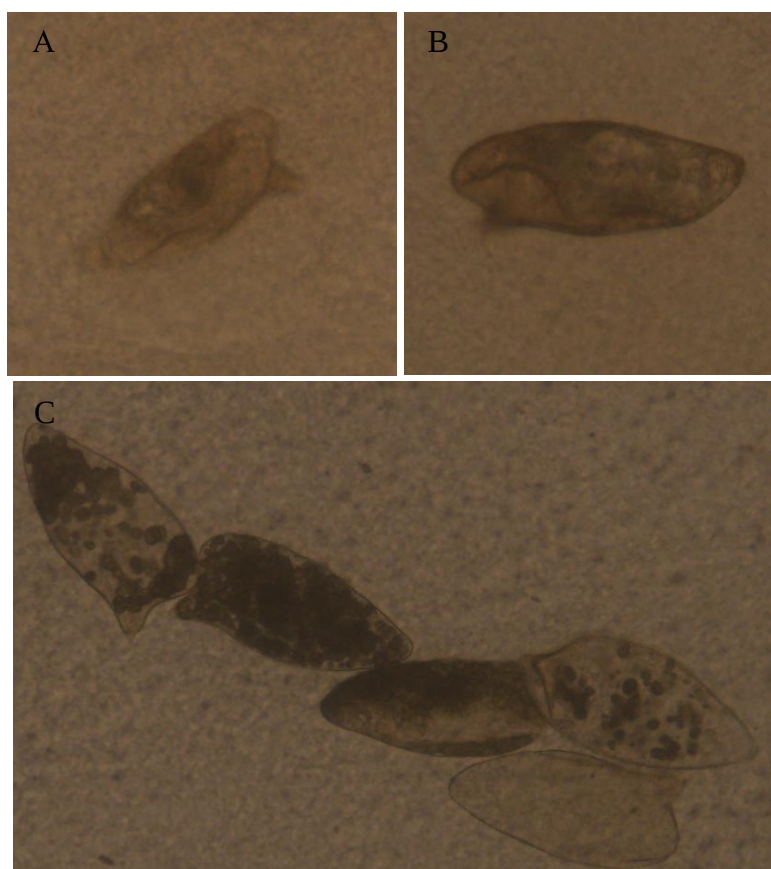
4.9.1 Oograma

A ovoposição está diretamente relacionada com o acasalamento dos parasitos ou com a incapacidade da fêmea em realizá-la. Há relatos de algumas substâncias que impedem ou diminuem a ovoposição devido a inibição da enzima 3-hidroxi-metilglutaril-coenzimaA redutase (CHEN; FOSTER; BENNETT, 1990; VERAS et al., 2012).

Os animais sacrificados foram submetidos à análise qualitativa dos oogramas. Foram considerados como alterados, os resultados em que ocorreram diferença significativa entre o número de ovos maduros e imaturos. A análise microscópica (Figura 56 A-C) dos fragmentos intestinais demonstra que nenhum tratamento alterou o desenvolvimento dos ovos e a ovoposição.

Assim, a licochalcona A livre ou encapsulada em NLS não alterou a cinética de ovoposição do *S. mansoni* quando administradas via oral e intraperitoneal. Alterações no oograma revelam a fecundidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, sendo um indício de eficácia da substância. Esses resultados indicam que o mecanismo de ação da licochalcona A não está relacionado com a reprodução dos parasitas.

Figura 56 – Efeitos da licochalcona A e NLS-L no oograma de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni*



A: Ovo de *S. mansoni* recolhido de camundongos tratados com Licochalcona A (2,5 mg/kg x 2, via oral).

B-C: Ovos de *S. mansoni* recolhido de camundongos tratados com NLS-L (2,5 mg/kg x 2, via oral).

Aumento: 200 x em microscópico óptico comum

Fonte: Elaborado pela autora

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto nesse trabalho, conclui-se que os procedimentos experimentais realizados permitiram o isolamento da licochalcona A e da cardamonina em poucas etapas. Essas substâncias foram encapsuladas em NLS, produzindo sistemas com tamanho médio de partícula e potencial zeta satisfatório, além de distribuição homogênea.

As NLS obtidas mostraram-se em formato esférico no estudo de microscopia eletrônica e com boa estabilidade por 30 dias, quando mantidas à temperatura ambiente e refrigeradas a 4 °C.

Os estudos de toxicidade das NLS mostraram que o nanossistema diminui a atividade hemolítica e a toxicidade da licochalcona A e cardamonina, mantendo maior viabilidade celular em macrófagos da linhagem J774.

O ensaio esquistossomicida *in vitro* revelou que a atividade da cardamonina livre e encapsulada é a mesma quando encasulada em NLS. Já a licochalcona A livre possui atividade esquistossomicida *in vitro* inferior em relação à encapsulada. Tanto as substâncias livres quanto encapsuladas provocaram danos tegumentares em vermes adultos de *S. mansoni*. Além disso, por meio de estudo com nanopartículas marcadas com fluorescência, foi comprovado que as nanopartículas se distribuem pelo tegumento e camada muscular do parasito.

Finalmente, o ensaio *in vivo* demonstrou que a licochalcona A livre não apresentou atividade quando administrada via oral na dose de 2,5 mg/Kg. Entretanto, esta substância quando encapsulada e administrada por via oral na dose de 2,5 mg/Kg foi capaz de reduzir cerca de 30% da carga parasitária. Quando administradas via intraperitoneal, tanto a licochalcona A livre quanto a encapsulada apresentaram atividade esquistossomicida na dosagem de 5,0 mg/Kg, reduzindo em mais de 50% a carga parasitária. Em nenhum tratamento foram observadas alterações nos oogramas.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram o grande potencial do uso da nanotecnologia associada a produtos naturais para o tratamento da esquistossomose.

Como perspectivas futuras desse trabalho, são recomendados alguns estudos de farmacocinética e aprimoramento da formulação para permitir maior encapsulamento de substâncias e utilização de dosagens maiores em ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADEROGBA, M. A.; KGATLE, D. T.; MCGRAW, L. J.; ELOFF, J. N. Isolation of antioxidant constituents from *Combretum apiculatum* subsp. *Apiculatum*. **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 125-131, 2012.
- AIRES ADE, L.; XIMENES, E. C.; SILVA, R. A.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J.; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M.; ALBUQUERQUE, M. C. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Experimental Parasitology**, v.142, p. 83–90, 2014.
- AKBARZADEH, A.; SADABADY, R. R.; DAVARAN, S.; JOO, S. W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M.; KOSHKI, K. N. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 102, 2013.
- ALEXANDRE, F. A.; FARIA, J. A. F.; CARDOSO, C. F. Avaliação da eficiência da radiação ultravioleta na esterilização de embalagens plásticas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n.5, 2008.
- ALI, A. A.; HALEEM, E. N. A. A.; KHALEEL, S. A. H.; SALLAM, A. S. Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in Rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 268-275, 2017.
- ALLAM, G.; ABUELSAAD, A. S. *In vitro* and *in vivo* effects of hesperidin treatment on adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**, v.88, n. 3, p. 362–370, 2014.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P.; LOBO, M. S. Pluronic F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): Main Features and their Applications in Topical and Transdermal Administration of Drugs. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 592 - 605, 2012.
- AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 79-85, 2006.
- ARAUJO, S. C.; MATTOS, A. C. A.; TEIXEIRA, H. F.; COELHO, P. M. Z.; NELSON, D. L.; OLIVEIRA, M. C. Improvement of *in vitro* efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p. 307–315, 2007.
- ARAUJO, R. V. S.; MELO-JÚNIOR, M. R.; BELTRÃO, E. I. C.; MELLO, L. A.; IACOMINI, M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A., CARVALHO JR., L. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Evaluation of the antiSchistosomal activity of sulfated α -D-glucan from the lichen *Ramalina celastri* free and encapsulated into liposomes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44. n. 4, p. 311-318, 2011.

ARAUJO, J.; GARCIA, M. L.; MALLANDRICH, M.; SOUTO E. B.; CALPENA, A. C. Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetate loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): *in vitro* and *ex vivo* studies. **Nanomedicine**, v. 8, n. 6, p. 1034-1041, 2012.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. **Nano Today**, v.9, n. 2, p. 223-243, 2014.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M.; CAVALLI, R.; TROTTA, M. Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. **Journal of Microencapsulation and Nano Carriers**, v. 27, n. 1, p. 78-85, 2010.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Experts Opinion in Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.

BENDER, E. A.; ADORNE, M. D.; COLOMÉ L. M.; ABDALLA, D. S. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 271-279, 2012.

BHANDARI, R.; KAUR, I. P. Pharmacokinetics, tissue distribution and relative bioavailability of isoniazid-solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 202-212, 2013.

BUEDING, E.; HAWKINS, J.; CHA, Y. N. Antischistosomal effects of cyclosporin A. **Agents Actions**, v. 11, n.4, p. 380-383, 1981.

BRAGUINE, C. G.; BERTANHA, C. S.; GONÇALVES, U. O. MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; GIMENEX, V. M. M.; GROppo, M.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Schistosomicidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n. 7, p. 925-929, 2012.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

BUTT, A. M.; AMIN, M. C. I. M.; KATAS, H.; SARISUTA, N.; WITOONSARIDSILP, W.; BENJAKUL, R. *In vitro* characterization of pluronic f127 and d-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles as nanocarriers for targeted anticancer-drug delivery. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

CARVALHO, L. S. A. **Avaliação da atividade esquistossomocida *in vitro* do extrato bruto e chalconas isoladas das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae) frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni***. 2013. 82f. Trabalho de Conclusão de curso – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora.

CARVALHO, L. S. A.; DE CASTRO, C. C. B.; CARVALHO, P. H. D.; PINTO, P. L. S.; DE MORAES, J.; AMBROSIO, S. R.; MAGALHAES, L. G.; GONCALVES, U. O.; PINTO, P. F.; COURI, M. R. C.; DA SILVA FILHO, A. A. *In vitro* schistosomicidal activity of licochalcone a and evaluation of its effects on tegument of adult worms of *Schistosoma mansoni*. In: **4th Brazilian Conference Natural Products**, 2013, Natal – Rio Grande do Norte.

CARVALHO, L. S. A.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; PINTO, P. L. S.; FARIA PINTO, P.; PEREIRA JUNIOR, O. S.; DA SILVA FILHO, A. A. Schistosomicidal activity and docking of *Schistosoma mansoni* ATPDase 1 with licoflavone B isolated from *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae). **Experimental Parasitology**, v. 19, p. 207-214, 2015.

CHAN, J. D.; CUPIT, P. M.; GUNARATNE, G. S.; MCCORVY, J. D.; YANG, Y.; STOLZ, K.; WEBB, T. R.; DOSA, P. I.; ROTH, B. L.; ABAGYAN, R.; CUNNINGHAM, C.; MARCHANT, J. S. The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-coupled receptor ligand. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

CHEN, G. Z.; FOSTER, L.; BENNETT, J. L. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme a reductase activity in *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 342, n. 4, p. 477-482, 1990.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 2550 – 2556, 1993.

CHEN, M. THEANDER, T. G.; CHRISTENSEN, S. B.; HVIID, L.; ZHAI, L.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1470 – 1475, 1994.

CHU, X.; CI, X.; WEI, M.; YANG, X.; CAO, Q.; GUAN, M.; LI, H.; DENG, Y.; FENG, H.; DENG, X. Licochalcone A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3947-3954, 2012.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23-29, 2014.

COHEN, K. O.; SOUSA, M. V.; JACKIX, M. N. Produto alimentício elaborado com sementes de cupuaçu e de cacau. **EMBRAPA**, n. 267, 2009.

CONCEIÇÃO, M. J.; COURA, J. R. Epidemiology of schistosomiasis mansoni in Brazil. In: ROKNI, M. B. **Schistosomiasis**. Croatia: Rijeka, p. 73-102, 2012.

CUI, Y.; AO, M.; LI, W.; HU, J.; YU, L. Anti-Inflammatory activity of licochalcone A isolated from *Glycyrrhiza inflata*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 361-365, 2007.

DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; ALI, Y. B. M.; SKELLY, P. J. Schistosome tegumental ecto-apyrase (SmATPDase1) degrades exogenous pro-inflammatory and pro-thrombotic nucleotides. **Peer Journal**, v. 316, p 1-24, 2014a.

DA'DARA, A. A.; BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Schistosome apyrase SmATPDase1, but not SmATPDase2, hydrolyses exogenous ATP and ADP. **Purinerg Signalling**, v. 10, n. 4, p. 573-580, 2014b.

DATASUS-TABNET. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinan/pce/cnv/pcemg.def>. Acessado em 28/05/2018.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 505-21, 2007.

DE ARAUJO, S.C., DE MATTOS, A.C., TEIXEIRA, H.F., COELHO, P.M., NELSON, D.L., DE OLIVEIRA, M.C. Improvement of *in vitro* efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1-2, p.307-315, 2007.

DE CARVALHO, P. H. D. **Isolamento e identificação da licochalcona A a partir da *Glycyrrhiza inflata* e avaliação de suas atividades citotóxica *in vitro* e hepatoprotetora em modelo de lesão hepática em ratos**. 2013.98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

DE CASTRO, C. B.; COSTA, P. S.; LAKTIN, G. T.; DE CARVALHO, P. H.; GERALDO, R. B.; DE MORAES, J.; PINTO, P. L. S.; COURI, M. R. C.; PINTO, P. F.; SILVA FILHO, A. A. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v. 22, p. 921-928, 2015.

D' SOUZA, S. S.; DELUCA, P. P. Methods to assess *in vitro* drug release from injectable polymeric particulate systems. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 2, p. 460-174, 2006.

DEMIREL, M.; YAZAN, Y.; MULLER, R. H.; KILIÇ, F.; BOZAN, B. Formulation and *in vitro-in vivo* evaluation of piribedil solid lipid midro and nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n.3, p. 359-357, 2001.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n.3, p. 548-558, 2011a.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011b.

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by piplartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222-227, 2012.

DE MORAES, J.; ALMEIDA, A. A. C.; BRITO, M. R. M.; MARQUES, T. H.; LIMA, T. C.; SOUSA, D. P.; NAKANO, E.; MENDONÇA, R. Z.; FREITAS, R. M. Anthelmintic activity of the natural compound (+)-limonene epoxide against *Schistosoma mansoni*. **Planta Medica**, v.79, n. 3–4, p. 253–258, 2013a.

DE MORAES, J.; KEISER, K.; INGRAM, K.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; BITTENCOUT, C. R.; BEMQUERER, M. P.; LEITE, J. R.; KATO, M. J.; NAKANO, E. *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 301-309, 2013b.

DE MORAES, J.; CARVALHO, A. A. L.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A. A. C.; MARQUES, T. H. C.; NADRADE, L. N.; FREITAS, R. M.; SOUSA, D. P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013c.

DE MORAES, J.; OLIVEIRA, R. N.; COSTA, J. P.; JUNIOR, A. L. G.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; ALLEGRETTI, S. M.; PINTO, P. L. S. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease Schistosomiasis mansoni. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.1, 2014.

DE MORAES, J. Natural products with antiSchistosomal Activity. **Future Medicinal Chemistry**, v.7, n. 6, p. 801–820, 2015.

DIAS, M. M.; ZUZA, O.; RIANI, L. R.; DE FARIA PINTO, P.; PINTO, P. L. S.; SILVA, M. P.; DE MORAES, J.; ATAÍDE, A. C. Z. ; DE OLIVEIRA SILVA, F.; CECÍLIO, A. B.; DA SILVA FILHO, A. A. *In vitro* schistosomicidal and antiviral activities of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* and *Herpes simplex virus-1*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, p. 489-498, 2017.

DRUMMOND, S. C.; SILVA, L. C. S.; AMARAL, R. S.; SOUSA-PEREIRA, S. R.; ANTUNES, C. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 37-44, 2006.

EGLER, J.; LANG, F. Licochalcone A Induced Suicidal Death of Human Erythrocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 2060-2070, 2015.

ELISSA, M. M.; EL-MOSLEMANY, R. M.; RAMADAN, A. A.; AMER, E. I.; EL-AZZOUNI, M. Z.; EL-KHORDAGUI, L. K. Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single

Dose Oral Treatment of *Schistosomiasis mansoni*: A Preclinical Study. **Plos One**, v. 10, n. 11, 2015.

EL ASWAD, B. E. D. W.; SADEK, G. S. Parasitological, pathological and immunological effects of hesperidin treatment on murine schistosomiasis mansoni. **Life Science. Journal**, v.11, n. 7, p. 840–855, 2014.

EL RIDI, R.; ABOUELDAHAB, M.; TALLIMA H.; SALAH, M.; MAHANA, N.; FAWZI, S.; MOHAMED, S. H.; FAHMY, O. M. *In vitro* and *in vivo* activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n.8, p.3383-3389, 2010.

ERAKY, M. A.; EL-KHOLY, A. A.; RASHED, G. A.; HAMMAM, O. A.; MOHARAM, A. F.; ABOU-OUF, E. A.; ALV, N. S.; KISHIK S. M.; ABDALLAH, K. F.; HAMDAN, D. I. Dose-response relationship in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult stages following limonin treatment in experimentally infected mice. **Parasitology Research**, v. 155, n, 10, p. 4045-4054, 2016.

FELICISSIMO, J. M. **Avaliação do potencial da licochalcona A na terapia da esquistossomose *in vitro* e em modelo murino**. 2014. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora.

FONSECA, L. B. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo praziquantel para o tratamento da esquistossomose**. 2012. 233f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto Adolfo Luiz de Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Rio de Janeiro.

FREZZA, T. F. GREMIÃO, M. P. D.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; SOUZA, A. L. R.; ALLEGRETTI, S. M. Liposomal-praziquantel: Efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay. **Acta Tropica**, v. 128, n.1, p. 70– 75, 2013.

FREZZA, T. F.; SOUZA, A. L. R.; PRADO, C. C. R.; OLIVEIRA, C. N. F.; GREMIÃO, M. P. D.; GIORGIO S.; DOLDER, M. A. H.; JOAZEIRO, P. P.; ALLEGRETTI, S. M. Effectiveness of hyperbaric oxygen for experimental treatment of schistosomiasis mansoni using praziquantel-free and encapsulated into liposomes: Assay in adult worms and oviposition. **Acta Tropica**, v. 150, p. 182–189, 2015.

FRIIS-MOLLER, A.; CHEN, M.; FUURSTED, K.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZM, A. *In vitro* antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone a from chinese licorice roots. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 416-419, 2002.

FU, Y.; HSIEH, T. C.; GUO, J.; KUNICKI, J.; LEE, M. Y.; DARYNKIEWICZ, Z.; WU, J. M. Licochalcone-A, a novel flavonoid isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*), causes G2 and late-G1 arrests in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells. **Biochemical & Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 1, p. 262-270, 2004.

FURUHASHI, I.; IWATA, S.; SHIBATA, S.; SATO, T.; INOUE, H. Inhibition by licochalcone A, a novel flavonoid isolated from liquorice root, of IL-1 β -induced PGE₂ production in human skin fibroblasts. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 12, p. 1661–1666, 2005.

FUSI, F.; CAVALLI, M.; MULHOLLAND, D.; CROUCH, N.; COOMBES, P.; DAWSON, G.; BOVA, S.; SGARAGLI, G.; SAPONARA, S. Cardamonin is a bifunctional vasodilator that inhibits Cav1.2 current and stimulates KCa1.1 current in rat tail artery myocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, p. 531–540, 2010.

GONÇALVES, U. O.; SOUZA, J. M.; LIMA, N. D. M.; SANTOS, N. S.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A.; PAULETTI, P. M.; AMBRÓSIO, S. R. *In vitro* schistosomicidal activity of licochalcone-a against *Schistosoma mansoni* adult worms. In: **11th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2013, Ribeirão Preto. São Paulo, 2013.

GONÇALVES, L. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. An Overview on Cardamonin. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 6, p. 633-640, 2014.

GRYSEELS, B.; STRICKLAND, T. Schistosomiasis. In: MAGILL, A. J.; RYAN, E. T.; SOLOMON, T.; HILL, D. R. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. 9^a edição. China: Elsevier, p. 867-883, 2012.

GUIMARÃES, M. A.; CAMPELO, Y. D. M.; VÉRAS, L. M. C.; COLHONE, M. C.; LIMA, D. F.; CIANCAGLINI, P.; KUCKELHAUS, S. S.; LIMA, F. C. A.; MORAES, J.; LEITE, J. R. S. A. Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and *in vitro* schistosomicidal activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n.6, p. 4519–4528, 2014.

GUIMARÃES, M. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; VERAS, L. M.; LIMA, D. F.; CAMPELO, Y. D.; CAMPOS, S. A.; KUCKLHAUS, S. A.; PINTO P. L.; EATON, P.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; ALLEGRETTI, S. M.; DE MORAES, J.; LOLIC, A.; VERBIC, T.; LEITE, J. R. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 09, n. 3, e0003656, 2015.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology**, v. 26, n.1, p. 57-64, 2008.

HARAGUCHI, H.; TANIMOTO, K.; YUKIYOSHI, T.; MIZUTANI, K.; KINOSHITA, T.; Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 125-129, 1998.

HATANO, T.; SHINTANI, Y.; AGA, Y.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; YOSHIDA, T. Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, p. 1286–1292, 2000.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 33, p. 4283-4300, 2003.

HOFFMANN, F.; CINATIL, J.; KAICKOVÁ, H.; CINATI, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal Pharmaceutics**, v. 157, n. 2, p. 157-189, 1997.

HUANG, B.; LIU, J.; JU, C.; YANG, D.; CHEN, G.; XU, S.; ZENG, Y.; YAN, X.; WANG, W.; LIU, D.; FU, S. Licochalcone A prevents the loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation in lipopolysaccharide (lps)-induced parkinson's disease. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, 2017.

HUNTER, J. R. **Introduction to Modern Colloid Science**. Oxford University Press, 1993.

HUO, M.; CHEN, N.; CHI, G.; YUAN, X.; GUAN, S.; LI, H.; ZHONG, W.; GUO, W.; SOROMOU, L. W.; GAO, R. OUYANG, H.; DENG, X.; FENG, H. Traditional medicine alpinetin inhibits the inflammatory response in Raw 264.7 cells and mouse models. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 241-248, 2012.

HURST, W. J.; TRKA, S. M.; POWIS, T. G.; VALDEZ, F.; HESTER, T. R. Archaeology: cacao usage by the earliest Maya civilization. **Nature**, v. 418, p. 289-290, 2002.

ISO – International Organization for Standardization. **ISO/TC 229 – Nanotechnologies**. Genebra, 2008.

ISO – International Organization for Standardization. **ISO/10993 - Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity**. Genebra, 2009.

ISRAF, D. A.; KAHIZURIN, T. A.; SYAHIDA, A.; LAJIS, N. H.; KHORIZAH, S. Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF- κ B nuclear translocation and I κ B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 673-679, 2007.

JAHANGIRIAN, H.; LEMRASKI, E. G.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957–2978, 2017.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, p. 123–127, 2015.

JAMES, S.; APARNA, J. S.; PAUL, A. M.; LANKADASARI, M. B.; MOHAMMED, S.; BINU, V. S.; SANTHOSHKUMAR, T. R.; RESHMI, G.; HARIKUMAR, K. B. Cardamonin inhibits colonic neoplasia through modulation of MicroRNA expression. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

JAWAHAR, N.; MEYYANATHAN, S. N. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. **International Journal of Health & Allied Sciences**, v. 1, 2012.

JENA, M.; MISHRA, S.; JENA, S.; MISHRA, S. S. Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 4, 2013.

JIN, F.; JIN, X.; JIN, Y. L.; SOHN, D. W.; KIM, S. A.; SOHN, D. H.; KIM, Y. C.; KIM, H. S. Structural requirements of 20,40,60- tris(methoxymethoxy) chalcone derivatives for anti-inflammatory activity: The importance of a 20-hydroxy moiety. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p. 1359–1367, 2007.

JORES, K.; HABERLAN, A.; WARTEWING, S.; MADER, K.; MAHNERT, W. Solid Lipid nanoparticles (sln) and oil-loaded sln studied by spectrofluorometry and raman. **Spectroscopy Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 11, p. 1887-1897, 2005.

JOSHI, M. D.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, n. 2, p. 161-172, 2009.

JUMAA, M.; MULLER, B. W. Lipid emulsions as a novel system to reduce the hemolytic activity of lytic agents: mechanism of the protective effect. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 285-290, 2000.

KANG, T.; SEO, J.; OH, H.; YOON, G.; ILCHAE, J; HYUNSHIM, J. Licochalcone A suppresses specificity protein 1 as a novel target in human breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 12, p. 4652-4663, 2017.

KASHANIAN, S.; AZANDARYANI, A. H.; DERAKHSHANDEH, K. New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl Phosphatidylethanolamine as the outer shell. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2393-2401, 2011.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KAUR, G.; SINGH, T.; KUMAR, A. Nanotechnology: A Review. **International Journal of Education and Applied Research**, v. 2, 2012.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 148-152, 2001.

KE, Z., SU, Z., ZHANG, X., CAO, Z., DING, Y., CAO, L., DING, G., WANG, Z., LIU, H., XIAO, W. Discovery of a potent angiotensin converting enzyme inhibitor via virtual screening, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 16, p. 3688-3692, 2017.

KIM, H. J.; SHIN, E. K.; KIM, D. H.; LEE, H. H.; PARK, J. H. Y.; KIM, J. K. Antiangiogenic effect of licochalcone A. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1152–1159, 2010.

KIM, J.S.; PARK, M. R.; LEE, S. Y.; KIM, D. K.; MOON, S. M.; KIM, C. S.; CHO, S. S.; YOON, G.; IM, H. J.; YOU, J. S.; OH, J. S.; KIM, S. G. Licochalcone A induces apoptosis in KB human oral cancer cells via a caspase-dependent FasL signaling pathway. **Oncology Reports**, v. 31, n. 2, p. 755–762, 2014.

KRISHNA, B. M.; CHAGANTY, R. B. Cardamonin and alpinetin from the seeds of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 12, p. 149-153, 1972.

KOLENYAK-SANTOS, F.; GARNERO, C.; OLIVEIRA, R. N.; SOUZA, A. L. R.; CHORILLI, M.; ALLEGRETTI, S.M.; LONGHI, M. R.; CHAUD, M. V.; GREMIÃO, M. P. D. Nanostructured lipid carriers as a strategy to improve the *in vitro* schistosomiasis activity of praziquantel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n.1, p. 761–772, 2015.

KUPETZ, E.; BUNJES, H. Lipid nanoparticles: drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. **Journal of Controlled Release**, v. 10, p. 54-64, 2014.

KURAMOTO, K.; SUZUKI, S.; SAKAI, H.; TAKEDA, H.; SANOMACHI, T.; SEINO, S.; NARITA, Y.; KAYAMA, T.; KITANAKA, C.; OKADA, M. Licochalcone A specifically induces cell death in glioma stem cells via mitochondrial dysfunction. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 2017, p. 835–844, 2017.

LAGO, E. M.; XAVIER, R. P.; TEIXEIRA, T. R.; SILVA, L. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE MORAES, J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 89-120, 2018.

LAMBERTUCCI, R. L.; SERUFO, J. C.; GERSPACHER-LARA, R.; RAYES, A. A. M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V.; ANTUNES, C. M. F. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 101-109, 2000.

LEE, S. H.; CHOI, J. Y.; LEE, B. R.; FANG, Y.; KIM, J. H.; PARK, D. H.; PARK, D. H.; PARK, M. G.; WOO, R. M.; KIM, W. J.; JE, Y. H. Insect growth regulatory and larvicidal activity of chalcones against *Aedes albopictus*. **Entomological Research**, v. 48, p. 55-50, 2018.

LEE, Y. T., FONG; T. H.; CHEN, H. M.; CHANG, C. Y.; WANG, Y. H.; CHERN, C. Y.; CHEN, Y. H. Toxicity assessments of chalcone and some synthetic chalcone analogues in a zebrafish model. **Molecules**, v. 19, p. 641-650, 2014.

LEOW, C. Y.; WILLIS, C.; HOFMANN, A.; JONES, M. K. Structure–function analysis of apical membrane-associated molecules of the tegument of schistosome parasites of humans: prospects for identification of novel targets for parasite control. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 7, p. 1653-1663, 2015.

LI, L.; MAK, K. Y.; SHI, J.; LEUNG, C. H.; WONG, C. M.; LEUNG, C. W.; MAK, C. S. K.; CHAN, K. Y.; CHAN, N. M. M.; WU, E. X.; PONG, P. W. T. Sterilization on dextran-coated iron oxide nanoparticles: Effects of autoclaving, filtration, UV irradiation, and ethanol treatment. **Microelectronic Engineering**, v. 111, p. 310-313, 2013a.

LI, X. H.; DE CASTRO-BORGES, W.; PARKER, M. S.; VANCE, G. M.; DEMARCO, R.; NEVES, L. X.; EVANS, G. J. O.; WILSON, R. A. The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7: e2337, 2013b.

LI, X. H.; XU, Y. X.; VANCE, G.; WANG, Y.; LV, L.; DAMS, G. J. V.; CAO, J. P.; WILSON, R. A. Evidence that rhesus macaques self-cure from a *Schistosoma japonicum* infection by disrupting worm esophageal function: a new route to an effective vaccine? **Plos Neglected Tropical Diseases**, v 9, n. 7, 2015.

LIMA, L. I.; PY-DANIEL, K. R.; GUIMARÃES, M. A.; MUEHLMANN, L. A.; MAFUD, A. C.; MASCARENHAS, Y. P.; DE MORAES, J.; LEITE, J. R. S.A.; JIANG, C.; AZEVEDO, R. B.; LONGO, J. P. F. Self-nanoemulsifying drug-delivery systems improve oral absorption and antischistosomal activity of epiisopiloturine. **Nanomedicine**, v. 13, n. 7, p. 689-702, 2018.

LIN, E.; LIN, W. H.; WANG, S. Y.; CHEN, C. S.; LIAO, J. W.; CHANG, H. W.; CHEN, S. C.; LIN, K. Y.; WANG, L.; YANG, H. L.; HSEU, Y. C. Flavokawain B inhibits growth of human squamous carcinoma cells: Involvement of apoptosis and cell cycle dysregulation *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p. 368–378, 2012.

LIU, A. L. WANG, H. D.; LEE, S. M.; WANG, Y. T.; DU, G. H. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their *in vitro* anti-viral activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 7141-7147, 2008.

LIU, C. H.; WU, C. T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2-3, p. 149-156, 2010.

LIU Y. X., WU W., LIANG Y. J., JIE, Z. L.; WANG, H.; WANG, W.; HUANG, Y. X. New uses for old drugs: the tale of artemisinin derivatives in the elimination of schistosomiasis japonica in China. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 15058–15074, 2014.

LUZ, P. P.; MAGALHÃES, L. G.; PEREIRA, A. C.; CUNHA, W. R.; RODRIGUES, V.; SILVA, M. L. A. Curcumin-loaded into PLGA nanoparticles - Preparation and *in vitro* schistosomicidal activity. **Parasitology Research**, v. 110, n.2, p. 593 – 598, 2012.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B.; SOARES, C. S.; SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v.104, n. 5, p.1197–1201, 2009.

MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 243-254, 2003.

MASSARA, C. L.; AMARAL, G. L.; CALDEIRA, R. L.; DRUMMOND, S. C.; ENK, M. J.; CARVALHO, O. S. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 7, p. 1709-1712, 2008.

MEHNERT, W.; MADER, K.; Solid lipid nanoparticles - Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n.2-3, p. 165-196, 2012.

MEISTER, I.; INGRAM-SIEBER, K.; COWAN, N.; TODD, M.; ROBERTSON, M. N.; MELI, C.; PATRA, M. GASSER, G.; KEISER, J. Activity of praziquantel enantiomers and main metabolites against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5466–5472, 2014.

MELO, A. L.; BARCELLOS, N. M. S.; DEMICHELI, C.; FREZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, n. 1-2, p. 227–230, 2003.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11ª Ed. São Paulo: Atheneu, p. 213-221, 2005.

MI-ICHI, F.; MIYADERA, H.; KOBAYASHI, T.; TAKAMIYA, S.; WAKI, S.; IWARA, S.; SHIBATA, S.; KITA, K. Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: inhibitory effect of licochalcone A on the Plasmodium falciparum respiratory chain. **Annals of the New York Academic of Science**, v. 1056, p. 46-54, 2005.

MODI, S.; ANDERSON, B. D. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 8, p 3076-3089, 2013.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURÃO, S. C.; COSTA, P. I.; SALGADO, H. R. N.; GREMIÃO, M. P. D. Improvement of anti*Schistosomal* activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n. 1-2, p. 157–162, 2005.

MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR, R. S. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 4, p. 349-58, 2009.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) from controlled drug delivery – a review of the state of art. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v. 50, n.1, p. 161-177, 2000.

MULLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n.6, p. 522-530, 2007.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 131-155, 2002.

NADELMANN, L.; TJORNELUND, J.; HANSEN, S. H.; CORNETT, C.; SIDELMANN, U. G.; CHRISTENSEN, E.; CHRISTENSEN, S. B. Synthesis, isolation and identification of glucuronides and mercapturic acids of a novel antiparasitic agent, licochalcone A. **Xenobiotica**, v. 27, n. 7, p. 667-680, 1997.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ª edição. Atheneu, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: WERMUTH, C.; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 4ª Ed., Elsevier, p. 101-139, 2015.

NIE, S.; HSIAO, W. L. W.; PAN, W.; YANG, Z. Thermoreversible Pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: *in vitro* drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 151–166, 2011.

NIU, P.; SHI D.; ZHANG, S.; ZHU, Y.; ZHOU, J. Cardamonin enhances the anti-proliferative effect of cisplatin on ovarian cancer. **Oncology letters**, v. 15, p. 3991-3997, 2018.

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, O. S.; COLEHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (editores) **Schistosoma mansoni e esquistossomose uma visão multidisciplinar**. Fiocruz: Rio de Janeiro, p. 823-847, 2008.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 2, p.125-37, 2007.

PAVIA, D. L.; KRIS, G. S.; LAMPMAN, G. M. **Introdução à Espectroscopia** – Tradução da 4ª edição Norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 233-290, 1968.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 75-81, 2014.

PIZZOL, C. D.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; RESTREPO, J. A. S.; PITTELLA, F.; SILVA, A. H.; SOUZA, P. A.; CAMPOS, A. M.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.

Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 8, p. 8581-8596, 2014.

QUAN, H. Y.; BAEK, N. I.; CHUNG, S. H. Licochalcone A prevents adipocyte differentiation and lipogenesis via suppression of peroxisome proliferator activated receptor α and sterol regulatory element binding protein pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 5112–5120, 2012.

RAMTEKE, K. H.; DIGHE, P. A.; KHARAT, A. R.; PATIL, S. V. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 5, p. 388-396, 2014.

RICHTER, J. Evolution of schistosomiasis- induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p.111-131, 2000.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, AL. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell Viability Assays. In: SITAPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P. **Assay Guidance Manual**. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

ROSS, A. G. P.; ARTLEY, P. B. B.; OLDS, G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 16, p. 1212 – 1220, 2002.

ROZMER, Z.; PERJÉSI, P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 1, p. 87-120, 2014.

RUIZ, C. HADDAD, M.; ALBAN, J.; BOURDY, G.; REATEGUI, R.; CASTILLO, D.; SAUVAIN, M.; DEHARO, E.; ESTEVEZ, Y.; AREVALO, J.; ROJAS, R. Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 363–366, 2011.

SAHU, N. K.; BALBHADRA, S. S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D. V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 209-255, 2012.

SAMSASEVAM, Y.; FAROUK, A. A. O.; MOHAMAD, T. A. T.; SULAIMAN, M. R.; BHARATHAM, B. H.; PERIMAL, E. K. Cardamonin attenuates hyperalgesia and allodynia in a mouse model of chronic constriction injury-induced neuropathic pain: Possible involvement of the opioid system. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 32-38, 2017.

SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete – A review. **Construction and Building Materials**, v. 24, p. 2060–2071, 2010.

SAYED, A. A.; SIMENOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of Oxadiazoles as New Drug Leads for the Control of Schistosomiasis. **Nature Medicine**, v. 14, n. 4, p. 407-412, 2008.

SI, H.; XU, C.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; LI, B.; ZHOU, X.; ZHANG, J. Licochalcone A: An effective and low-toxicity compound against *Toxoplasma gondii* *in vitro* and *in vivo*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 238-245, 2018.

SILVA, M. P. N.; OLIVEIRA, G. L. S.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L.; DE MORAES, J. AntiSchistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v.19, n. 3, p.3793–3803, 2014.

SISPCE/SVS/MS - Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Disponível em <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/png/2017/setembro/14/mapa-distribuicao-esquistossomose-2010-2015.png>. Acessado em: 01/08/2017

SKELLY, P. J.; DA`DARA, A. A.; LI, X. H.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Schistosome Feeding and Regurgitation. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 8, p. 1-10, 2014.

SKOOG, D. A; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Editora Thomson, 8ª edição, 2006.

SMITHERS, S.; TERRY, R. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 04, p. 695-700, 1965.

SOARES, M. V. **Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOLDATI, P. P. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga natural para aplicação tópica**. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. J.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticle as delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA JÚNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. *Schistosomiasis mansoni*: general aspects, immunology, pathogenesis and natural history. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

SOUZA, A. L. R.; ANDREANI, T.; OLIVEIRA, R. N.; KIILL, C. P.; SANTOS, F. K.; ALLEGRETTI, S. M.; CHAUD, M. V.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M.; GREMIÃO, M. P. D. *In vitro* evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of the

schistosomiasis treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 1, p. 31–37, 2014.

SOUZA, R. L.; GONÇALVES, U. O.; BADOÇO, F. R.; DE SOUZA GLAVÃO, L.; SANTOS, R. A. D.; DE CARVALHO, P. H. D.; DE CARVALHO, L. S. A.; DA SILVA FILHO, A. A.; VENEZIANI, R. C. S.; RODRIGUES, V.; AMBROSIO, S. R.; MAGALHÃES, L. G. Licochalcone A induces morphological and biochemical alterations in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 96, p. 64-71, 2017.

SPIVAK, A. Y.; KEISER, J.; VARGAS, M.; GUBAIDULLIN R. R.; NEDOPEKINA, D. A.; SHAKUROVA, E. R.; KHALITOVA, R. R.; ODINOKON, V. N. Synthesis and activity of new triphenylphosphonium derivatives of betulin and betulinic acid against *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6297–6304, 2014.

SUH, W. H.; SUSLICK, K. S.; STUCKY, G. D.; SUH, Y. H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress in Neurobiology**, v. 87, n. 3, p. 133-170, 2009.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; MAZUR, B.; SEDEK, L.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2010.

TEMPONE, A. J.; BIANCONI, M. L.; RUMJANEK, F. D. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 177, n.1-2, p. 139–144, 1997.

TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; PURIPATTANAVONG, J.; PANPHADUNG, T. HIV-1 protease inhibitory substances from the rhizomes of *Boesenbergia pandurata* Holtt. **Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 503-508, 2003.

TOMIOTTO-POLLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; MACHADO, L. F.; BORTOLETI, B. T. S.; SAHD, C. S.; CHAGAS, A. F.; ASSOLINI, J. P.; OLIVEIRA, F. J. A.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA, I. N.; MELANDA, F. N. Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 174, p. 64-71, 2017.

UTZINGER, J.; XIAO, S. H.; TANNER, M.; KEISER, J. Artemisinins for schistosomiasis and beyond. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 8, n. 2, p. 105–116, 2007.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E. K.; CAFFREY, C. R.; KEISER, J. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, n. 0, p. S121-S137, 2011.

UTZINGUER, J.; BECKER, S. L.; LIESHOUT L.; VAN DAM, G. J.; KNOPP, S. New diagnostic tools in schistosomiasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 6, p. 529-542, 2015.

VALENTIM, C. L.; CIOLI, D.; CHEVALIER, F. D.; CAO, X.; TAYLOR, A. B.; HOLLOWAY, S. P.; PICA-MATTOCCIA, L.; GUIDI, A.; BASSO, A.; TSAI, I. J.; BERRIMAN, M.; CARVALHO-QUEIROZ, C.; ALMEIDA, M.; AGUILAR, H.; FRANTZ, D. E.; HART, P. J.; LOVERDE, P. T.; ANDERSON, T. J. Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in Schistosome parasites. **Science**, v. 342, n. 6164, p. 1385-1389, 2013.

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22139-22145, 1996.

VERMA D. D., VERMA S., BLUME G., FAHR, A. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: A skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 271-277, 2003.

VERAS, L. M.; GUIMARAES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; DE MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VITORINO, R. R.; SOUZA, F. P. C.; COSTA, A. P.; JÚNIOR, F. C. F.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WANG, Z. T.; LAU, C. W.; CHAN, F. L.; YAO, X.; CHEN, Z. Y.; HE, Z. D.; HUANG, Y. Vasorelaxant effects of cardamonin and alpinetin from *Alpinia henryi* K. Schum. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 37, p. 596-606, 2001.

WANG, J. J.; LIU, K. S.; SUNG, K. C.; TSAI, C. Y.; FANG, J. Y. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 2, p. 138-146, 2009.

WHO. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**, 2006.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases, **France**, 2010.

WHO. Schistosomiasis: progress report 2001 - 2011, strategic plan 2012 - 2020. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**, 2013.

WHO. Report of the Tenth Meeting of the WHO Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases. Geneva (Switzerland): **World Health Organization**, 2017a.

WHO. Schistosomiasis. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Última atualização: janeiro/2017. Acesso em: 17 mai. 2017b.

WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

XIAO, S. H.; MEI, J. Y.; JIAO, P. Y. The *in vitro* effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. **Parasitology Research**, v.106, n. 1, p. 237–246, 2009.

XIAO, X.Y.; HAO, M.; YANG, X.Y.; BA, Q.; LI, M.; NI, S.J.; DU, L.S. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. **Cancer Letters**. v. 302, p. 69–75, 2011.

XIE, S.; PAN, B.; WANG, M.; ZHU, L.; WANG, F.; DONG, Z.; WANG, X.; ZHOU, W. Formulation, characterization and pharmacokinetics of praziquantel-loaded hydrogenated castor oil solid lipid nanoparticles. **Nanomedicine**, v.5, n. 5, p.693–701, 2010a.

XIE, J.; ZHANG, Y.; WANG, W. HPLC analysis of glycyrrhizin and licochalcone a in *Glycyrrhiza inflata* from Xinjiang (China). **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 1, p. 148-151, 2010b.

YADAV, P.; SONI, G.; MAHOR, A.; ALOK, S.; SINGH, P. P.; VERMA, A. solid lipid nanoparticles: an effective and promising drug delivery system - a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 4, p. 1152 – 1162, 2014.

YAMAMOTO, N.; KAWABATA, K.; SAWADA, K.; UEDA, M.; FUKUDA, I.; KAWASAKI, K.; MURAKAMI, A.; ASHIDA, H. Cardamonin stimulates glucose uptake through translocation of glucose transporter-4 in l6myotubes. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1218–1224, 2011.

YANES, C. V. I.; FILHO, A. A. M.; RIBEIRO, P. R. E.; MELO, A. C. G. R.; TAKAHASHI, J. A.; FERRAZ, V. P.; MAZOMBITE, D. M. S.; SANTOS, R. C. Inhibition of Acetylcholinesterase and Fatty Acid Composition in *Theobroma grandiflorum* Seeds. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 9, n. 3, 2017.

ZAGO, M. A.; FALCAO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. Editora Ateneu, 1 edição, 2004.

ZAMBITO, Y.; PEDRESCHI, E.; DI COLO, G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? - A case study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 28-34, 2012.

ZENGER, K.; DUTTA, S.; WOLF, H.; GENTON, M. G.; KRAUS, B. *In vitro* structure-toxicity relationship of chalcones in human hepatic stellate cells. **Toxicology**, v. 336, p. 26-33, 2015.

ZHAI, L.; BLOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n. 12, p. 2742-2748, 1995.

ZHANG, X. F.; LIU, Z. G.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.