



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA**

**Produção, caracterização e avaliação citotóxica de membranas
lipídicas miméticas para a liberação do tripanocida N, N'-
Squaramide 17 na linhagem CL-Brener de *Trypanosoma cruzi***

CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM NANOCIÊNCIA E NANO BIOTECNOLOGIA

**BRASÍLIA-DF
NOVEMBRO/2018**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Produção, caracterização e avaliação citotóxica de membranas lipídicas miméticas
para a liberação do tripanocida N, N'-Squaramide 17 na linhagem CL-Brener de
*Trypanosoma cruzi***

CHRISTIAN RAFAEL QUIJIA QUEZADA

Dissertação de mestrado a ser apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia pela Universidade de Brasília – UnB.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Marcella Lemos
Brettas Carneiro.

Co orientadora: Prof.^a. Dra. Izabela Marques
Dourado Bastos.

Brasília-DF, terça-feira 13 de novembro de 2018

Produção, caracterização e avaliação citotóxica de membranas lipídicas miméticas para a liberação do tripanocida N, N'-Squaramide 17 na linhagem CL-Brener de *Trypanosoma cruzi*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro
Faculdade de Planaltina - UNB
Orientadora

Prof.^a Dra. Sônia Nair Bão
Instituto de Biologia - UNB
Membro Titular Interno Vinculada ao Programa

Prof.^a Dra. Adriana Monte Cassiano Canavaci
Faculdade de Ciências da Saúde-
Departamento de farmácia
Membro Titular Interno não Vinculada ao Programa

Prof.^a Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva
UNB
Membro suplente não Vinculada ao Programa

Dedicatória

Dedico esta disertación a mis padres Delfida Gricelia Quezada Rodríguez y Miguel Ángel Quijía Gualoto, que siempre me apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica para poder llegar a cumplir otro objetivo profesional.

A mis hermanos Angela Quijía, Miguel Quijía y Delfida Quijía, por su apoyo que siempre me brindaron día a día.

Christian Rafael Quijía Quezada

“Tenta. Fracassa. Não importa. Tenta outra vez. Fracassa de novo. Fracassa melhor.”

Samuel Beckett

Agradecimento

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha família e amigos. Especialmente, meus pais que sempre me apoiaram em tudo que eu precisava durante o mestrado e minha irmã por me ouvir em momentos difíceis.

A todos os amigos Eloisio, Marcelle, Allan Oliveira que direta ou indiretamente participaram da minha formação, o meu muito eterno agradecimento.

A todos do laboratório de Microscopia-UnB, em especial a Ingrid, Ana Luísa, Diogo, Barbara, aos quais sou grato, por todo o conhecimento científico em microscopia e cultura celular. A todos, muito obrigado.

A todos do laboratório de Patologia Molecular-UnB, em especial a Milene, Camila, Clênia e a todo o pessoal, aos quais sou grato, por ter auxiliado na realização dos ensaios de citotoxicidade, auxílios estes que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos professores, da minha banca por aceitar ser parte de minha defesa de mestrado.

Agradeço à professora Dra. Otilie do laboratório de nanotecnologia ambiental da UnB-Planaltina, por seus auxílio e conhecimentos em espectroscopia infravermelho.

Agradeço também aos colaboradores, à doutora Cinthia Bonatto e o doutor Luciano Paulino da EMBRAPA, por ter auxiliado na sínteses e caracterização da nanoestrutura desse trabalho.

Desejo expressar meus agradecimentos à professora Dra. Marcella Lemos Brettas, na qualidade de orientadora e pesquisadora do programa de Nanociência e Nanobiotecnologia, reconhecendo seu trabalho e dedicação permanente e contínua ao presente trabalho de investigação, assim como suas sugestões e observações, sempre inteligentes e oportunas. Agradeço ainda sua amizade e o respeito que sempre me tratou.

Finalmente, também gostaria agradecer o apoio recebido de minha co-orientadora de dissertação a professora Izabela Bastos do laboratório de patologia, por todas suas dicas científicas para o desenvolvimento da dissertação, assim como reconhecer todos os conhecimentos que me tem logrado transmitir nas inumeráveis horas que temos passado juntos trabalhado. Sempre serei agradecido e em dívida com ela.

RESUMO

A doença de Chagas afeta cerca de 25 milhões de pessoas no mundo e é causada por *Trypanosoma cruzi* (T.c.). Atualmente, os dois únicos medicamentos disponíveis utilizados para o tratamento desta enfermidade - benzonidazol (BZ) e nifurtimox - provocam efeitos adversos no paciente. Com isso, novos fármacos têm sido estudados a fim de se encontrar estratégias terapêuticas mais eficientes, como o N, N'-Squaramide 17 (S) um composto com excelente potencial terapêutico. Por meio da nanotecnologia, é possível aumentar a eficiência de fármacos e reduzir a sua toxicidade, graças às propriedades de nanoestruturas que podem favorecer a liberação sustentada, utilizando doses baixas do fármaco e aumentando sua concentração nos tecidos alvos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver membranas lipídicas miméticas, a partir de lipídios das membranas celulares de macrófagos (linhagem RAW 264.7) e encapsular o S nesta nanoestrutura, visando melhorar sua eficácia tripanocida sobre linhagem CL-Brener. Assim, foram desenvolvidas e caracterizadas as nanoestruturas: (1) membrana mimética lipídica contendo S (MLS); (2) membrana mimética lipídica vazia (MLV) e (3) N, N'-Squaramide 17 extrusado (SE). Adicionalmente, foram avaliados as características físico-químicas e os efeitos citotóxico e tripanocida destas nanoestruturas. O diâmetro hidrodinâmico (dH) médio e potencial zeta das nanoestruturas foram, respectivamente, de 196.5 ± 11 nm/– 61.43 ± 2.3 mV para MLS; 203.1 ± 8.5 nm/– $12.9 \pm 1,2$ mV para MLV e 713.9 ± 112.6 nm/– 45.3 ± 7.45 mV para SE. Notou-se que o dH da MLS reduziu em torno de 70 nm após 10 dias de armazenamento, indicando possível liberação do S. A encapsulação de S nas membranas miméticas foi comprovada empregando a análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR) e notou-se que a nanoestrutura MLS apresentou bandas em 1788 cm^{-1} e 1674 cm^{-1} características dos grupos carbonilas existentes em S. Em relação aos efeitos citotóxicos, após 72h de tratamento, observou-se que a MLV apresentou excelente potencial como veículo para entrega de fármacos visto ter nenhuma citotoxicidade em células de mamíferos nas concentrações testados. Por outro lado, MLS, nanoestrutura contendo o S, foi ativo contra epimastigotas (IC_{50} de $15,9 \pm 4,8\ \mu\text{M}$) e amastigotas intracelulares (IC_{50} de $24,99 \pm 4,8\ \mu\text{M}$). Ademais, induziu baixa citotoxicidade com IC_{50} de 626.7 ± 4.7 em células VERO e de 1974 ± 6 em RAW 264.7. A partir destes dados, determinou-se o índice de seletividade (SI) e observou-se que MLS induziu atividade tripanocida superior ao BZ em 57 vezes quando foram avaliadas a forma epimastigota e 9 vezes maior em amastigota, mostrando ter ação alvo específica. Nos ensaios de infecção celular, as células VERO foram infectadas com tripomastigotas e posteriormente incubadas com a metade da citotoxicidade ($IC_{50}/2$): ($313\ \mu\text{M}$) de MLS por 12 h e depois analisou-se sua atividade tripanocida durante oito dias. Observou-se no 8º dia maior inibição na taxa de infecção de amastigotas (72 %) do que com o tratamento com BZ (51%) ($6.84\ \mu\text{M}$). Ainda, o número de tripomastigotas extracelulares foi reduzido em 81 % após tratamento com MLS enquanto que BZ reduziu em 54 %. MLS também induziu alterações estruturais nos parasitas como fissuras com diâmetro de aproximadamente 200 nm na parte superior celular da epimastigota e em tripomastigota uma diferenciação em amastigota. Desta forma, MLS apresentou promissora eficácia tripanocida. Ademais, o fato da MLS ter induzido baixa citotoxicidade nas linhagens celular de mamíferos (RAW 264.7 e VERO) e elevada atividade contra os parasitas demonstra sua toxicidade alvo-específica, tornando, assim, estas nanoestruturas promissoras para aplicação no tratamento da doença de Chagas.

Palavra Chave: Chagas, lipossomas, efeito tripanocida, citotoxicidade, nanoestruturas, membrana lipídicas miméticas, nanocristais.

ABSTRACT

Chagas disease affects about 25 million people in the world and is caused by *Trypanosoma cruzi* (*T.c.*). Currently, the only two drugs available for its treatment - Benznidazol (BZ) and nifurtimox - cause adverse effects in the patient. With this, new drugs have been studied in order to find more efficient therapeutic strategies, such as N, N'-Squaramide 17 (S), which represents a compound with excellent therapeutic potential. By means of nanotechnology, it is possible to improve the drug activity thanks to the properties of nanostructures that can promote sustained release using low doses of drug and increasing its concentration in tissues. The objective of this work was to develop mimetic lipid membranes, from macrophage cell membrane lipids (lineage RAW 264.7) and encapsulate the S in this nanostructure, thus improving its trypanocidal efficacy on CL-Brener strain. Thus, nanostructures were developed and characterized: (1) mimetic lipid membrane containing S (MLS); (2) empty lipid mimetic membrane (MLV) and (3) N, N'-Squaramide 17 extruded (SE). Additionally, the physico-chemical characteristics and the cytotoxic and trypanocidal effects of these nanostructures were evaluated. The mean hydrodynamic diameter (dH) and zeta potential of the nanostructures were, respectively, 196.5 ± 11 nm / $- 61.43 \pm 2.3$ mV for MLS; 203.1 ± 8.5 nm / $- 12.9 \pm 1.2$ mV for MLV and 713.9 ± 112.6 nm / $- 45.3 \pm 7.45$ mV for SE. It was observed that the MLS dH reduced around 70 nm after 10 days of storage, indicated possible release of S. The encapsulation of S in the mimetic membranes was verified using the analysis of vibrational spectroscopy in the infrared (IR) region and it was observed that the MLS nanostructure showed bands in 1788 cm^{-1} and 1674 cm^{-1} characteristics of the existing carbonyl groups in S. In relation to the cytotoxic effects, after 72h of treatment, it was observed that the MLV presented an excellent potential as vehicle for the delivery of drugs since there is no cytotoxicity in the mammalian cells under the concentrations tested. On the other hand, MLS, the nanostructure containing the S, was active against epimastigotes (IC_{50} of 15.9 ± 4.8 μM) and intracellular amastigotes (IC_{50} of 24.99 ± 4.8 μM), in addition, induced low cytotoxicity with IC_{50} of 626.7 ± 4.7 in VERO cells and 1974 ± 6 in RAW 264.7. From these data, the selectivity index (SI) was determined and it was observed that MLS induced trypanocidal activity superior to BZ in 57 times over epimastigota form and 9 times greater in amastigotas, showing a specific action. In the cell infection assays, the VERO cells were infected with trypomastigotes, incubated with half of the cytotoxicity $\text{IC}_{50}/2$: (313 μM) of MLS for 12 h and then their trypanocidal activity was analyzed for eight days. It was observed on the 8th day, there was a greater inhibition in the infection rate of amastigotes (72%) than with the treatment with BZ (51%) (6.84 μM). In addition, the number of extracellular trypomastigotes was reduced by 81% after treatment with MLS while BZ reduced by 54%. MLS also induced structural changes in parasites such as fissures with a diameter of approximately 200 nm in the upper cellular part of the epimastigote and in tripomastigote showed a differentiation in amastigotes. In this way, MLS presented a promising trypanocidal efficacy. In addition, the fact that MLS has induced low cytotoxicity in mammalian cell lineages (RAW 264.7 and VERO) and high activity against the parasites demonstrates their specific toxicity, thus making this nanostructure promising for its application in the treatment of Chagas disease.

Key Word: Chagas, liposomes, trypanocidal effect, cytotoxicity, nanostructures, mimetic lipid membrane, nanocrystals.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| LISTA DE ESQUEMA | iii |
| LISTA DE TABELA | iii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Doença de Chagas | 1 |
| 1.1.1 Etapas evolutivas do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> | 1 |
| 1.1.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 3 |
| 1.1.3 Interação de <i>Trypanosoma cruzi</i> com células hospedeiras | 4 |
| 1.1.4 Diversidade genética de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 6 |
| 1.1.5 Clone CL-Brener (T.c. VI) de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 7 |
| 1.1.6 Tratamento contra a doença de Chagas | 7 |
| 1.1.6.1 Desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas | 8 |
| 1.1.6.2 Ácido Esquárico | 8 |
| 1.1.6.2.1 N, N'- Squaramide 17 | 8 |
| 1.2 Nanotecnologia | 10 |
| 1.2.1 Nanotecnologia aplicada a doença de Chagas | 10 |
| 1.3 Macrófagos | 11 |
| 1.4 Lipídios | 11 |
| 1.5 Membrana celular | 12 |
| 1.6 Lipossomas | 13 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 14 |
| 3 OBJETIVOS | 15 |
| 3.1 Geral | 15 |
| 3.2 Objetivos específicos | 15 |
| 4 MATERIAIS | 16 |
| 4.1 Material | 16 |
| 4.1.1 Reagentes | 16 |
| 4.1.2 Materiais | 16 |
| 4.1.3 Equipamentos | 16 |
| 4.1.4 Cultivo e manutenção de células e parasitos | 17 |
| 5 METODOLOGIA | 17 |
| 5.1 Obtenção de lipídios a partir de macrófagos da linhagem RAW 264.7 | 18 |
| 5.2 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados por método de extrusão | 19 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.3 | Caracterização dos sistemas nanoestruturados | 20 |
| 5.3.1 | Análises dos sistemas nanoestruturados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR) | 20 |
| 5.3.2 | Espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta para avaliação do diâmetro hidrodinâmico. | 20 |
| 5.3.3 | Análises de tamanho por microscopia eletrônica de transmissão-MET. | 21 |
| 5.3.4 | Avaliação da estabilidade das nanoestruturas submetidas à diferentes potenciais hidrogeniônicos. | 21 |
| 5.4 | Linhagem CL-Brener <i>T.c. VI de Trypanosoma cruzi</i> | 21 |
| 5.5 | Ensaio de atividade biológicas <i>in vitro</i> | 22 |
| 5.5.1 | Ensaio de citotoxicidade | 23 |
| 5.5.1.1 | Ensaio de citotoxicidade em epimastigotas | 23 |
| 5.5.1.2 | Ensaio de citotoxicidade em células VERO e macrófago RAW 264.7 | 24 |
| 5.5.1.3 | Ensaio de citotoxicidade em amastigotas intracelulares em célula VERO | 24 |
| 5.5.2 | Avaliação do índice de seletividade celular | 25 |
| 5.5.3 | Ensaio de infecção de <i>T. cruzi</i> em células VERO | 25 |
| 5.6 | Alterações ultraestruturais em epimastigotas e tripomastigotas | 26 |
| 5.7 | Análises estatísticas | 26 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 27 |
| 6.1 | Obtenção de lipídios e desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados | 27 |
| 6.2 | Caracterização dos sistemas nanoestruturados | 29 |
| 6.2.1 | Análises dos sistemas nanoestruturados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR) | 29 |
| 6.2.2 | Espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta para avaliação do diâmetro hidrodinâmico. | 30 |
| 6.2.3 | Análises de tamanho por microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 31 |
| 6.2.4 | Avaliação da estabilidade das nanoestruturas submetidas a diferentes potenciais hidrogeniônicos | 34 |
| 6.3 | Ensaio de atividades biológicas <i>in vitro</i> | 36 |
| 6.3.1 | Citotoxicidade de Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV) | 36 |
| 6.3.2 | Ensaio de citotoxicidade. | 37 |
| 6.3.2.1 | Mecanismo hipotético da ação tripanocida da MLS sobre as formas amastigotas de CL-Brener no interior da célula VERO. | 41 |
| 6.4 | Ensaio de infecção celular | 42 |
| 6.5 | Alterações estruturais no <i>T. cruzi</i> | 47 |
| 6.5.1 | Epimastigotas | 48 |
| 6.5.2 | Tripomastigotas | 50 |
| 7 | CONCLUSÃO | 52 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 8 | PERSPECTIVAS | 53 |
| 9 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 53 |
| 10 | ANEXO | 54 |
| 11 | PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE A FORMAÇÃO DO MESTRADO | 59 |
| 12 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| BZ | Benzonidazol |
| DTU | Unidades de Tipificações Discreta |
| DLS | Espalhamento de luz dinâmico |
| dH | Diâmetro hidrodinâmico |
| Dm | Diâmetro modal |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| MLS | Membranas lipídicas miméticas com N, N'- Squaramide 17 |
| MLV | Membranas lipídicas miméticas vazios |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| NanoDDS | Sistemas de administração a partir de nanofármacos |
| OsO4 | Tetróxido de ósmio |
| Pdl | Índice de polidispersividade |
| PC | Fosfatidilcolina |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PI | Fosfoinositol |
| OS | Fosfatidilserina |
| PZT | Tubo piezoelétrico |
| Pdl | Índice de polidispersividade |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| SM | Esfingomielina |
| S | N, N' - Squaramide 17 |
| SE | N, N' - Squaramide 17 extrusado |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SI | Índice de Seletividade |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| IC ₅₀ | Concentração mínima para inibir 50% da população celular |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representações esquemáticas dos estádios dos parasitas: Epimastigotas, Tripomastigotas e Amastigotas | 2 |
| Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 4 |
| Figura 3. Vista esquemática das diversas fases de interação de <i>T. cruzi</i> com as células de vertebrados..... | 5 |
| Figura 4. Distribuição geográfica das 6 Unidades de Tipificações Discreta (DTU's) e sua correspondência com ciclos de transmissão associadas ao ambiente silvestre e ou domiciliar | 6 |
| Figura 5. Estrutura do Diketocyclobutenediol | 8 |
| Figura 6. Estrutura de fosfolipídios | 12 |
| Figura 7. Modelos lipofílicos e hidrofílicos de encapsulamento de fármacos | 13 |
| Figura 8. Conjunto de extrusão (Modificado de Avanti Polar Lipids) | 19 |
| Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho dos sistemas nanoestruturados e fármaco livre analisados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR). 30 | |
| Figura 10. Características morfológicas das nanoestruturas analisados por microscopias eletrônicas de transmissão (MET) | 32 |
| Figura 11. Histogramas de distribuição de classes (N=100 partículas) referentes aos valores de tamanho de partículas avaliados por microscopia eletrônica de transmissão | 33 |
| Figura 12. Distribuição da MLS medido por espalhamento de luz dinâmico (DLS) | 36 |
| Figura 13. Porcentagem de Viabilidade celular em célula VERO e Macrófago RAW 264.7 tratadas com MLV durante 72 horas | 37 |
| Figura 14. Célula VERO infectada com <i>T. cruzi</i> - CL-Brener | 42 |
| Figura 15. Porcentagem de taxa da infecção de <i>T. cruzi</i> em células VERO tratadas com a dose de $IC_{50}/2$ | 44 |
| Figura 16. Número de amastigotas de <i>T. cruzi</i> em células VERO tratadas na dose de $IC_{50}/2$ | 45 |
| Figura 17. Número de tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> em células VERO tratadas com $IC_{50}/2$... 46 | |
| Figura 18. Alterações morfológicas analisado por MEV em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 50 |
| Figura 19. Alterações morfológicas analisadas por MEV em tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> tratadas com S e MLS por 12 h. | 51 |

LISTA DE ESQUEMA

| | |
|---|----|
| Esquema 1. (A) Esquema estrutural do N, N'- Squaramide 17 e suas características químicas. (B) Formado por duas aminas e um ciclo-aromático "Ácido Esquárico"; UIB-A47 registro da patente. | 9 |
| Esquema 2. Etapas do projeto. | 18 |
| Esquema 3. Ensaio de avaliação das atividades biológicas | 22 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Listagens de Reagentes..... | 16 |
| Tabela 2. Listagens de materiais..... | 16 |
| Tabela 3. Listagens de Equipamentos | 16 |
| Tabela 4 Propriedades físicas-químicas das diferentes nanoestruturas e N, N'- Squaramide 17 extrusado (SE). | 31 |
| Tabela 5. Variação no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade das diferentes nanoestruturas avaliadas após um e dez dias da sua produção sob diferentes pHs. | 35 |
| Tabela 6. Atividade citotóxica e índice de seletividade..... | 39 |
| Tabela 7. IC ₅₀ /2 sobre as formas extracelular (epimastigotas e tripomastigotas) de <i>Trypanosoma cruzi</i> CL-Brener. | 47 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana foi descoberta em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em Minas Gerais (KROPF, 2008). E é considerada endêmica em 21 países da América Latina e tem provocado mais de 7.000 mortes por ano além de manter o risco de infecção em mais de 25 milhões de pessoas (WHO, 2017). Esta enfermidade é transmitida aos seres humanos principalmente por meio das fezes de insetos triatomíneos (vetor) com hábitos hematófagos e conhecidos como barbeiros, percevejos ou por outros nomes, dependendo da área geográfica (RASSI JR *et al.*, 2009).

Esta doença apresenta manifestações clínicas variáveis e que estão relacionadas com fatores genéticos do parasita e do hospedeiro. Assim, a enfermidade causa elevada parasitemia, na fase aguda, a qual é detectável a presença de *T. cruzi* na corrente sanguínea e a localização dos parasitas em alguns órgãos do hospedeiro. Normalmente, as manifestações clínicas relacionadas à esta fase, no homem, são febres, edemas, mialgia, taquicardia, astenia, dentre outras (ABAD-FRANCH, 2003). Por outro lado, a fase crônica é caracterizada por baixa parasitemia e, as manifestações clínicas envolvem problemas cardíacos e/ou gastrointestinais (PRATA, 2001).

1.1.1 Etapas evolutivas do parasito *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* passa por três distintas etapas evolutivas morfológicas e fisiológicas (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas) durante seu ciclo de vida, sendo que estas etapas são identificadas por meio da posição do cinetoplasto (massa de DNA circular extranuclear) em relação ao núcleo celular e flagelo (BRENER, 1965).

A forma amastigota mede em torno de 3 a 5 μm de diâmetro, possui um flagelo curto e apresenta um grande núcleo do qual se encontra o cinetoplasto em forma de bastão (**Figura 1**). Esta forma de *T. cruzi* replica-se no hospedeiro vertebrado e é capaz de se transformar na forma epimastigota no intestino do inseto vetor. Amastigotas podem ser encontradas no interior de muitos tipos celulares como células de fibras musculares estriadas, cardíacas e esqueléticas. Ainda, algumas linhagens têm afinidade ao sistema nervoso podendo infectar células da glia e neurônios (REYES, 1991).

A forma epimastigota caracteriza-se por possuir uma forma alongada com cerca de 20 a 40 μm de comprimento. O cinetoplasto tem uma forma de bastão e são localizados na parte interior-lateral ao núcleo (DE SOUZA *et al.*, 2010). Epimastigotas se replicam no intestino médio do inseto vetor e suas multiplicações são realizadas por divisões binárias longitudinais. Nestas divisões, as epimastigotas permanecem agrupadas formando enormes rosetas com as extremidades flageladas dirigidas ao centro. Interessantemente, estas formas evolutivas de *T. cruzi* desenvolvem-se em temperatura ambiente, não suportando temperatura de hospedeiros vertebrados. Por isso, elas são lisadas a 37 °C (REYES, 1991). A forma tripomastigota é a mais infecciosa de *T. cruzi* em vários tipos celulares. Esta forma pode ser encontrada nos meios intracelular e extracelular ou livres na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado ou, ainda, e na parte posterior terminal do intestino do inseto vetor, exclusivamente nas suas fezes (formas tripomastigotas metacíclicas). Esta forma evolutiva do parasita possui cerca de 25 μm de comprimento e 2 μm de diâmetro. O cinetoplasto tem forma alongada e está localizado na parte posterior ao núcleo (DE SOUZA, 2002). Na **Figura 1** são representadas as três formas evolutivas de *T. cruzi*.

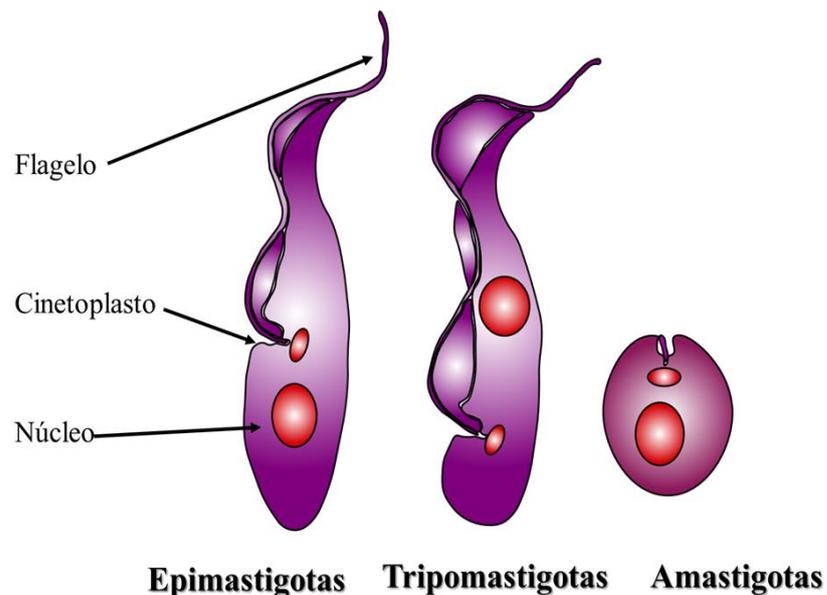


Figura 1. Representações esquemáticas dos estádios: Epimastigotas, Tripomastigotas e Amastigotas que compõem o ciclo de vida do parasito. Adaptado de TEIXEIRA *et al.*, (2006).

1.1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Os triatomíneos são insetos hematófagos obrigatórios e, portanto, estes vetores podem ser infectados pelo parasita quando se alimentam do sangue humano ou de animais infetados. Os tripanosomas que são ingeridos através da probóscide (apêndice alongado que se localiza na cabeça do inseto) se transformam em epimastigotas curtos; os quais se multiplicam por divisão binária e se desenvolvem em formas alongadas, na parte posterior do intestino médio dos triatomíneos. Num período de oito a dez dias, as formas tripomastigotas metacíclicas se localizam no intestino do vetor e são eliminadas pelas fezes (GUZMÁN-MARIN EUGENIO, 1990). Estas formas parasitárias são as que infectam o hospedeiro principalmente quando este esfrega ou coça a pele após a picada do inseto (AGUILAR *et al.*, 1999). O ciclo de vida do *T. cruzi* é mostrado na **Figura 2**.

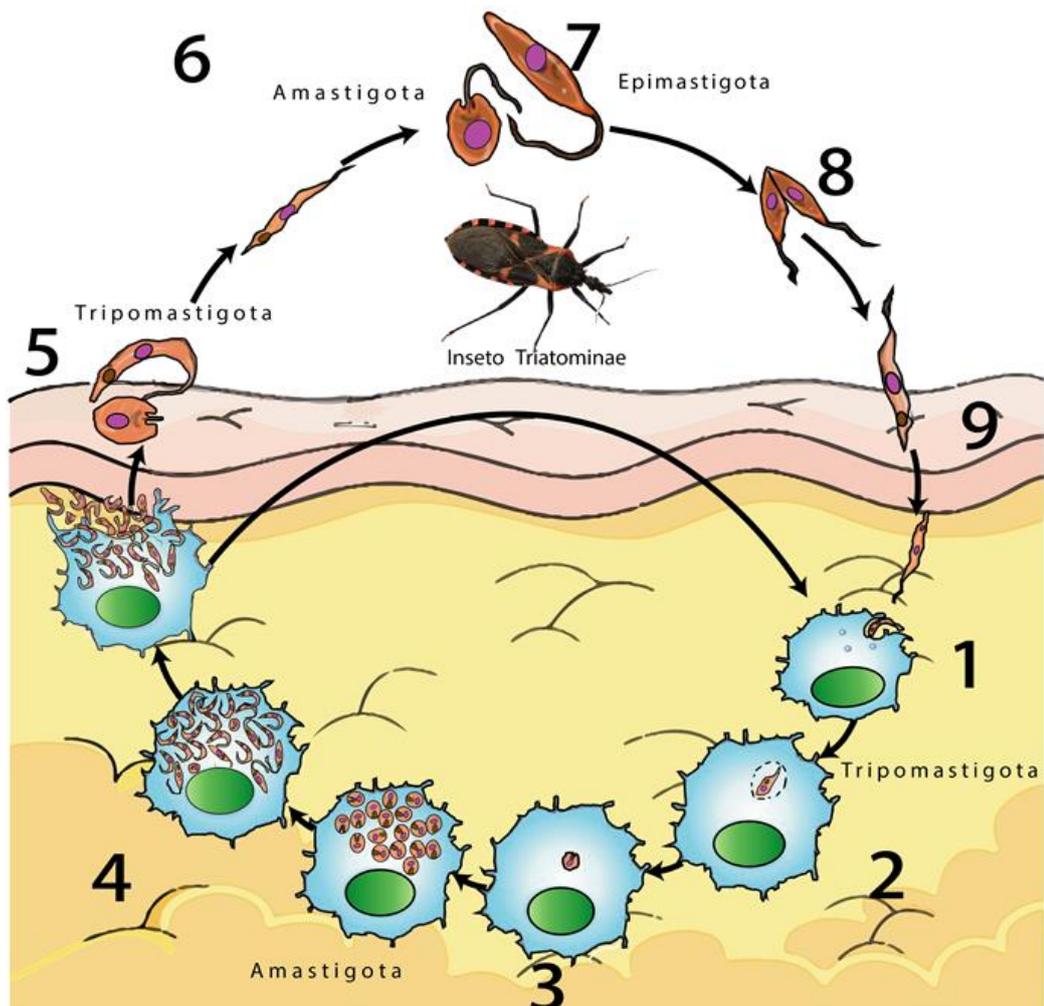


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*: (1) As formas tripomastigotas metacíclicas do parasita são depositados com as fezes do inseto vetor, ou através da superfície de mucosas, estes infectam as células do hospedeiro e, logo, se diferenciam em amastigotas. (2) As amastigotas são capazes de proliferar no ambiente intracelular. (3 e 4) As amastigotas se diferenciam em tripomastigotas e logo estas lisam a célula hospedeira e, com isso, são liberados à corrente sanguínea. (5) No sistema circulatório as tripomastigotas colonizam novos tecidos logrando uma infecção a nível sistêmico. (6) o inseto ingere parasitas ao alimentar-se do sangue de um indivíduo infectado. (7) Estes parasitas se encontram no estágio tripomastigota sanguíneo, não replicativo. (8) Ao avançar pelo trato digestivo os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas e proliferam no trato do intestino do vetor. (9) Quando os epimastigotas atingem o reto estes são estimulados a se diferenciarem em tripomastigotas. O ciclo é fechado quando novamente um inseto ingere tripomastigotas ao se alimentar do sangue do hospedeiro mamífero. Adaptado de STUART *et al.*, (2008).

1.1.3 Interação de *Trypanosoma cruzi* com células hospedeiras

O processo de interação entre *Trypanosoma cruzi* e células hospedeiras está associado a três mecanismos sendo eles: (1) adesão e reconhecimento, (2) sinalização celular e (3) invasão. Alguns aspectos sobre a interação de *T. cruzi* e células hospedeiras são fundamentais para estes mecanismos, tais como: (i) a linhagem *T. cruzi* utilizada nos estudos, (ii) se a forma tripomastigota utilizada é delgada ou grossa e (iii) que linhagens de células estão infectadas. Desta forma, é possível prever que tipo de mecanismo implica no reconhecimento, sinalização e invasão dos parasitos (DE ARAUJO-JORGE *et al.*, 1992).

A etapa de reconhecimento consiste na identificação de moléculas que estão presentes tanto na superfície da célula hospedeira como nos parasitas, um exemplo são algumas glicoproteínas (gp) de tripomastigotas como (gp 90, gp 82, gp 35/50) que se expressam em diferentes linhagens. Sendo assim, que estas ajudam a ter melhor vias de sinalização, que podem resultar ou não na internalização eficiente do parasita (DE SOUZA *et al.*, 2010).

Na fase tripomastigota o parasito, tem a capacidade de invadir e se proliferar em qualquer célula nucleada de mamífero (DE ARAUJO-JORGE, 1989; DE ARAUJO-JORGE *et al.*, 1992; BURLEIGH E ANDREWS, 1995). Entre os mecanismos mais comuns utilizados por tripomastigotas para infectar, nos macrófagos está a fagocitose e, para as demais células não fagocíticas a invasão ocorre por meio de endocitose com ou sem formação inicial de lisossomos (EPTING *et al.*, 2010).

Independentemente do mecanismo de entrada do parasito na célula hospedeira, o ciclo intracelular começa com a entrada de tripomastigota, que fica contido temporalmente em uma vesícula de membrana (vacúolos parasitóforos) (RODRIGUEZ *et al.*, 1983). Portanto, o parasito se encontra em meio ácido ocorre secreção de porina (DE SOUZA *et al.*, 2010), uma vez que libera transialidase de superfície (TS) que elimina resíduos de ácidos siálico da membrana do vacúolo permitindo, assim, que o parasita lise a membrana do vacúolo e fique livre no citoplasma da célula hospedeira (ANDREWS E WHITLOW, 1989). Dentro do citoplasma a forma tripomastigota se diferencia em amastigota e posteriormente, começa uma série de divisões binárias até estes preencherem todo o citoplasma da célula hospedeira. Ao final do ciclo de multiplicação, é reiniciada nova diferenciação para tripomastigotas. Em seguida, a membrana da célula hospedeira é rompida e as formas tripomastigotas passam para o meio extracelular tornando-se capazes de infectar novas células (DE SOUZA, 2002). Na **Figura 3** são mostradas diversas fases da interação de *T. cruzi* com as células de vertebrados.

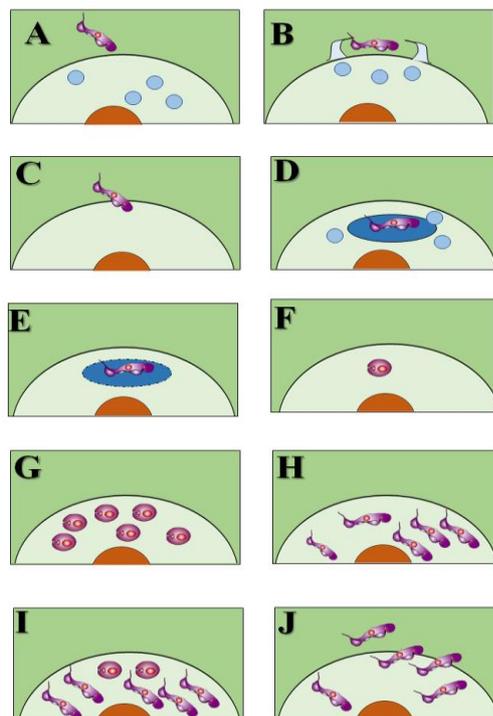


Figura 3. Vista esquemática das diversas fases de interação de *T. cruzi* com as células de vertebrados. (A) O parasita se adere à membrana da célula hospedeira (B) Internalização do parasita através de pseudópodes (C) superfície celular (D) O parasita dentro do vacúolo parasitófora e fusão com os lisossomos (E) A troca de morfologia de tripomastigotas e desintegração da membrana do vacúolo parasitófora (F, G) Liberação das amastigotas no citoplasma da célula hospedeira. (H, I, J) Ruptura da célula hospedeira e a liberação dos tripomastigotas no espaço intercelular. Adaptado de DE SOUZA (2002).

1.1.4 Diversidade genética de *Trypanosoma cruzi*

As diferentes populações de clones de *T. cruzi* se obtêm pelo vetor ou pelo hospedeiro vertebrado visto que atuam como reservatórios do parasito (MACEDO *et al.*, 2004). Assim, pacientes de zonas endêmicas são infectados por diferentes triatomíneos, o que conduz à formação de populações multiclonais de *T. cruzi* e indução de diferentes características genéticas, biológicas e de comportamento destes parasitas (ANDRADE, 1999).

A nomenclatura de *T. cruzi* tem sido adotada em seis Unidades de Tipificações Discreta (DTU) denominadas como *T. cruzi I* (T.c. I), *T. cruzi II* (T.c. II), *T. cruzi III* (T.c. III), *T. cruzi IV* (T.c. IV), *T. cruzi V* (T.c. V) e *T. cruzi VI* (T.c. VI). Estas classificações estão baseadas em estudos em que foram avaliados diferentes marcadores moleculares e de características biológicas (ZINGALES *et al.*, 2009).

Na **Figura 4** é mostrada a distribuição geográfica das 6 DTU's e sua correspondência com os ciclos de transmissão de *T. cruzi* que podem estar associados ao ambiente silvestre (estão relacionados com as espécies silvestres e os insetos triatomíneos que habitam ambientes selvagem) e/ou domiciliares (estão relacionados com alguns insetos vetores que têm colonizado diversos lugares como tijolos de construções primitivos de adobe, pastos e casas com telhados de palha) (HERRERA *et al.*, 2007).

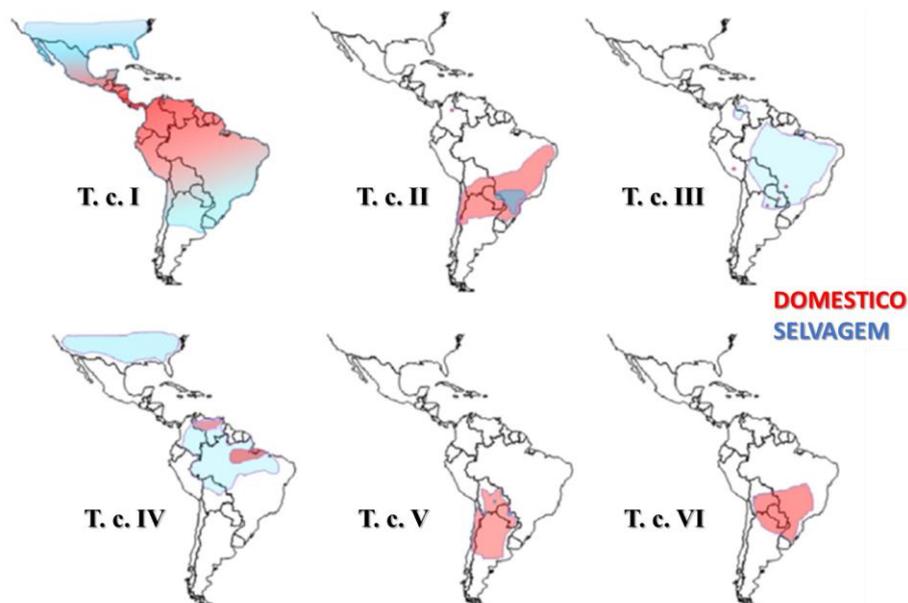


Figura 4. Distribuição geográfica das 6 Unidades de Tipificações Discreta (DTU's) e sua correspondência com ciclos de transmissão associadas ao ambiente silvestre e ou domiciliar. Adaptado de HERRERA *et al.*, (2007).

1.1.5 Clone CL-Brener (T.c. VI) de *Trypanosoma cruzi*

A linhagem CL-Brener é representativa da linhagem híbrida *T. cruzi* VI, que compreende uma forte hibridização de T.c. II e T.c. III (ZINGALES *et al.*, 2009). Este clone, apresenta importantes características tais como ser isolado do vetor domiciliar *Triatoma infestans*. Além disso, seu padrão de infectividade em camundongos é muito conhecido; tem tropismo preferencial por células cardíacas e musculares; mostra uma fase aguda clara em humanos infectados acidentalmente e é susceptível a fármacos (Benzonidazol ou Nifurtimox) usados em ensaios *in vivo* (camundongos) (ZINGALES *et al.*, 1997).

1.1.6 Tratamento contra a doença de Chagas

Atualmente os quimioterápicos, são baseados em componentes nitro heterocíclicos, como os nitrofurano (nifurtimox) e nitroimidazole (benzonidazol). Contudo, estas opções terapêuticas são insatisfatórias visto sua eficácia limitada na prevenção do estágio crônico da doença. Além disso, a ação destes fármacos é afetada pela duração do tratamento, idade, distribuição geográfica dos pacientes, dentre outros (ANDRADE, 1999; URBINA E DOCAMPO, 2003).

A ação dos Nifurtimox ocorre mediante a redução do grupo nitro a radical nitro ânion, que por sua vez reagem para produzir radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos como os metabólitos de oxigênio altamente tóxicos (por exemplo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio). Tem-se demonstrado que o *Trypanosoma cruzi* é deficiente nos mecanismos de detoxificação dos metabólitos do oxigênio, em particular ao peróxido de hidrogênio (DOCAMPO, 1990). Por outro lado, o benzonidazol parece atuar através de um mecanismo diferente (estresse redutor), que implica na modificação covalente de macromoléculas por meio de nitro redução (DE TORANZO *et al.*, 1988).

Estes metabólitos (eletrofílicos) formados através do mecanismo de ação do Nifurtimox e Benzonidazol também podem atuar no organismo hospedeiro humano devido a sua alta reatividade. Esta baixa especificidade de ação em vias bioquímicas definidas do parasita contribui para os efeitos citotóxicos observados no tratamento dos pacientes. Dentre os efeitos adversos mais comuns, causados pela quimioterapia, destaca-se perda de peso, sonolência e manifestações digestivas tais como náuseas, vômitos e cólicas intestinais. Além disso, para agravar ainda mais estes efeitos os tratamentos geralmente requerem longos períodos de hospitalização e são de alto custo (CASTRO *et al.*, 2006).

1.1.6.1 Desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas

O número de investigações envolvidas na descoberta de novos fármacos é baixo devido ao pouco interesse de indústrias farmacêuticas em investir. Atualmente, os fármacos empregados na clínica são ineficientes para terapêutica no estágio crônico da doença de Chagas e muitas vezes sua aplicação está associada a problemas de toxicidade potenciais, visto que seus mecanismos de ação são baseados na inibição do metabolismo do parasita como a cisteína protease (cruzipaina), tripanotiona redutase e sínteses de ergosterol (posaconazol e o ravuconazol) (MONCAYO, 1999; WHO, 2012). Recentemente, uma nova classe de compostos químicos, baseada em ácido esquárico, têm sido sintetizada e têm se demonstrada promissora para o tratamento na doença de Chagas (OLMO *et al.*, 2014).

1.1.6.2 Ácido Esquárico

O *diketocyclobutenediol* (**Figura 5**), também conhecido como "ácido esquárico" ou "ácido quadrático", foi sintetizado em 1959 por COHEN E COHEN (1966), por via hidrólise de dichlorotetrafluorocyclobutene.

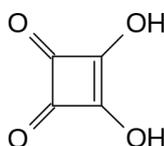


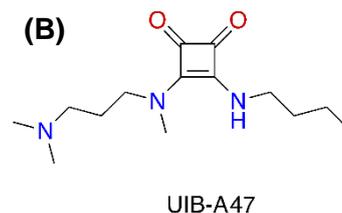
Figura 5. Estrutura do Diketocyclobutenediol. Fonte: (STORER *et al.*, 2011).

Os composto baseado em ácido esquárico tem muitas aplicações terapêuticos como atividade antitumoral, anti-palúdica e atividade antichagásica (STORER *et al.*, 2011). Dentre alguns compostos derivados do ácido esquárico destaca-se o N, N'- Squaramide 17 (OLMO *et al.*, 2014).

1.1.6.2.1 N, N'- Squaramide 17

O N, N'- Squaramide 17 é um agente terapêutico que apresentou elevada atividade tripanocida contra o *Trypanosoma cruzi* tendo uma redução de 67 % da parasitemia na fase aguda da infecção, em modelo camundongo após 40º dia de tratamento comparado com o controle (OLMO *et al.*, 2014). (**Esquema 1**).

| (A) CARACTERÍSTICA QUÍMICAS | |
|------------------------------------|-------|
| Peso molecular (g/mol) | 267,4 |
| Coeficiente de partição log P | 0,59 |
| Área superficial polar A2 | 36,3 |
| Ponte de Hidrogênio Doador | 1 |
| Ponte de Hidrogênio aceptor | 3 |
| pKa em solução aquosa | 8,8 |



Esquema 1. (A) Esquema estrutural do N, N'- Squaramide 17 e suas características químicas. (B) Formado por duas aminas e um ciclo-aromático “Ácido Esquárico”; UIB-A47 registro da patente. Fonte: (OLMO *et al.*, 2014).

Em geral, estas características químicas são compatíveis com a regra dos cinco Lipinski (Ro5), com valores de PSA <100 Å, o que está associado com o potencial de biodisponibilidade oral (Lipinski *et al.*, 2001). O estudo realizado por OLMO *et al.*, 2014 usando o N, N'- Squaramide 17, demonstrou uma boa atividade tripanocida contra a linhagem *T. cruzi* I (SN3), visto ter induzido, inibição parasitária de 52% em números de amastigotas intracelulares, 75 % em tripomastigotas extracelular e 67 % de taxa de infecção analisados até dez dias em estudos *in vitro* com células VERO.

Além disso, foram demonstradas alterações citoplasmáticas e mitocondriais nos processos metabólicos do parasita como diminuição de 28,3%, 18,5%, 18,6% e 26,9%, de D-lactato, L-alanina, acetato e succinato, respectivamente. Além disso, a excreção de piruvato também aumentou em 81,5%, indicando que os produtos finais do catabolismo da glicose no parasita são afetados (CAZZULO, 1992).

1.2 Nanotecnologia

Atualmente os fármacos que se utilizam na clínica não são direcionados para o tecido alvo e tendem a ter biodisponibilidade deficiente (MOSCHETTA *et al.*, 2013), resultando em excreção rápida e elevada toxicidade no organismo tecidual e sistemático. Para se obter um efeito terapêutico é necessário utilizar-se de doses massivas nos sítios de ação desejados. Devido a essas limitações e inconvenientes pesquisadores têm buscado novas estratégias terapêuticas a fim de melhorar a eficiência de moléculas farmacológicas existentes (LUK E ZHANG, 2015).

Por meio da nanotecnologia pode-se obter várias vantagens em relação a quimioterapia convencional. Dentre elas ressalta-se maior meia vida do fármaco favorecendo sua circulação prolongada, e liberação sustentada do fármaco (PETROS *et al.*, 2010). As nanopartículas ou nanomateriais podem ser desenhados para se obter propriedades físicas e químicas desejadas e com características específicas em relação ao tamanho, carga superficial, caráter de solubilidade (hidrofobicidade/hidrofiliabilidade) e forma geométrica, assim permitindo um fornecimento mais eficaz de agentes terapêuticos aos sítios de ação desejados (LUK E ZHANG, 2015).

1.2.1 Nanotecnologia aplicada a doença de Chagas

Os sistemas de administração a partir de nanofármacos (nanoDDS) contra a doença de Chagas, podem favorecer a entrega seletiva de fármacos a alvos intracelulares. Estes nanoDDS devem ter as seguintes objetivos: i) a seletividade para um único grupo de parasita específico (única linhagem de *T. cruzi*), ii) a farmacocinética, biodistribuição e trânsito intracelular convenientes e iii) mostrar eficiência no tratamento nas duas fases da doença aguda e crônica (ROMERO E MORILLA, 2010).

Com o desenvolvimento de NanoDDS espera-se maior eficiência na ação dos fármacos visto que estes podem superar barreiras intracelulares tais como a membrana plasmática e o microambiente complexo das células hospedeiras e subministrar pouca quantidade do fármaco com ação tripanocida, reduzindo sua concentração na circulação sanguínea e aumentando nos tecidos alvos. Ademais, espera-se com o NanoDDS obter maior meia vida do fármaco favorecendo uma liberação sustentada do fármaco (SOSNIK *et al.*, 2009).

Assim, o *designer* dos NanoDDS deve ser feito para que sua ação seja específica, ou seja, em células hospedeiras e em epimastigotas (DE SOUZA *et al.*, 2009) visto que amastigotas e tripomastigotas não apresentam mecanismo de captação de NanoDDS. Por isso, deve-se potencializar os NanoDDS visando sua eficácia para as forma amastigotas residentes e tripomastigotas circulantes haja vista que estes são apresentados em todas as fases da doença de Chagas (ROMERO E MORILLA, 2010).

1.3 Macrófagos

Células de macrófago consistem em um tipo de leucócitos e a sua função principal é fagocitar e digerir detritos celulares, substâncias estranhas, microrganismos, células cancerígenas, etc. Estas células têm cerca de 21 micrômetros de diâmetro e são produzidos pela diferenciação de monócitos quando presente nos tecidos. Além da fagocitose, macrófagos desempenham um papel crítico na defesa inespecífica (imunidade inata) e também em mecanismos de defesa específicos (imunidade adaptativa), recrutando outras células imunes como os linfócitos (GEISSMANN *et al.*, 2010).

1.4 Lipídios

Um lipídio é uma molécula orgânica composta principalmente de carbono e hidrogênio e, em menor grau, de oxigênio. Lipídios também podem conter fósforo, enxofre e nitrogênio e apresentam ampla gama de funções tais como estruturais, hormonais, funções de transporte, dentre outras (FAHY *et al.*, 2009).

Os lipídios anfifílicos constituem em um tipo de lipídios que possuem uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica. Em geral, a parte hidrofóbica consiste em uma cadeia de hidrocarbonetos e a parte hidrofílica é composta por um grupo polar. Dentre os tipos de lipídios destacam-se os fosfolipídios que são compostos por uma molécula de glicerol, ácidos graxos e um grupo fosfato. Este último está unido a outro grupo de átomos, entre os quais geralmente estão incluídos nitrogênio, fósforo, oxigênio, carbono e hidrogênio (COLLIER E MESSERSMITH, 2001). Na **Figura 6** é mostrada uma estrutura típica de um fosfolipídio.

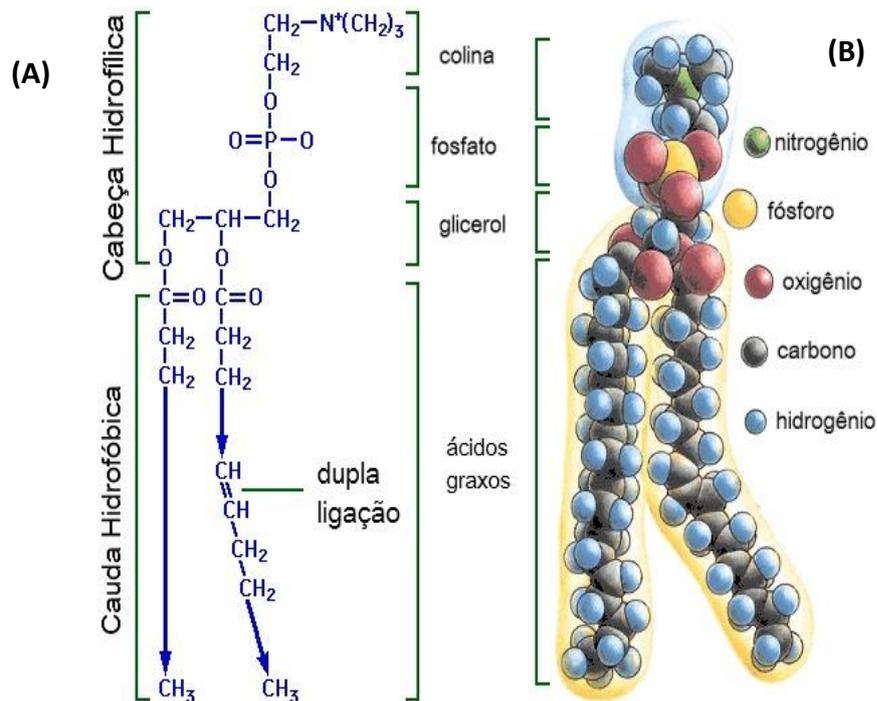


Figura 6. Estrutura de fosfolipídios, formado por uma cabeça hidrofílica (Colina, fosfato, glicerol) e uma cauda hidrofóbica (Ácidos Graxos). As letras apresentam: (A) Fórmula química, (B) Modelo espacial. Adaptado de TZANETOΠΟΥΛΟΣ (2014).

1.5 Membrana celular

Membranas biológicas são compostas por fosfolipídios e proteínas, mostrando propriedades físicas como permeabilidade e fluidez. Por sua vez, a tendência à agregação e à forma estrutural organizada deriva desde a arquitetura às características anfotéricas das moléculas fosfolipídicas (EIBL, 1984). Diferentes compostos de fosfolipídios têm sido observados em diferentes membranas biológicas com referência às suas bicamadas lipídicas internas e externas (EDIDIN, 2003). Na monocamada externa se encontra a fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline (SM) enquanto a monocamada interna contém fosfatidiletanolamina (PE), fosfoinositol (PI) (pequenas quantidades) e fosfatidilserina (PS) (YAZDANBAKHSH *et al.*, 2000; MCNAMARA *et al.*, 2010).

1.6 Lipossomas

Lipossoma é o termo usado geralmente para descrever estas estruturas esféricas fechadas com composição lipídica (BANGHAM *et al.*, 1965). A formação destes lipossomas é espontânea quando os fosfolipídios são expostos a um ambiente aquoso. Este efeito é ainda resolvido por várias forças intermoleculares, como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, bem como forças de Van der Waal e de dispersão (ISRAELACHVILI *et al.*, 1980). O resultado destas interações é a formação de um compartimento aquoso central circundado por uma ou mais camadas fosfolipídicas concêntricas (lamelas). Devido à sua natureza anfipática, as substâncias ou fármacos hidrofílicos estão na cavidade aquosa, os hidrofóbicos estão dentro da membrana lipídica e anfílicos podem ser incorporadas dentro dessas vesículas lipossomais (**Figura 7**) (LAOUINI *et al.*, 2012).

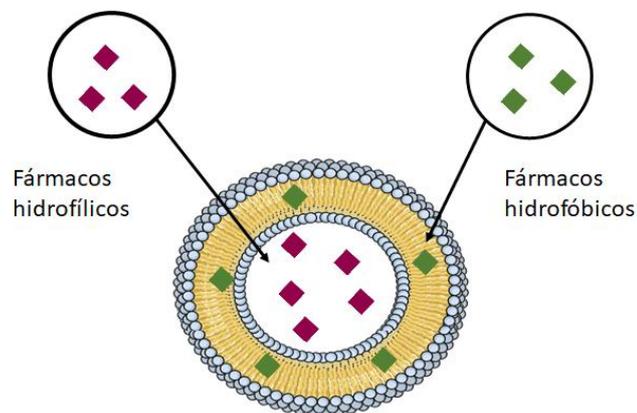


Figura 7. Modelos lipofílicos e hidrofílicos de encapsulamento de fármacos. Fármacos hidrofílicos podem ser incorporados interior do meio aquoso e fármacos hidrofóbicos na parte interna das caudas dos lipídios. Adaptado de LAOUINI *et al.*, (2012)

Os lipossomas são materiais relativamente biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogênicos, e são largamente utilizados como veículos farmacêuticos para moléculas lipofílicas e solúveis em água. Outras vantagens destas estruturas, que tornam seu uso promissor, resultam do seu potencial uso como vetores ativos de entrega de fármacos devido à sua capacidade de melhorar a ação farmacológica de fármaco por favorecer sua maior solubilidade, estabilidade, biodistribuição e, ainda, favorecendo sua liberação sustentada (LIAN E HO, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas compõe painel das doenças tropicais negligenciadas estabelecido pelo *Research and Training in Tropical Disease/ Drugs for Neglected Disease initiative (TDR/DNDi)*, uma vez que ela atinge principalmente populações de baixa renda. O tratamento é ineficiente e há pouco interesse de indústrias farmacêuticas em investir no desenvolvimento de novos fármacos ou novas formas farmacêuticas. Nesse sentido, pesquisas com foco na busca de moléculas ativas com potencial terapêutico são de grande relevância na atual conjuntura. O estudo prévio com N, N'-Squaramide 17 mostrou um significativo efeito tripanocida induzindo alterações metabólicas e estruturais em *Trypanosoma cruzi* (OLMO *et al.*, 2014), o que sugere seu uso potencial no desenvolvimento de novos fármacos.

Por meio da nanotecnologia é possível favorecer a atividade citotóxica de fármacos, graças às propriedades inerentes dos sistemas nanoestruturados que possibilitam: (1) circulação prolongada, (2) liberação sustentada do fármaco e (3) maior especificidade ao sítio alvo. Para isso, as nanoestruturas podem ser planejadas para se obter propriedades físico-químicas específicas tais como tamanho, carga superficial, caráter de hidrofobicidade/hidrofiliicidade e geometria e, assim, atingir as atividades biológicas desejadas e específicas ao objetivo do pesquisador. Atualmente há poucos estudos sobre o uso de nanotecnologia para tratamento de Chagas e as principais dificuldades na terapêutica desta doença deve-se ao fato do parasita se disseminar facilmente no organismo e evadirem facilmente ao sistema imune, infectando vários tipos celulares. Os lipossomas são nanosistemas de liberação de fármacos amplamente investigados. Em decorrência das características inerentes destes materiais, ressalta-se a possibilidade de formação de lipossomas a partir da bicamada lipídica de membranas celulares, tais como a de macrófagos. A vantagem deste tipo de membranas lipídicas miméticas (composto por proteínas e lipídios) é revelada por potencialmente desencadear baixa imunogenicidade, alta biocompatibilidade e especificidade celular.

Neste trabalho desenvolveu-se membranas lipídicas miméticas a partir de células de macrófagos (linhagem RAW 264.7) para liberação do agente tripanocida N, N'-Squaramide 17 a fim de se determinar sua citotoxicidade em células de mamíferos e em parasitas e também avaliar a potencial eficácia terapêutica deste sistema nanoestruturado para Doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver e caracterizar membranas lipídicas miméticas associadas a N, N'-Squaramide 17 bem como avaliar seu efeito potencial terapêutico para doença de Chagas.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver sistemas nanoestruturados: 1) membrana lipídica mimética vazia (MLV), 2) membrana lipídica mimética com N, N'-Squaramide 17 (MLS), e 3) N, N'-Squaramide 17 extrusado (SE) pelo método de extrusão a partir da linhagem de macrófago RAW 264.7 e o N, N'-Squaramide 17.
- Caracterizar algumas propriedades físico-químicas como diâmetro hidrodinâmico e carga elétrica dos produtos desenvolvidos (MLV, MLS, SE) por meio de espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta.
- Determinar o tamanho modal e formato geométrico de MLV, MLS e SE por microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar a estabilidade e o índice de polidispersividade dos sistemas nanoestruturados (MLV, MLS) sob diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH=4, 7, 9) durante dez dias.
- Determinar a interação molecular entre membranas lipídicas miméticas e N, N' - Squaramide 17 para identificar se houve encapsulação do S na nanoestrutura por meio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho.
- Avaliar a citotoxicidade dos sistemas nanoestruturados (MLV, MLS e SE) em cultura de células de mamíferos (macrófagos da linhagem RAW 267.4 e VERO) por meio do teste de viabilidade celular alamarBlue® (Resazurina).
- Avaliar o efeito citotóxico dos sistemas nanoestruturados em um grupo filogenético de *Trypanosoma cruzi* (CL-Brener) utilizando amastigotas e epimastigotas, tratados com os sistemas nanoestruturados.
- Determinar a porcentagem de taxa de infecção, número de amastigotas e tripomastigotas extracelular de *Trypanosoma cruzi* em cultura de células VERO durante oito dias tratados com os sistemas nanoestruturados.
- Determinar alterações morfológicas e estruturais em tripomastigotas e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL-Brener) após tratamento com MLS, MLV e SE por meio de microscopia eletrônica de varredura.

4 MATERIAIS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes

Tabela 1. Listagens de Reagentes

| REAGENTES | |
|--|--|
| Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich) | Soro fetal bovino (SFB) (Gibco) |
| Clorofórmio grau GC-MS (Charlau Industrias químicas) | Antibióticos (Penicilina e Estreptomicina) (Life Technologies Laboratories) |
| Tampão fosfato salina (PBS) (Sigma-Aldrich) | alamarBlue® “resazurina” sódio sal (Sigma-Aldrich) |
| Água deionizada | Dimetilsulfóxido (DMSO) |
| Hemina | Meio de cultivo RPMI 1640 (Gibco); |
| Acetato de uranila 5% (Polysciences Inc.) | Tripsina-EDTA (0,25%) (Life Technologies Laboratories) |
| Tela de cobre 200 Mesh coberta com formvar (Pelco) | Benzonidazol (BZ) “N-Benzyl-2-nitro-1H-imidazole-1-acetamide” (Sigma-Aldrich), |
| N, N'- Squaramide 17 (S) (ANEXO A). | Corante panótico (Lanorlcin) |

4.1.2 Materiais

Tabela 2. Listagens de materiais

| MATERIAIS | |
|--|--|
| Balão para rota evaporação | Membranas de policarbonato com poros de 100 nm |
| Crio tubos | Placas de 24 e 96 poços de fundo chato (Corning) |
| Câmara de Neubauer | Microtubos tipo eppendorf de 0,6, 1,5 e 2 mL |
| Garrafas de cultura 25, 75 e 500 cm ² (Corning) | Tubos tipos falcon de 15 e 50 mL. |
| Lamínula vidro | |

4.1.3 Equipamentos

Tabela 3. Listagens de Equipamentos

| EQUIPAMENTOS | Modelo |
|--|---|
| Analisador de tamanho de partículas e potencial Zeta de superfície | ZetaSizer modelo Nano ZS (Malvern) |
| Microscópio eletrônico de varredura | JSM-7001F (Jeol) |
| Microscópio eletrônico de transmissão | EM 109 (Zeiss) |
| Balança analítica | AUW 220D (Shimadzu) |
| Rotaevaporador | R210 (Buchi) |
| Conjunto de extrusão | 610023 (Avanti Polar Lipids) |
| Espectrofotômetro UV-Vis | Shimadzu |
| Microcentrífuga | MiniSpin (Eppendorf) |
| Leitor de microplaca | SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) |

4.1.4 Cultivo e manutenção de células e parasitos

A linhagem celular VERO ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África) (Obtido do laboratório de Patologia Molecular) e linhagem celular RAW 264.7 ATCC TIB 71 (macrófago murino peritoneais de linhagem celular) (Obtido do laboratório de Microscopia) foram mantidas em RPMI com vermelho de fenol e suplementados com 10% de soro bovino fetal a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂ umidificado (TEMPONE *et al.*, 2005).

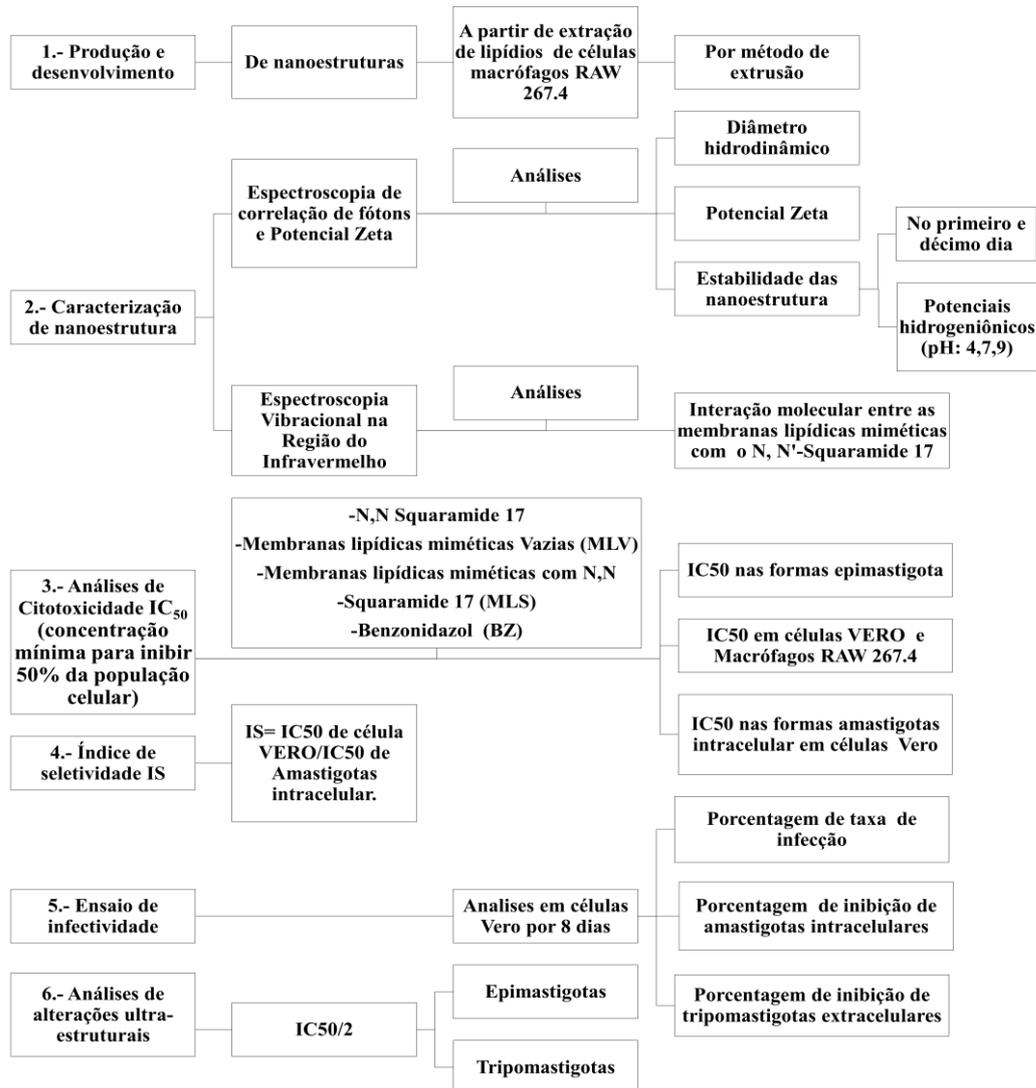
A linhagem do parasita CL-Brener (forma epimastigotas) (Obtido do laboratório de Patologia Molecular) foi mantida a 27 °C em meio de cultivo RPMI-1640 (Life Technologies Laboratories) contendo penicilina (5 units/mL) e estreptomicina (5 µg/mL) (Gibco-BRL), 10 ml de tampão Hepes (25 mM; Gibco), 0.03 M Hemina, 10 ml de L-glutamina (200 mM; Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementada com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco, Grand Island, NY, EUA (FERNÁNDEZ-PRESAS *et al.*, 2010).

5 METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Patologia Molecular e de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília sob supervisão da prof. Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro e Dra. Izabela Bastos e no Laboratório de Nanobiotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)-CENARGEN sob supervisão da Dra. Cinthia Bonatto e do Dr. Luciano Paulino da Silva.

O projeto foi desenvolvido em seis etapas experimentais sendo que nas duas primeiras foram realizadas a síntese e caracterização dos sistemas nanoestruturados e as seguintes etapas foram realizadas as análises de atividades biológicas dos sistemas nanoestruturados frente ao *Trypanosoma cruzi*.

Esquema 2. Etapas do projeto.



5.1 Obtenção de lipídios a partir de macrófagos da linhagem RAW 264.7

A linhagem celular de macrófago RAW 264.7 foi mantida em frascos de cultura até se obter uma quantidade de aproximadamente 1×10^8 células/mL. Logo, as células foram lavadas em uma solução isotônica contendo tampão fosfato salina (pH 7.4; 0.01 M). Depois, as células foram centrifugadas e colocadas em uma solução hipotônica de água deionizada para finalmente obter-se o *pellet* de células contendo fosfolipídios e colesterol naturais presentes nas membranas e foram armazenadas a 4 °C até o uso.

O processo de obtenção dos lipídios, foi baseado em metodologia previamente descrita no pedido de depósito de Patente Privilégio de Inovação no. BR1020150020694, intitulada “Processo de obtenção de moléculas bioativas em sistemas carreadores micro e nanoestruturados. 2015, Brasil” (**ANEXO B**).

5.2 Desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados por método de extrusão

Após a obtenção dos filmes de fosfolipídios adicionou-se cinco mililitros de água deionizada para produzir as composições investigadas neste estudo: 1) membranas lipídicas miméticas vazias (MLV), ou seja, membranas na ausência de fármacos (controle) e 2) membranas lipídicas miméticas contendo N, N'- Squaramide 17 (MLS), sendo o fármaco na dosagem de 0,032 M). As soluções produzidas foram submetidas à agitação em vórtex por 1 minuto e, em seguida, ao processo de extrusão que consiste em passar estas soluções através de membranas de policarbonato com poros de 100 nm em um extrusor. Este trata-se de uma estrutura cilíndrica dentro de um invólucro de metal que segura as membranas porosas com firmeza e, em cada lado da estrutura, uma seringa é conectada (**Figura 8**). Com isso, as soluções tornam-se esféricas com um diâmetro médio definido através dos poros da membrana. Em nosso ensaio, as soluções produzidas foram injetadas vinte vezes de uma seringa para a outra através da membrana porosa. Finalmente, para o sistema nanoestruturado de composto ativo N, N'- Squaramide 17 extrusado (SE), procedeu-se com a extrusão deste composto na dosagem de 0,032 M. **Na figura 8** está representado o conjunto de extrusão (Avanti Polar Lipids).



Figura 8. Conjunto de extrusão (Modificado de Avanti Polar Lipids)

Este conjunto está composto de um mini extrusora que contém, dois anéis em O e duas seringas herméticas a gás. Sua funcionalidade consiste em que os lipídios são carregados na seringa doadora e sempre terminando na seringa receptora para evitar a contaminação e é passado através do filtro vinte vezes. Nesta extrusão foi produzido três sistemas nanoestruturados: 1) Membranas lipídicas miméticas vazias (MLV), ou seja, membranas na ausência de fármacos (controle); 2) membranas lipídicas miméticas contendo N, N'- Squaramide 17 (MLS), sendo o fármaco na dosagem de 0,032 M) e, 3) O composto ativo N, N'- Squaramide 17 extrusado (SE) (na dosagem de 0,032 M).

5.3 Caracterização dos sistemas nanoestruturados

As análises para a determinação de ligações químicas, forma, tamanho, índice de polidispersidade e potencial zeta das nanoestruturas foram realizadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico e os resultados são descritos a seguir.

5.3.1 Análises dos sistemas nanoestruturados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR)

As análises do IR foram realizados no laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Universidade de Brasília, Campus Planaltina sob supervisão da professora Dra. Otília Eichler Vercillo. As membranas miméticas foram primeiramente liofilizadas utilizando-se de sacarose (350 mM) como crioprotetor a uma proporção de 1:1, 1 mL das nanoestruturas (MLV, MLS) e 1 mL de sacarose (KANNAN *et al.*, 2015), também foi analisado o N,N'- Squaramide 17. Os espectros vibracionais na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer modelo 400. A amostras foram maceradas e misturadas com brometo de potássio (KBr) em almofariz de ágata e depois introduzidas em pastilhas para realização de leitura, com resolução de 2 cm^{-1} , via análise de 32 scans.

5.3.2 Espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta para avaliação do diâmetro hidrodinâmico.

O diâmetro hidrodinâmico das estruturas formadas foi determinado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento Zetasizer Nano ZS utilizando laser He-Ne (4 mW) a 633 nm. Foram realizadas três medições sendo estas realizadas à temperatura ambiente sob pH 7,0 e sob detecção de dispersão de luz em um ângulo de 173°. O tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico), polidispersividade (PDI) bem como o potencial zeta de superfície das mesmas foram obtidos por meio do Zetasize software (Malvern Instruments 7.1).

5.3.3 Análises de tamanho por microscopia eletrônica de transmissão-MET.

As análises de MET (Jeol JEM-1011), foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. As amostras (MLS, MLV, SE) foram colocadas em grade (malha) a uma proporção de 1:1000 em água deionizada. Em seguida, as amostras foram contrastadas com Tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% por 7 minutos. Logo, foram adquiridas 10 imagens e mediu-se o diâmetro modal de 100 nanoestruturas através do programa *Image Pro Plus* e nanoestruturas foram avaliadas de acordo com a distribuição de classes.

5.3.4 Avaliação da estabilidade das nanoestruturas submetidas à diferentes potenciais hidrogeniônicos.

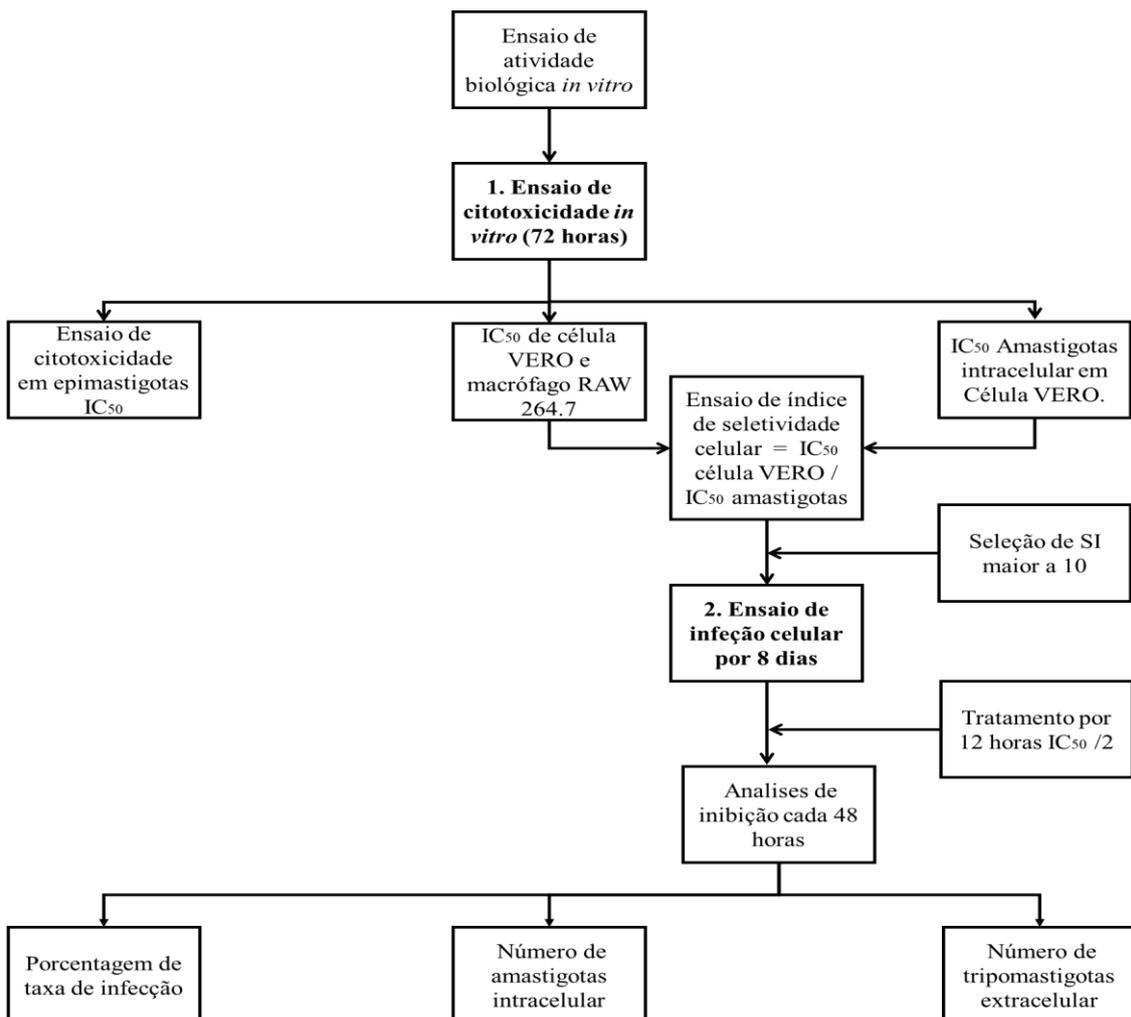
A estabilidade e o tamanho das nanoestruturas, sob diferentes pHs (4, 7 e 9) foi analisada por meio do método de dispersão de luz dinâmica. Para isso, as nanoestruturas foram colocadas em diferentes soluções de pH (pH = 4, 1M HCl em PBS; pH = 7, tampão fosfato; e pH = 9, 10 M NaOH em PBS). Todas as soluções foram filtradas utilizando um filtro millipore de 0,45 μm (ROY *et al.*, 2016).

5.4 Linhagem CL-Brener T.c. VI de *Trypanosoma cruzi*

Para realizar os ensaios de atividade biológica *in vitro*, foram utilizados tripomastigotas CL-Brener (T.c. VI) de *Trypanosoma cruzi* que foram obtidos a partir de uma cultura de epimastigotas em meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de SFB, mantida sob estas condições por três semanas para expansão celular. Em seguida, estes parasitas foram obtidos por centrifugação a 2400 g durante 10 minutos. Logo, o sedimento foi ressuspensionado em soro ativado (soro sem inativar por calor) e incubado por 12 horas sob 37 °C e, 5% de CO_2 . Os tripomastigotas obtidos foram utilizados para infectar células de mamífero (VERO) e a partir destes foram reusados em várias passagens de infecção, até usar em posteriores ensaios (CARDOSO E SOARES, 2010).

5.5 Ensaios de atividade biológicas *in vitro*

Os ensaios de atividade biológica foram realizados em duas etapas sendo a 1ª Os valores de citotoxicidade (IC_{50}) de Benzonidazol (BZ), S, MLV, MLS e SE em epimastigotas, amastigotas intracelulares, células de macrófago RAW 264.7 e células VERO em 72 h de tratamento. A partir destes resultados determinou-se os índices de seletividade celular $SI = (IC_{50} \text{ citotoxicidade celular}) / (IC_{50} \text{ citotoxicidade de amastigotas intracelulares})$. Na segunda etapa, realizou-se o ensaio de infecção celular e foram utilizadas as dosagens em que se obteve SI maiores que 10, e as células foram tratadas com a metade da citotoxicidade ($IC_{50}/2$) obtidos do IC_{50} da célula VERO durante 12 horas. Após, removeu-se o meio de cultura RPMI substituindo-o por meio fresco e a cada 48 h foi quantificada a inibição parasitária (porcentagem de taxa de infecção, número de amastigotas intracelular e número de tripomastigotas extracelular) em células VERO por um período total de oito dias. No **esquema 3**, é apresentado um resumo dos dois processos do ensaio biológicos.



Esquema 3. Ensaio de avaliação das atividades biológicas

5.5.1 Ensaio de citotoxicidade

Os diferentes tratamentos para os ensaios de toxicidade em epimastigotas, amastigotas intracelular e citotoxicidade celular tanto em células VERO, como macrófago RAW264.7, tiveram as seguintes condições:

O fármaco de referência benzonidazol (BZ) foi dissolvido em DMSO a uma concentração de 5% (controle positivo) e esta solução foi utilizada como estoque. Em nossos ensaios, a concentração final de DMSO nos experimentos nunca excedeu 0,25% (Volume/Volume), para não afetar a viabilidade dos parasitas e das células (AZEREDO *et al.*, 2014). Os sistemas nanoestruturados (MLV, MLS e ES) e o S foram dissolvidos em água deionizada. Em nossos ensaios, a concentração final destes tratamentos nos experimentos nunca excedeu 0,01% (Volume/Volume).

A porcentagem de viabilidade celular (teste com resazurina), foi realizado de acordo com a equação abaixo, onde A é a fluorescência dos tratamentos, B é a fluorescência do branco (médio de cultura com alamarBlue®) e C é a fluorescência do grupo controle.

$$\%Viabilidade = [(A - B) / (C - B)] \times 100$$

Para determinação do IC₅₀ (concentração máxima para inibir 50% da população celular) foram calculados plotando a concentração de fármaco versus as porcentagens de viabilidade celular tanto para epimastigota, amastigotas intracelular e citotoxicidade celular. Os resultados foram analisados usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

5.5.1.1 Ensaio de citotoxicidade em epimastigotas

Os tratamentos com BZ, S, MLV, MLS e SE foram realizados utilizando diluição seriada nas dosagens de 100 a 6,25 µM (OLMO *et al.*, 2014) e foram preparadas em uma placa de 96 poços. Em seguida 2,5 × 10⁵ células mL⁻¹ foram ressuspensas em 150 µL e adicionados às placas. Após 48 horas, foi realizada a análise de viabilidade celular utilizando o reagente com alamarBlue® (resazurina) (foram adicionados 20 microlitros por poço de resazurina - 3 mM-, totalizando em cada poço um volume final de 220 microlitros. As células foram incubadas por 24 horas e, em seguida, foi feita a leitura da fluorescência em um leitor de placas Spectreman (excitação 570 nm / emissão 595 nm) (ROLÓN *et al.*, 2006).

5.5.1.2 Ensaios de citotoxicidade em células VERO e macrófago RAW 264.7

A linhagem celular VERO e macrófago RAW 264.7 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10 % SFB a uma densidade de 1×10^4 células/poços em microplacas de 96 poços durante 48 horas. Após este período os tratamentos com BZ, S, MLV, MLS e SE foi realizada uma diluição seriada nas dosagens de 800 a 6,25 μM (modificado de OLMO *et al.*, 2014) e sob um período de 72 horas. Após 72 horas, foi realizada a análises de viabilidade celular utilizando o reagente com alamarBlue® (resazurina) (foram adicionados 20 microlitros por poço de resazurina – 0,39 mM-, totalizando em cada poço um volume final de 220 microlitros. As células foram incubadas por 2 horas e, em seguida, foi feita a leitura da fluorescência em um leitor de placas Spectramax (excitação 570 nm / emissão 595 nm) (PACE E BURG, 2015).

5.5.1.3 Ensaios de citotoxicidade em amastigotas intracelulares em célula VERO

A linhagem celular VERO foi cultivada em meio RPMI contendo 10 % SFB e semeadas a uma densidade de 1×10^4 células/poços em microplacas de 24 poços e foram cultivadas durante 48 h. Depois, as células foram infectadas com tripomastigotas do parasita *T. cruzi* (linhagem CL-Brener) em uma proporção de 10:1, respectivamente durante 24 h. Após este período, os parasitas presentes no meio de cultura foram eliminados mediante remoção do meio seguido de lavagem com PBS. Em seguida, os tratamentos com BZ, S, MLV, MLS e SE foram adicionadas ao meio de cultura das células realizando com uma diluição seriada nas dosagens de 100 a 6,25 μM (OLMO *et al.*, 2014) durante 72 horas. A avaliação do potencial terapêutico dos tratamentos foi feita analisando-se a porcentagem de inibição de parasitas após o tratamento e foi associada com a concentração inibitória de 50% da cultura celular (IC_{50}). As amastigotas no interior das células foram fixadas e coradas com kit Panótico contendo três soluções (triarilmetano 0,1%; xantenos 0,1% e tiazinas 0,1%) conde foram utilizados um volume de 0,5 mL incubando as células por 15 segundo. As células foram lavadas com água deionizada a cada processo. Logo, o número de amastigotas foi determinado mediante a análise de 200 células para cada grupo experimental distribuídas em campos microscópicos e analisados aleatoriamente.

5.5.2 Avaliação do índice de seletividade celular

Após análise dos dados de citotoxicidade celular dos tratamentos em VERO e em amastigotas intracelulares, determinou-se os índices de seletividades (SI) em que se aplicou a seguinte fórmula: $SI = IC_{50} \text{ referente a citotoxicidade nas células} / IC_{50} \text{ citotoxicidade em amastigotas intracelulares}$. De acordo com Olmo *et al.*, (2014) considera-se um fármaco seletivo quando este apresenta um índice de seletividade maior ou igual a 10. Assim, pôde-se escolher os índices de seletividades que resultaram em maior potencialidade terapêutica. Com isso, foram realizados os ensaios de infecção de *T. cruzi* em células VERO cujo objetivo foi determinar a eficácia tripanocida dos tratamentos durante um período de oito dias (GONZÁLEZ *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2011; MARÍN *et al.*, 2013; OLMO *et al.*, 2013; OLMO *et al.*, 2014; MARÍN *et al.*, 2016a).

5.5.3 Ensaios de infecção de *T. cruzi* em células VERO

As células foram cultivadas sob as mesmas condições acima mencionadas durante 48 h. Depois, as células foram infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, numa proporção de 10:1 respectivamente. Os tratamentos com BZ, S, MLS foram realizados utilizando a doses da metade da citotoxicidade ($IC_{50}/2$) obtidos da metade do IC_{50} da célula VERO (**Item 5.5.1.2**) e as células foram incubadas durante 12 horas a 37°C em 5% CO₂. Os parasitas não fagocitados (parasitas que não conseguiram entrar nas células) e foram removidos por remoção do meio e lavagem em PBS e as culturas infectadas foram mantidas sob crescimento durante oito dias sendo que o meio de cultivo era substituído a cada 48 horas.

A atividade tripanocida dos tratamentos foi determinada de acordo com os seguintes critérios: 1) a porcentagem de taxa de células infectadas; 2) o número de formas amastigotas por célula infectada e 3) número de tripomastigotas contidos no meio, em culturas tratadas e não tratadas (Olmo *et al.*, 2014).

As células foram coradas com panótico conforme **item 5.5.1.3**. A porcentagem de células infectadas e o número médio de amastigotas por célula infectada foram determinados por meio de análises em 200 e 100 células, respectivamente, distribuídas nos campos microscópicos analisados aleatoriamente a cada 48 h. O número de tripomastigotas no meio foi determinado usando microscópio óptico e avaliando as células em uma câmera de Neubauer.

Para se obter a percentagem de inibição parasitária foi selecionado o último dia de análise (oitavo dia) e utilizou-se o grupo controle (células na ausência de intervenção terapêutica).

5.6 Alterações ultraestruturais em epimastigotas e tripomastigotas

As epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas a uma densidade de 5×10^5 células/mL em meio de cultura RPMI contendo os compostos testados nas suas concentrações de $IC_{50}/2$, este foi tomado a partir do IC_{50} de epimastigotas (**Item 5.5.1.1**). Após 72h essas culturas foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e os *pellets* produzidos foram lavados em PBS e fixados por uma hora à temperatura ambiente com solução fixadora contendo 2% de formaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M e aderidas em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina (Sigma). Após a aderência, foi realizada a pós-fixação utilizando com uma solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Em seguida, os parasitas foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, e 100%), submetidos à secagem em ponto crítico, metalizados com ouro e observados em microscópio eletrônica de varredura (Jeol JSM-7000F). Foram coletadas cinco imagens das amostras visualizadas empregando uma voltagem de feixe de 15 kV.

Para realização deste ensaio os tripomastigotas, foram cultivadas a uma densidade de 4×10^5 células/ mL em meio RPMI (2% SFB) contendo as composições testadas nas suas concentrações de $IC_{50}/2$ (**Item 5.5.1.2**). Após 12 h, essas culturas foram submetidas para à análise em microscopia eletrônica de varredura utilizando com a mesma metodologia empregada para epimastigotas e acima mencionadas.

5.7 Análises estatísticas

Todos os resultados, quantitativos, foram avaliados quanto ao tipo de distribuição de dados por meio do teste de normalidade de Shapiro Wilk. Logo, a homogeneidade de variâncias foi analisada por meio do teste de Levene. Os valores de significância de p encontrados nos métodos de Shapiro Wilk e no de Levene foi de $p > 0,05$. Estes resultados nortearam nossa escolha para os posteriores testes (paramétrico ou não paramétrico).

Os resultados obtidos foram expressos como média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes e para realização das análises estatísticas relativas ao índice de toxicidade e infecção foi realizada Análise de Variância (ANOVA) *one way ou two way*, respectivamente, seguida pelo método pós-teste Dunnett's (bicaudal) comparando-se os tratamentos BZ, S, SE e MLV com MLS, Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção de lipídios e desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados

Os lipídios foram obtidos a partir da linhagem de macrófago RAW 264.7 e a formação de membranas lipídicas miméticas foram obtidas com sucesso. A metodologia de extração foi feita de acordo com BLIGH E DYER (1959) realizando-se algumas modificações (**Anexo B**). Este método favorece a separação de lipídios (moléculas hidrofóbicas) a partir de matrizes celulares e esta técnica é baseada em uma mistura entre solventes a água, metanol, clorofórmio e os lipídios. Subsequentemente, os solventes polares e não polares não são mais miscíveis e, assim, obtivemos duas fases visto que os lipídios se separam de acordo com sua polaridade. Assim, por meio deste tipo de extração, especificamente no solvente do clorofórmio foram obtidos diferentes tipos de lipídios. Um estudo realizado por ANDREYEV *et al.*, (2010) demonstrou que os principais fosfolipídios que se encontram na matriz da membrana celular de macrófago RAW 264.7 são glicerofosfolipídios, lipídios do prenol como precursores de vitamina E e K, esfingolipídios e lipídios de esterol.

As membranas lipídicas miméticas vazias (MLV) (**Figura 10. B**), foram obtidos por meio de processo de extrusão. Sabe-se que estes fosfolipídios podem sofrer alterações químicas e físicas após adição de água no meio. Estas alterações pode ser causado pelas agregações moleculares espontâneas (EIBL, 1984). Portanto, as folhas de bicamada de fosfolipídios foram orientadas de tal maneira que a porção polar da molécula permanece em contato com o ambiente polar e ao mesmo tempo protege a parte não polar (NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Também realizamos o processo de extrusão do composto ativo N, N'- Squaramide 17 (ES). Sabe-se que este fármaco apresenta grupos amins terciários separados das unidades de Squaramide por um segmento de cadeia alifática de dois a três metilenos. Este arranjo é particularmente adequado para induzir transições conformacionais dos Squaramide de formas estendidas (Z, Z) para (Z, E), que são significativamente favorecidas pela ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo amina e o grupo N-H de N,N'- Squaramide 17 (**ANEXO E**) (OLMO *et al.*, 2014).

Nosso trabalho mostrou formação de nanocristais (**Figura 10. C**). Sabe-se que a formação de nanocristais de fármacos pode decorrer de vários fatores relacionados ao processo de extrusão como a termodinâmica (solubilidade, tensão interfacial sólido-líquido, solubilidade, temperatura etc.), cinética (supersaturação, mobilidade molecular, largura de zona metaestável) e reconhecimento molecular (ligações de hidrogênio, ligações não covalentes, redes moleculares) (SHEKUNOV E YORK, 2000; JUNGHANNS E MÜLLER, 2008; MAHANTY *et al.*, 2010; KOVAČIČ *et al.*, 2012). Estes fatores facilitam o processo de *Bottom-up* que significa que estes nanocristais foram formados a partir de moléculas livre de N, N' Squaramide 17.

A encapsulação de N,N'- Squaramide 17 foi realizada por meio do método de carga passiva que consiste na encapsulação do fármaco durante o processo de formação dos lipossomas (método de extrusão) (PANDEY *et al.*, 2016). O N, N'- Squaramide 17 é uma molécula altamente hidrofílica devido a sua massa molecular baixa (267,4 Da) e apresenta apenas um doador de ligação de hidrogênio (OLMO *et al.*, 2014). TYAGI E GHOSH (2011) demonstraram que os fármacos hidrofílicos podem ser encapsulados dentro do núcleo interno dos lipossomas. Ademais, um prévio estudo realizado por TOMÀS *et al.*, (1999) mostrou, com êxito, a encapsulação de um derivado do ácido esquárico em lipossoma. Por outro lado, segundo os resultados obtidos na espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR), nós mostramos que o N, N'- Squaramide 17 foi associado às membranas miméticas lipídicas (**Figura 10. A**). Por outro lado, é provável que a encapsulação do S, foi primeiramente formado os nanocristais e logo a encapsulação nas membranas lipídicas miméticas por agregação.

6.2 Caracterização dos sistemas nanoestruturados

6.2.1 Análises dos sistemas nanoestruturados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR)

Para verificar se o S foi associadas as membranas miméticas lipídicas, os espectros de IR foram empregados, na **Figura 9** são mostrados os espectros de IR da MLV, MLS e S.

No espectro de S (**Figura 9. A**) foram mostrados picos de absorção entre 1674 cm^{-1} e 1789 cm^{-1} , que são referentes às vibrações de alongamento de C=O (carbonilas) e outras bandas em 1620 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} que são relacionadas às ligações de C=C e N-H (TONG *et al.*, 2018).

Os picos característicos das membranas lipídicas vazias (**Figura 9. B**), estão presentes em 3392 cm^{-1} que são vibrações de R-NH₃ e 1052 cm^{-1} de NH₃⁺, as vibrações de PO⁻² estão na região 995 cm^{-1} e os POO⁻² estão na região 1136 cm^{-1} (NZAI E PROCTOR, 1998; BRIDELLI *et al.*, 2013; JULIETA *et al.*, 2013).

Quando S foi associado à bicamada lipídica (**Figura 9. C**) encontramos a presença das bandas em 1788 cm^{-1} e 1674 cm^{-1} que são correspondentes às carbonilas contidas em S. Também observamos a presença do pico 2954 cm^{-1} , referente às bandas de estiramento da ligação C-H dos grupos CH₂ do fármaco. Outras bandas que também evidenciam a incorporação do fármaco às membranas miméticas lipídicas são as bandas em 1620 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} que comprovam a presença da ligação C=C e N-H do S. Assim, concluímos, por meio da análise de IR (**Figura 9**) que o S foi encapsulado com às membranas lipídicas miméticas, o que foi consistente com os resultados obtidos por meio de MET (**Figura 10. A**).

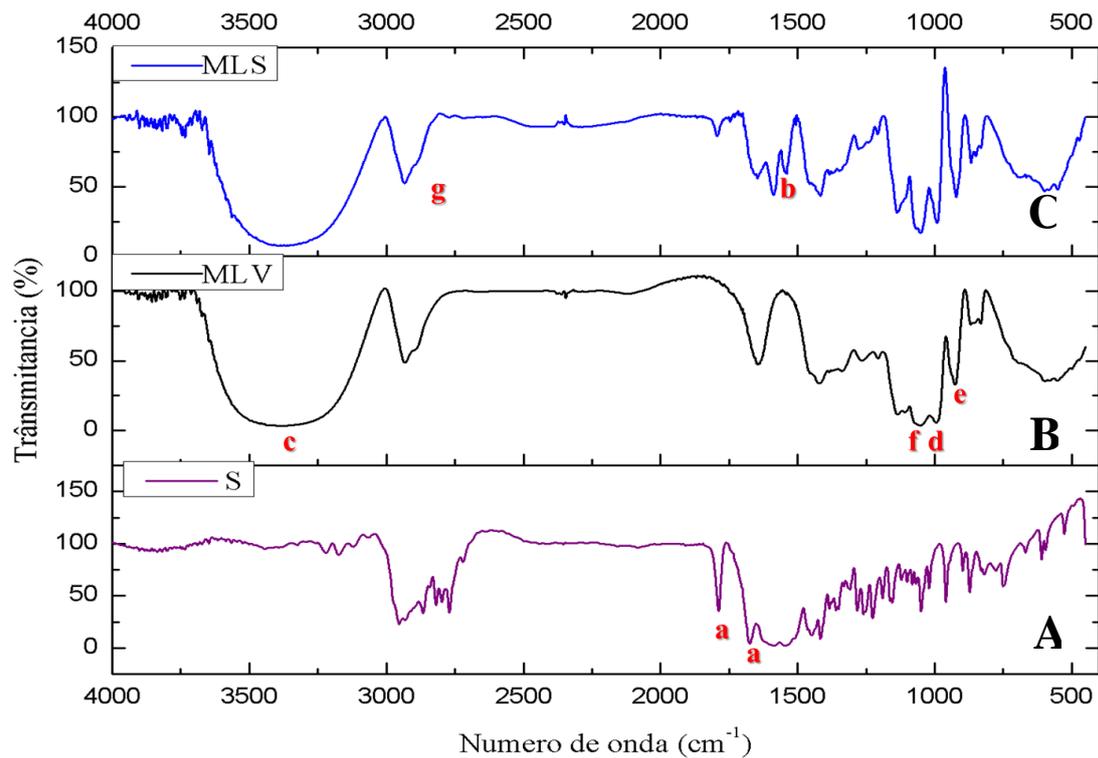


Figura 9. Espectro de absorção na região do infravermelho dos sistemas nanoestruturados e fármaco livre analisados por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR). As letras maiúsculas representam os compostos em estudos: A.- N, N'- Squaramide 17 (S), B.- Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV) e C.- Miméticas com N, N'- Squaramide 17 (MLS). As letras minúsculas mostram picos de absorção do IR: a.- 1674 cm^{-1} e 1789 cm^{-1} C=O; b.- 1542 cm^{-1} de C=C; c.- 3392 cm^{-1} de R-NH₃; d.- 1052 cm^{-1} de NH₃⁺; e.- 995 cm^{-1} de PO⁻²; f.- 1136 cm^{-1} de POO⁻²; g.- 2954 cm^{-1} de C-H

6.2.2 Espectroscopia de correlação de fótons e potencial Zeta para avaliação do diâmetro hidrodinâmico.

O tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersividade (Pdl), bem como o potencial Zeta de superfície das amostras foram obtidos por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento Zetasizer Nano ZS (**Tabela 4**).

O potencial zeta é um parâmetro importante usado para prever a estabilidade física das nanoestruturas. Um alto valor de potencial zeta indica estabilidade aumentada do sistema, uma vez que poderia fornecer uma força repelente entre as nanopartículas (HUNTER, 2013). Ademais, o Pdl é usado para representar a distribuição de nanopartículas e indica uma baixa agregação de partículas quando seu valor é $<0,5$ (YUSUF *et al.*, 2012).

A MLS e a MLV mostraram tamanhos inferiores a 200 nm, e um Pdl menor que 0,5. Em contraste, o SE apresentou tamanhos maiores que 700 nm e um Pdl maior que 0,5. O potencial Zeta da MLV e SE foram menores que -60 mV, enquanto, que o da MLS que foi de -61,43 ($\pm 2,30$) mV.

Em geral, observou-se que a MLS apresentou uma boa estabilidade física e que suas partículas estão mais dispersas (**Figura 10. A**). Por outro lado, notou-se que a MLV mostrou uma aglomeração de partículas devido a seu baixo potencial zeta (**Figura 10. B**) (KIRBY E HASSELBRINK JR, 2004).

Ainda, o SE apresentou agregação de partículas (**Figura 10. C**) tendo um diâmetro hidrodinâmico (dH) de 713,9 ($\pm 112,6$) nm e um Pdl de 0,601 ($\pm 0,079$). Estes agregados ocorrem quando as forças atrativas de Van der Waal entre partículas são maiores do que as forças repulsivas eletrostáticas (HUNTER, 2013).

Tabela 4 Propriedades físicas-químicas das diferentes nanoestruturas e N, N'- Squaramide 17 extrusado (SE).

| Nanoestrutura e fármacos | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | Índice de polidispersividade | Potencial Zeta (mV) |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------|
| MLS | 196,2 \pm 11,0 | 0,418 \pm 0,086 | -61,43 \pm 2,30 |
| MLV | 203,1 \pm 8,5 | 0,428 \pm 0,092 | -12,93 \pm 1,21 |
| SE | 713,9 \pm 112,6 | 0,601 \pm 0,079 | -45,33 \pm 7,45 |

Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de polidispersividade e Potencial Zeta foi medido por DLS, os resultados são referentes às médias de três experimentos independentes (média \pm desvio padrão). N, N'- Squaramide 17 (S), Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV), Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'- Squaramide 17 (MLS) e N, N'- Squaramide 17 Extrusado (SE).

6.2.3 Análises de tamanho por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho das nanoestruturas foram analisados por meio de MET (**Figura 10**). As membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV) apresentaram forma irregular (**Figura 10. B**) e um diâmetro modal (Dm) de 217,04 ($\pm 179,77$) nm (**Figura 11. B**). Já as membranas lipídicas miméticas com N, N'- Squaramide 17 (MLS) apresentaram partículas circulares e tamanho heterogêneo (**Figura 10. A**) e o Dm destas partículas foi de 191,19 ($\pm 59,82$) nm (**Figura 11. A**). Ademais, foi observado que N, N'- Squaramide 17 Extrusado (SE) apresentou um nanocristais (**Figura 10. C**) com um Dm de 150,85 ($\pm 110,60$) nm (**Figura 11. C**).

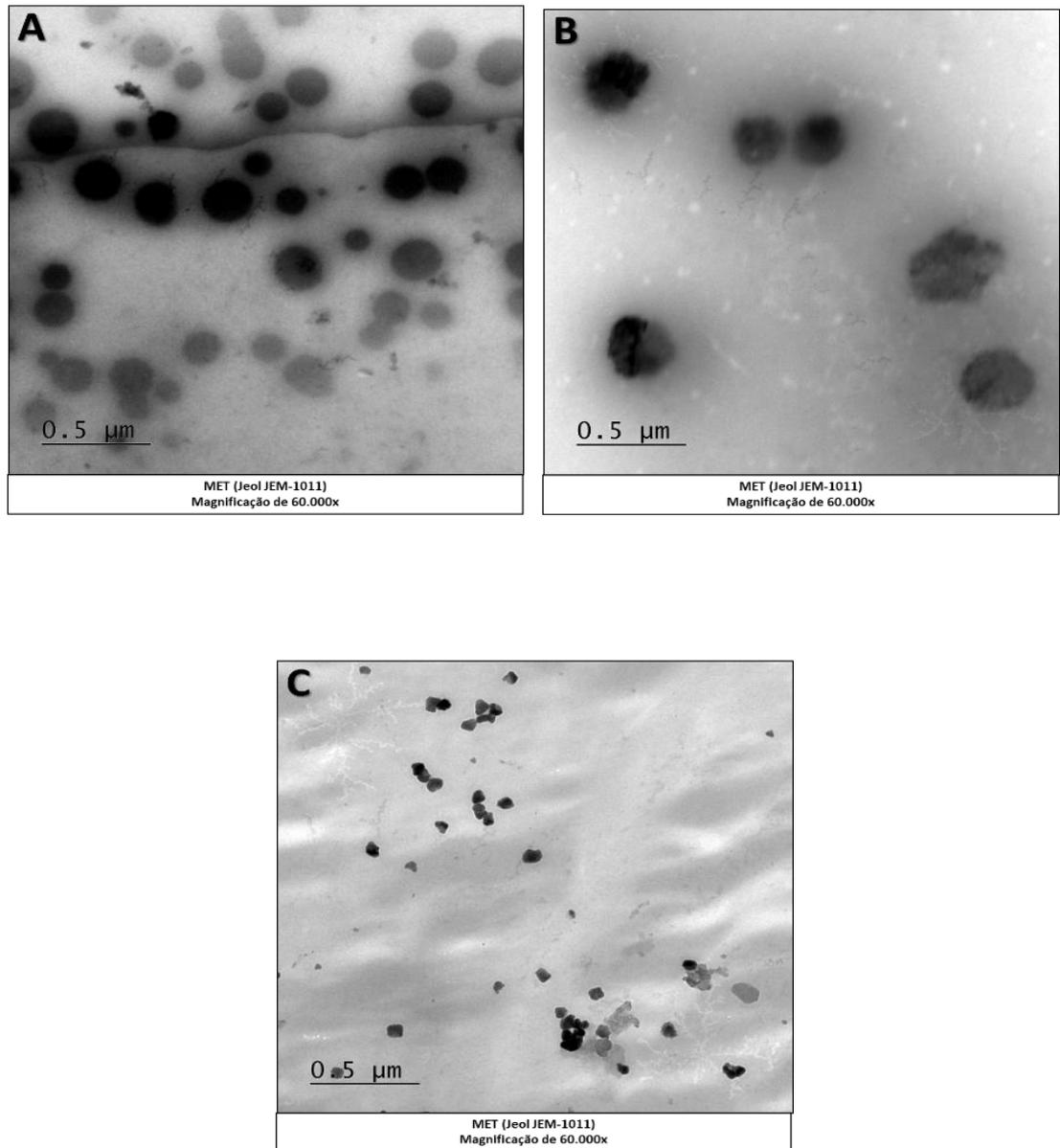


Figura 10. Características morfológicas das nanoestruturas analisados por microscopias eletrônicas de transmissão (MET). (A) Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'-Squaramide 17 (MLS), (B) Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV) e (C) N, N'-Squaramide 17 Extrusado (SE).

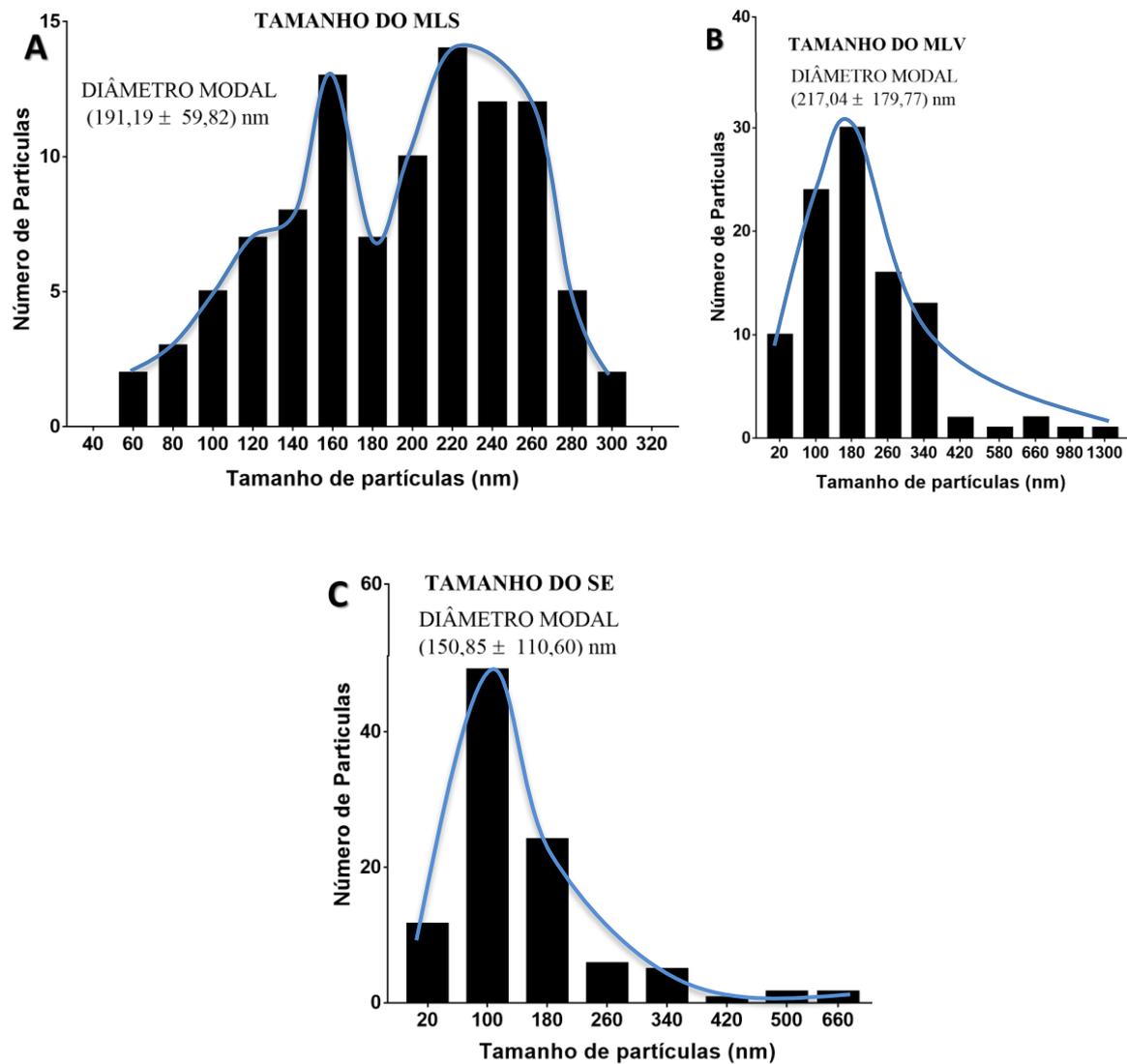


Figura 11. Histogramas de distribuição de classes (N=100 partículas) referentes aos valores de tamanho de partículas avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). (A) Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'- Squaramide 17 (MLS), (B) Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV) e (C) N, N'- Squaramide 17 Extrusado (SE).

6.2.4 Avaliação da estabilidade das nanoestruturas submetidas a diferentes potenciais hidrogeniônicos

O dH e o Pdl das nanoestruturas foram determinados no primeiro e no décimo dia por meio do método de DLS (**Tabela 5**). Todos os experimentos foram avaliados em diferentes pHs (pH 4, 7 e 9) e sob a temperatura de 4 °C.

Foi observado que houve agregação de partículas quando se analisou a MLV após 10 dias de armazenamento 360,0 (\pm 87,2 nm). Estudos preliminares demonstraram que pequenas vesículas podem interagir entre eles e formar lipossomas maiores, mostrando agregados ou maior força de atração com tamanhos maiores que 200 nm (LOPES *et al.*, 1999). Sob o pH 7 e 9 não se observou mudanças significativas no dH destes sistemas nanoestruturado no primeiro dia. Contudo, no décimo dia notou-se que o dH foi superior a 300 nm. Em contraste, sob o pH 4 observou-se redução no dH (145 nm). Esta variação de dH poderia ser atribuída pela ionização-dissociação de grupos superficiais da nanoestrutura, o que reduziu a repulsão de cargas facilitando sua diminuição de tamanho (ROY *et al.*, 2016).

Com relação ao dH da MLS notou-se uma redução de 196,2 (\pm 11) nm para 126,5 (\pm 0,7) nm após 10 dias de armazenamento. Este resultado está de acordo com VIDEIRA *et al.*, (2013) em que foi demonstrado que a desestabilização ou diminuição de tamanho de um lipossoma está relacionada com a liberação do fármaco encapsulado. Dessa forma, de acordo com a **Figura 12** em que é demonstrada a distribuição de partículas analisadas por DLS, notou-se que no primeiro dia (**Figura 12. A**) a MLS apresentou uma distribuição monomodal comparado ao décimo dia em que se observou uma distribuição bimodal (**Figura 12. B**). Esta observação poderia ser resultado da liberação do princípio ativo, sendo tamanhos maiores a 1990 nm.

O dH da MLS, analisado sob diferentes pHs, mostrou uma redução de tamanho sendo 196,2 nm no primeiro e 126,5 nm no décimo dia. Por exemplo, em pH alcalino a MLS apresentou valores entre 108,2 (\pm 1,8) a 108,8 (\pm 2,3) ao passo que em pH neutro variou de 105,5 (\pm 0,9) e 106,8 (\pm 0,3) e sob pH ácido os valores foram de 103,9 (\pm 1,4) a 108,8 (\pm 2,3) entre o primeiro e décimo dia, respectivamente. Ademais, foi notado que para todas as soluções aquosas não variaram os Pdl que ficaram entre valores de 0,207 e 0,251. Portanto, esta redução poderia ser atribuída pela dominância de forças de repulsão entre os fosfolipídios (GARIDEL *et al.*, 1997). Valores de pH menores que 6.5 favorecem o processo hidrolítico dos lipossomas (ROY *et al.*, 2016).

MLS apresentou valores de dH entre 103 nm (1^o dia) e 108 nm (10^o dia) sob diferentes pHs. Estes valores poderiam ser atribuídos entre a interação do S com o colesterol presentes nas membranas lipídicas. Sabe-se que os lipossomas que contém colesterol na sua estrutura mantêm alta estabilidade em diferentes soluções aquosas tanto para ácido como alcalino. Desta forma, este lipídio pode manter-se em equilíbrio após os processos de hidrólises e agregações (RAMANA *et al.*, 2010; YANDRAPATI, 2012). Por outro lado, o principal objetivo das análises de estabilidade tem em vista sua potencial aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 2011). Por exemplo na farmacêutica amostras de MLS, no processo de manufatura, poderiam ser colocadas em diferentes soluções aquosas que hipoteticamente seriam estáveis.

Tabela 5. Variação no diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade das diferentes nanoestruturas avaliadas após um e dez dias da sua produção sob diferentes pHs.

| | Dia 1 | | Dia 10 | |
|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | Índice de polidispersividade | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | Índice de polidispersividade |
| MLS (Solvente água, pH 7) | 196,2 ± 11,0 | 0,418 ± 0,086 | 126,5 ± 0,7 | 0,292 ± 0,029 |
| MLV (Solvente água, pH 7) | 203,1 ± 8,5 | 0,428 ± 0,092 | 360,0 ± 87,2 | 0,424 ± 0,091 |
| MLS pH 9.5 | 108,2 ± 1,8 | 0,251 ± 0,032 | 108,8 ± 2,3 | 0,245 ± 0,009 |
| MLS pH 7.4 | 105,5 ± 0,9 | 0,226 ± 0,008 | 106,8 ± 0,3 | 0,220 ± 0,009 |
| MLS pH 4.1 | 104,3 ± 0,6 | 0,203 ± 0,021 | 103,9 ± 1,4 | 0,207 ± 0,018 |
| MLV pH 9.5 | 261,6 ± 106,5 | 0,461 ± 0,091 | 307,9 ± 116,6 | 0,416 ± 0,099 |
| MLV pH 7.4 | 293,8 ± 98,7 | 0,521 ± 0,221 | 983,8 ± 621,1 | 0,765 ± 0,237 |
| MLV pH 4.1 | 195,0 ± 11,9 | 0,452 ± 0,070 | 145,9 ± 26,7 | 0,384 ± 0,154 |

Os dados são referentes à médias de três experimentos separados (média ± desvio padrão) medidos por DLS. Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV), Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'- Squaramide 17 (MLS) e N, N'- Squaramide 17 Extrusado (SE).

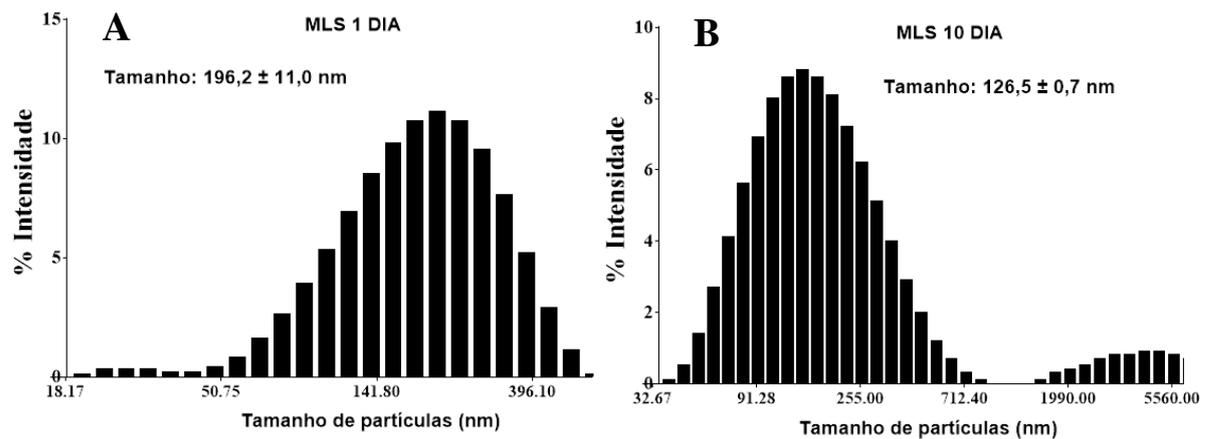


Figura 12. Distribuição da MLS medido por espalhamento de luz dinâmico (DLS). A) Distribuição monomodal da MLS no primeiro dia e B) Distribuição bimodal no décimo dia. No solvente água pH de 7.0 realizada durante a sínteses.

6.3 Ensaio de atividades biológicas *in vitro*

6.3.1 Citotoxicidade de Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV)

Antes de iniciar os estudos sobre atividade biológica das composições, aqui desenvolvidas, foi feito um ensaio em que se analisou a citotoxicidade da MLV a fim de verificar se estas membranas poderiam ser consideradas bons “veículos” farmacêuticos e, assim, validar nosso modelo de nanoestrutura. Bom, para isso, a citotoxicidade da MLV foi analisada em células VERO e em macrófagos RAW 264.7 empregando doses de 50 a 800 μ M e avaliadas após 72 horas de tratamento (**Figura 13**). Não se observou efeito citotóxicos da MLV nas células analisadas, o que nos mostra que está composição MLV tem excelente potencialidade para utilização como sistema de entrega de fármacos diversos.

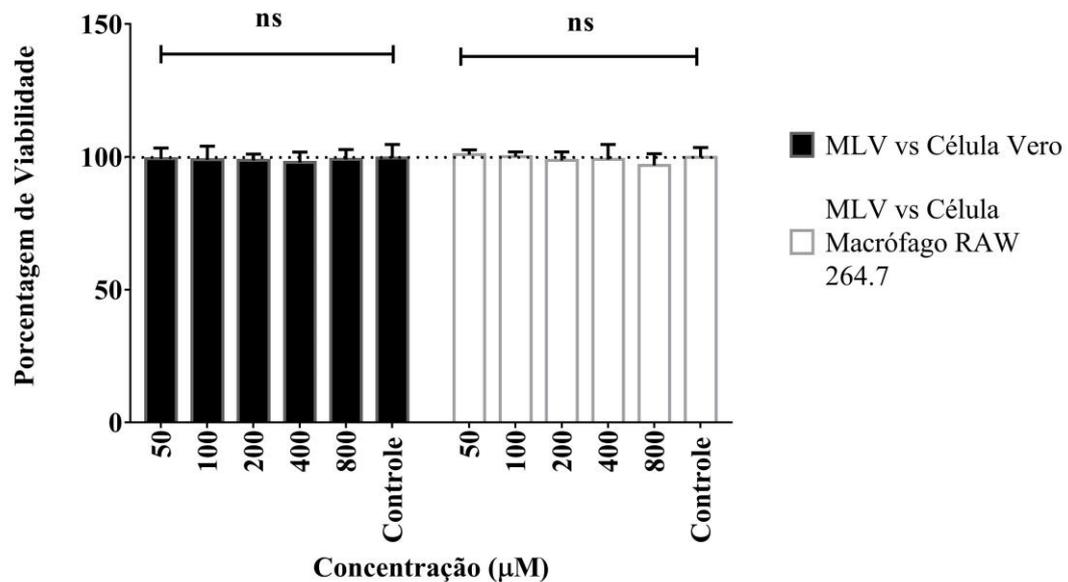


Figura 13. Porcentagem de Viabilidade celular em célula VERO e Macrófago RAW 264.7 tratadas com MLV durante 72 horas. Foi empregado o ensaio de viabilidade celular de alamarBlue® (Resazurina). ■ células VERO e □ célula de macrófago RAW 264.7. Os resultados são expressos como média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentemente e analisados por meio de ANOVA Two way (ns: não significância estatística).

6.3.2 Ensaio de citotoxicidade.

A avaliação do efeito de Benzonidazol (BZ), N, N'-Squaramide 17 (S), Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV), Membranas Lipídicas Miméticas e N, N'- Squaramide-17 (MLS), N, N'- Squaramide 17 extrusado (SE) foi realizada empregando-se o teste fluorimétrico de alamarBlue® (Resazurina). A atividade tripanocidas destes tratamentos foi avaliada nas formas epimastigotas e amastigotas de CL-Brener (*T.c. VI*) e ainda foi avaliada a possível citotoxicidade não-específica em células VERO e macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os índices de seletividade (SI), calculados neste ensaio, são apresentados na **Tabela 6**.

A maioria dos estudos sobre a atividade *in vitro* de novos compostos contra o *T. cruzi* são realizados em formas epimastigotas, razão pela qual, é muito mais fácil trabalhar com estas formas *in vitro*. No entanto, uma vez que as formas extracelulares não são as formas desenvolvidas do parasita em hospedeiros vertebrados, as avaliações feitas com estas formas são apenas indicativas da potencial atividade tripanocida dos compostos testados. Consequentemente, um teste preliminar usando formas epimastigotas axênicas deve sempre ser complementado por uma avaliação subsequente usando formas intracelulares (amastigotas em células hospedeiras de vertebrados) para melhor interpretação dos resultados (GONZÁLEZ *et al.*, 2005).

Neste estudo, foram investigados o efeito de BZ, S, MLV, MLS e SE nas formas epimastigotas e amastigotas (doses de 6,25 a 100 μM) de *T. cruzi* e em células VERO e Macrófago RAW 264.7 (doses de 50 a 800 μM) no período de 72 h de tratamento. Os valores da concentração inibitória de 50% (IC_{50}), calculados com os dados deste ensaio, são mostrados na **Tabela 6**. Nesta tabela também são apresentados os valores de IC_{50} relativos ao fármaco de referência (BZ).

De acordo com os dados observou-se que o SE induziu baixa atividade tripanocida comparada ao BZ e a MLS em ambas formas de *T. cruzi*. A MLV não apresentou nenhuma atividade citotóxica. Contudo, S e MLS foram as nanoestruturas que induziram maior atividade tripanocida. Sobretudo, foi notado que estas apresentaram maior atividade tripanocida do que o BZ, fármaco de referência empregado clinicamente contra Doença de Chagas.

Quando se avaliou a atividade citotóxica em células VERO, observou-se que o IC_{50} foi cerca de 561 e 627 μM , após do tratamento com S e MLS, respectivamente. Consideramos este resultado bastante promissor, visto que demonstra que os tratamentos avaliados, S e MLS, apresentaram menor toxicidade inespecífica (células saudáveis) e ainda foram menos citotóxicos do que o BZ (IC_{50} 13,6 μM).

De acordo com *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) (RASSI E DE REZENDE, 2012) o índice de seletividade (SI) de um novo medicamento, contra a doença de chagas devem ter um SI igual ou superior a 10. Os valores de SI encontrados para S e MLS foram superiores a 10, o que indica potencial terapêutico elevado. Por exemplo, o tratamento com S induziu atividade tripanocida superior ao BZ em 50 vezes na forma epimastigota e 4 vezes em amastigota. Em relação à composição MLS observou-se que está induziu atividade tripanocida superior ao BZ em 57 vezes quando foram avaliadas a forma epimastigota e 9 vezes maior em amastigota. Assim, é notável o grande potencial terapêutico das composições S e MLS para o tratamento, visto estes resultados preliminares com a linhagem CL-Brener (*T.c.* VI) de *Trypanosoma cruzi*.

Tabela 6. Atividade citotóxica e índice de seletividade (SI) de BZ, S, MLV, MLS e SE[#]. sobre as formas extracelular e intracelular de *Trypanosoma cruzi* e em células VERO e macrófago RAW 264.7.

| IC ₅₀ Toxicidade | | | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|--|---|---------------------------------|----------------------|--|
| Fármacos e sistema nanoestrutura | IC ₅₀ (µM) ^a | | IC ₅₀ Toxicidade (µM) ^b | | SI ^c | |
| | Formas epimastigotas | Formas amastigotas intracelular em célula vero | Célula Vero (µM) | Célula Macrófago Raw 264.7 (µM) | Formas epimastigotas | Formas amastigotas intracelular em célula vero |
| BZ | 15,81 ±4.63 | 4,76 ± 4.45 (B) | 13.68 ±8,26 (C) | 554.80 ±4.90 (D) | 0.86 | 2.89 |
| S | 13,12 ±5.12 | 51.18 ± 4.91 (B) | 561.26 ± 6.06 (C) | 1654.377 ±5.20 (D) | 42.77(50) | 10.96(4) |
| MLV | - | - | - | - | - | - |
| MLS | 15,85 ±4.82 | 24.92 ± 4.80 | 626.68 ±4,63 | 1973.97 ±5.98 | 39.53(57) | 25.14(9) |
| SE | 62,43 ±6,72 (A) | 107.6 ± 5.46 (B) | 806.22 ±4,07 (C) | 1605.47 ± 9.90 (D) | 12.91(15) | 7.49(3) |

[#] Benzonidazol (BZ), N, N'- Squaramide 17 (S), Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV), Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'- Squaramide 17 (MLS) e N, N'- Squaramide 17 Extrusado (SE). Os resultados representados na tabela são referentes às médias de três experimentos independentes (média ± desvio padrão). a. IC₅₀ corresponde à concentração mínima para inibir 50% das formas epimastigotas e amastigotas. As células foram tratadas com 6,25 a 100 µM e incubadas por 72 h. b. IC₅₀ em células VERO e macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram tratadas com 50 a 800 µM e incubadas durante 72 h. c. Índice de seletividade (SI) representa = IC₅₀ (célula VERO) / IC₅₀ (Parasita forma extracelular e intracelular). Em parênteses é mostrado o número de vezes que as nanoestruturas excedem o SI (sobre formas epimastigota e amastigota intracelular de *T. cruzi*) em relação ao fármaco de referência (BZ). Letras maiúsculas (A, B, C, D) denotam diferença estatística entre MLS e os diferentes tratamentos (BZ, S, SE). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando P<0,0001. Os dados foram analisados por meio de ANOVA *one way* seguidos de pós teste de Dunnett's.

N, N'- Squaramide 17 induziu baixa citotoxicidade nas células VERO e RAW 264.7. Contudo, este composto promoveu alta atividade tripanocida com IC₅₀ de 13.12 (±5.12) µM e 51.18 (±4.91) µM para as formas epimastigotas e amastigotas. Isto demonstra que este fármaco apresentou toxicidade específica ao alvo, ou seja, foi mais citotóxico para formas amastigota e epimastigota de *T. cruzi* (linhagem CL-Brener - T.c. VI) do que para células saudáveis de vertebrados (células VERO de macaco e RAW.247 de murino). Resultados de atividade tripanocida foram também obtidos por Olmo *et al.*, (2014) o qual eles mostraram atividade tripanocida deste mesmo fármaco contra *T. cruzi* (linhagem SN3 - T.c. I) demonstrando IC₅₀ de 9.4 (±0.4) µM e 8.5 (±0.4) µM para as formas epimastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente. Ademais, MARÍN *et al.*, (2016b) demonstraram atividade deste fármaco contra leishmaniose. Esta capacidade citotóxica do S tem sido atribuída ao ácido esquárico. Estudos prévios têm demonstrado que derivados deste ácido aumentam significativamente a lipofilicidade e, portanto, eles têm a sua distribuição tanto no interior da célula como nos lisossomas (SAMPEDRO *et al.*, 2014).

Provavelmente existe uma relação entre as características físico-químicas das partículas (**Tabela 4**) e sua citotoxicidade (**Tabela 6**). A internalização de partículas nas células vêm sendo largamente estudada (WILHELM *et al.*, 2002; WIN E FENG, 2005; CHO *et al.*, 2009; VILLANUEVA *et al.*, 2009; PETROS *et al.*, 2010; VERMA E STELLACCI, 2010; KIM *et al.*, 2012; DUAN E LI, 2013). Neste contexto, todos os tipos de células de mamíferos usam o processo de endocitose para se comunicar com os ambientes biológicos, internalizando íons e biomoléculas (IVERSEN *et al.*, 2011). Uma das formas das células absorverem partículas é por meio de células fagocíticas (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos), visto que estas células podem internalizar diferentes tipos e formas de partículas tais como agregados, nanoestruturas opsonizadas ou maiores que 0,5 µm (PARK, 2013). A internalização de nanoestruturas em células de mamíferos, não-fagocíticas, ocorre principalmente por meio de pinocitose ou difusão direta. Por outro lado, estruturas em formatos geométricos influenciam a dinâmica de captação celular. Por exemplo partículas esféricas geralmente levam à internalização de nanoestruturas mais rápidas do que outros tipos de formas como cilíndrica e cúbica (BLANCO *et al.*, 2015).

Em nosso estudo nós demonstramos que SE tem um índice de polidispersividade maior que 0,5 apresentando tendência à aglomeração e uma estrutura amorfa (**Figura 10. C**). Em contraste, a MLS possui um Pdl menor do que 0,5 e uma estrutura esférica (**Figura 10. A**). Estas aglomerações do SE, podem afetar ao comportamento químico das nanoestruturas dentro dos sistemas ou soluções biológicas (PARK, 2013). Neste sentido, uma aglomeração alta, causa menos internalização nas células. Em nosso estudo, a citotoxicidade de SE em células VERO foi menor (IC₅₀: 806,22 ± 4,07 µM) do que com a MLS (IC₅₀: 626,68 ± 4,63 µM).

Em contraste, o IC_{50} do SE em células de macrófagos RAW 264.7 foi de 1605 ($\pm 9,9$) μM e da MLS foi de 1973,97 ($\pm 5,98$) μM . Uma hipótese é que esta diferença de citotoxicidade poderia ser atribuída à diferença entre tamanho e presença de aglomeração nanoestruturados (**Figura 10. C**). CHONO *et al.*, (2007) demonstraram que lipossomas entre 100 e 2000 nm foram mais captados por células de macrófagos comparado com lipossomas com tamanhos menores. Portanto, provavelmente nosso SE teve maior processo fagocítico (alta agregação), causando assim maior toxicidade comparado com a MLS.

6.3.2.1 Mecanismo hipotético da ação tripanocida da MLS sobre as formas amastigotas de CL-Brener no interior da célula VERO.

Com respeito ao mecanismo de liberação de fármacos encapsulados com lipossomas, estas nanoestruturas podem ser adsorvidas na superfície celular ou fundir-se com a membrana celular, liberando, assim, o seu conteúdo no citoplasma celular. Ainda, pode ocorrer a troca direta ou mediada por proteínas de transferência de componentes lipídicos ou por endocitose de lipossomas que são eventualmente acumulados nos lisossomos das células (TORCHILIN, 2005).

Por outro lado, existe um mecanismo de internalização de fármaco chamado "parasitótropo lisossomo trópico" (DE DUVE *et al.*, 1974; CHOWDHARY *et al.*, 2016). Este mecanismo consiste em duas etapas sendo que a primeira é a formação de vacúolos parasitóforas que se fusionam com os lisossomas, formando os fagolisossomas. Igualmente, os lipossomas, contendo fármacos, também podem ser fusionados com os lisossomas formando os lisossomos trópicos. A segunda etapa baseia-se nas interações e fusões entre o fagolisossomas e os lisossomotrópicos, causando assim a desintegração do parasita. É bem conhecido que os lisossomas tem um ambiente ácido e rico em enzimas propício para causar a degradação ou hidrólises do seu conteúdo (MAO *et al.*, 2013).

Portanto, é provável que a MLS sofra um processo de degradação que pode afetar o ambiente citoplasmático da célula e, conseqüentemente, sua toxicidade. Esta pesquisa demonstrou alta atividade tripanocida da MLS contra as formas amastigotas intracelulares. Um estudo realizado por XIMENIS *et al.*, (2017) demonstrou que, sob diferentes pHs (2 a 8), o N, N'- Squaramide 17 entram em um processo de hidrólises, indicando a separação do ácido esquárico e de duas amidas (**ANEXO F**). Uma das vantagens deste ácido é conter uma família de oligômeros aromáticos que são compostos com capacidades consideráveis de ser doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio. Ademais, estes apresentam propriedades

dinâmicas favoráveis que permitem adoção de estruturas secundárias (**ANEXO D**) (ROTGER *et al.*, 2006).

Em resumo, MLS depois de internalizadas, nas células, sob distintos processos de endocitoses, poderiam passar por uma etapa de fusão de lisossomas e fagolissomas com o parasita causando um processo de ação tripanocida nas formas amastigotas. Assim, é provável que o nanocristais do ácido esquárico interaja com alguma molécula essencial para o metabolismo do parasita intracelular causando redução na sua replicação no interior da célula. Portanto, isto poderia explicar sua relevante atividade antiparasitária (tripanocida) a qual é comprovada pelo fato do IC_{50} da MLS ($24,92 \pm 4,80 \mu M$), em amastigotas (**ANEXO 7 C**), ter sido tão significativo ($P < 0,0001$) em comparação ao S (IC_{50} : $51,18 \pm 4,91 \mu M$) (**ANEXO 7 B**) (**Tabela 6**).

6.4 Ensaio de infecção celular

O objetivo deste ensaio foi determinar os efeitos das composições em células hospedeiras e, para isso, avaliou-se a propagação do parasita em células VERO determinando a porcentagem de taxa de infecção e o número médio de amastigotas intracelular e tripomastigotas no meio extracelular durante oitos dias.

As células VERO foram incubadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* durante 12 horas. Subsequentemente, as células foram avaliadas quanto a presença de infecção, em seguida, a conversão morfológica progressiva para as formas amastigotas ocorreu (**Figura 14**). Durante o 1º ao 8º dia, a porcentagem de taxa de infecção das células hospedeiras aumentou gradualmente e notou-se que 60 % das células foram infectadas no oitavo dia (**Figura 15**).

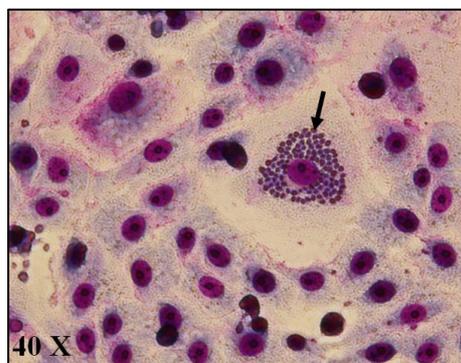


Figura 14. Célula VERO infectada com *T. cruzi*- CL-Brener. As células foram coradas com kit de coloração Panótico. A seta indica amastigotas no interior da célula (40 X), após de 12 horas de infecção com parasitos.

Em nosso estudo analisamos a taxa de infecção celular durante oitos dias visto que há muitas pesquisas demonstrando que não existe diferença significativa em relação ao controle nas primeiras 96 horas de análises após infecção celular e tratamento com fármacos tripanocidas, como é o caso do BZ (GONZÁLEZ *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 2011; MARÍN *et al.*, 2013; OLMO *et al.*, 2013; OLMO *et al.*, 2014; OLMO *et al.*, 2014; OLMO *et al.*, 2015; MARÍN *et al.*, 2016a).

Na maioria dos estudos sobre ensaios de atividade de novos compostos anti-parasitas, são selecionadas as dosagens que tiveram maior efeito inibitório sobre o crescimento *in vitro* dos parasitas e que ao mesmo tempo, tiveram menor efeito tóxico sobre células VERO. Assim optamos por a metade da citotoxicidade ($IC_{50}/2$) de cada tratamento.

Além disso, para realização de infecção celular foram considerados os índices de seletividades demonstrados na **Tabela 4**, e foram escolhidos os SI maiores que 10 e que, neste caso, foram de 10,96 e 25,14 para S e a MLS, respectivamente. A partir destes dados foi utilizada as dosagens de $IC_{50}/2$, ou seja, 6,84; 280,63 e 313 μ M para BZ, S e a MLS, respectivamente.

Assim, utilizando dosagem equivalente a $IC_{50}/2$, para estes tratamentos, verificou-se que, a taxa de infecção, após tratamento com BZ, S e MLS, foi menor do que em relação a controle, mas não na mesma extensão. A redução da taxa de infecção foi em torno de 81 % para S e cerca de 86% para a MLS. Neste ensaio notamos que os tratamentos com S e a MLS, composições avaliadas neste trabalho foram mais eficazes em inibir a infecção de *T. cruzi* do que o fármaco padrão que é usado clinicamente no tratamento de Doença de Chagas, o BZ (MLS 86% x BZ 17%). Ainda, observou-se que a taxa de infecção nas células tratadas com BZ, no 8º dia, não mostrou diferença estatística em relação ao controle (**Figura 15**).

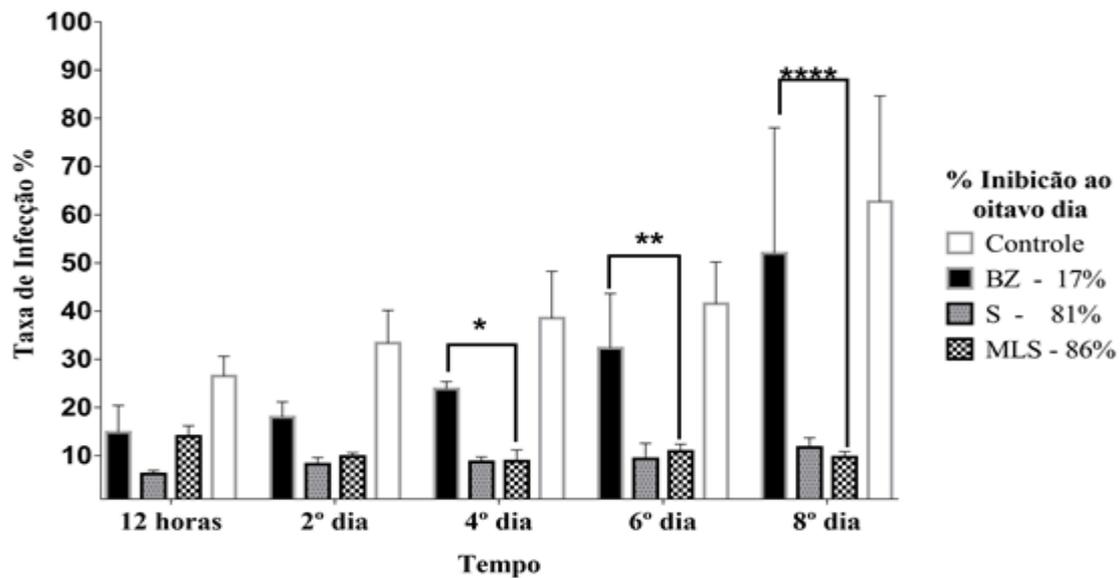


Figura 15. Porcentagem de taxa da infecção de *T. cruzi* em células VERO tratadas com a dose de $IC_{50}/2$.

■ Benzonidazol (BZ) ($IC_{50}/2$:6.84 μ M), ■ N, N'- Squaramide 17 (S) ($IC_{50}/2$:280.63 μ M) e ▨ Membranas Lipídicas Miméticas contendo N, N'- Squaramide 17 (MLS) ($IC_{50}/2$:313.34 μ M) e □ células sem tratamento (controle). Os resultados são expressos como média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes e analisados por meio de ANOVA *Two way* seguido de pós-teste de Dunnett's. As porcentagens representam inibição da taxa de infecção em relação ao controle do oitavo dia. *Asteriscos representam diferenças estatística foram consideradas quando $P < 0,05$.

Por outro lado, o número médio de amastigotas por células VERO foi contabilizado e estes dados estão representados na **Figura 16**. Após oito dias sob tratamento, verificou-se que S reduziu o número de amastigotas por célula em cerca de 62 %, enquanto a MLS reduziu em 72 % e BZ em torno de 51%. Ainda, o 6º dia, observou-se diferença estatística entre S e MLS ($P < 0,001$) sendo mais eficiente a MLS nesse dia.

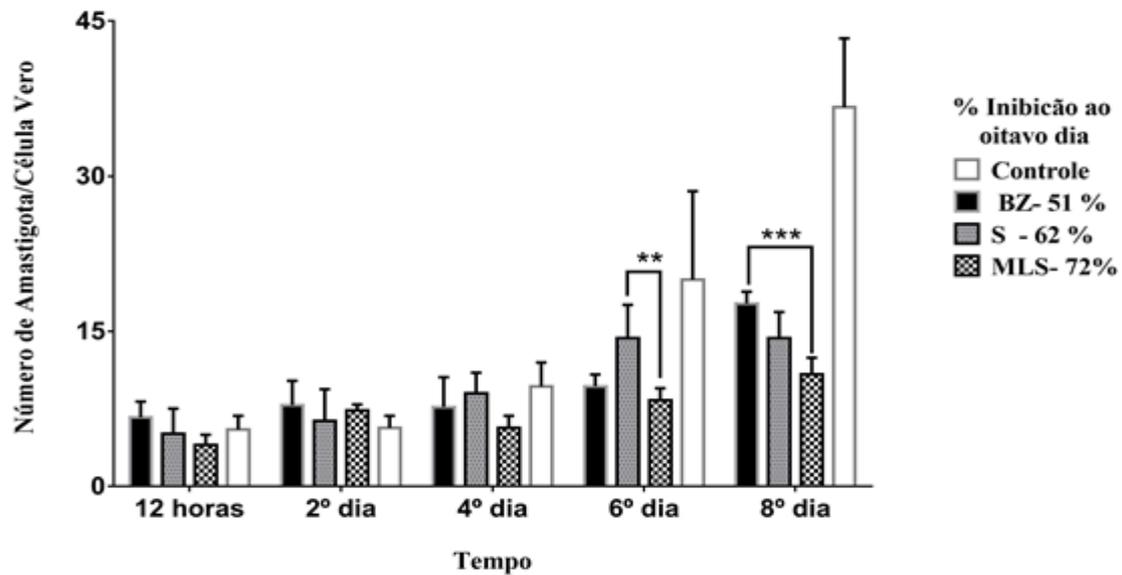


Figura 16. Número de amastigotas de *T. cruzi* em células VERO tratadas na dose de $IC_{50}/2$.

■ Benzonidazol (BZ) ($IC_{50}/2:6.84 \mu\text{M}$), ■ N, N'- Squaramide 17 (S) ($IC_{50}/2:280.63 \mu\text{M}$) e ■ Membranas Lipídicas Miméticas contendo N, N'- Squaramide 17 (MLS) ($IC_{50}/2:313.34 \mu\text{M}$) e □ célula sem tratamento (controle). Os resultados são expressos como média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes e analisados por meio de ANOVA *Two way* seguido pós-teste de Dunnett's. As porcentagens representam inibição da taxa de infecção em relação ao controle do oitavo dia. *Asteriscos representam diferença estatística entre MLS e diferença estatísticas foram considerando quando $P < 0,05$.

Foi feita também a contagem de tripomastigotas presentes no meio de cultura (**Figura 17**) até o 8º dia do experimento. De acordo com este experimento o BZ, inibiu em 54%, S em 56% e MLS em 81% o número de amastigotas no meio comparado com o controle em que não se observou qualquer inibição.

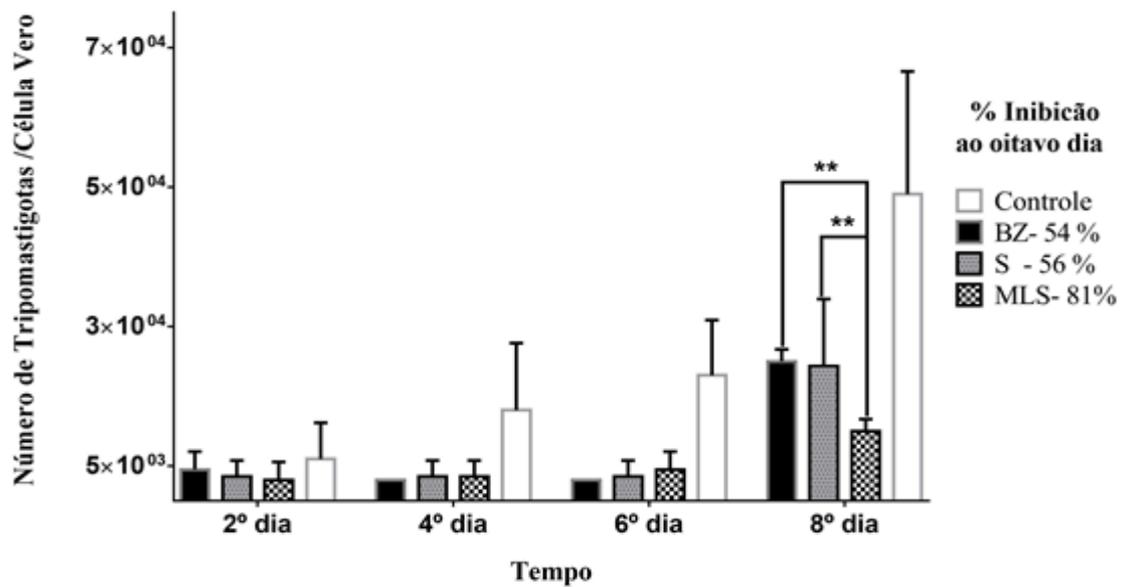


Figura 17. Número de tripomastigotas do *T. cruzi* em células VERO tratadas com $IC_{50}/2$.

■ Benzonidazol (BZ) ($IC_{50}/2: 6.84 \mu M$), ■ N, N'- Squaramide 17 (S) ($IC_{50}/2: 280.63 \mu M$) e ■ Membranas Lipídicas Miméticas contendo N, N'- Squaramide 17 (MLS) ($IC_{50}/2: 313.34 \mu M$) e □ células sem tratamento (controle). Os resultados são expressos como média (\pm desvio padrão) de três experimentos independentes e analisados por meio de ANOVA *Two way* seguido pós-teste de Dunnett's. As porcentagens representam inibição da taxa de infecção em relação ao controle do oitavo dia. *Asteriscos representam diferença estatística entre MLS e diferença estatísticas foram considerando quando $P < 0,05$.

Os dados aqui obtidos sobre a infecção de parasitas em células VERO estão em consonância com os resultados relativos à atividade tripanocida apresentados na **Tabela 4** para formas intracelulares amastigotas ($IC_{50}: 24.92 \pm 4.80 \mu M$) de *T. cruzi* visto que os parasitas perderam sua capacidade de infecção em 86%. Ademais, a multiplicação das amastigotas intracelular foi reduzido em 72 % o que afetou a inibição de número de tripomastigotas extracelulares em 81 %. Com estes resultados fica evidenciado que MLS teve alta atividade tripanocida visto a ação de S.

Por outro lado, OLMO *et al.*, 2014 mostraram que, ao utilizar S em cepas SN3 (*T.c. l*) *in vitro*, houve uma inibição parasitária de 67 % (taxa de infecção) sendo reduzido a multiplicação de 52% de amastigotas intracelulares e de 75 % de tripomastigotas extracelulares. E nosso estudo (linhagem usados aqui o CL-Brener *T.c. VI*), obtivemos uma inibição parasitária de 81% de taxa de infecção, de 62 % em números de amastigotas intracelular de 56 % e de tripomastigotas. Esta diferença entres os dois estudos, em relação ao efeito tripanocida de S, pode estar associada com as diferentes respostas fenotípicas dos

parasitas com os fármacos (susceptibilidade e/ou resistência) (MORAES *et al.*, 2014). Porém, nós consideramos que o S tem uma alta atividade tripanocida para diferentes linhagens de *T. cruzi*. por exemplo para T.c. I e o T.c.VI (CL-Brener) já que, este último é um híbrido de T.c. II e T.c. III. Portanto, é muito provável que as linhagens de T.c. IV e T.c. V sejam susceptíveis ao tratamento S e à MLS apresentando atividade tripanocida.

6.5 Alterações estruturais no *T. cruzi*

Para as análises de alterações estruturais foi tomando em conta os dados obtidos na **Tabela 4**, e escolhida a metade da concentração de IC₅₀ para epimastigotas enquanto que para as formas tripomastigotas foi selecionado o mesmo tratamento do ensaio de infecção celular (IC₅₀ para as células VERO) de acordo com a **tabela 7**.

Tabela 7. IC_{50/2} sobre as formas extracelular (epimastigotas e tripomastigotas) de *Trypanosoma cruzi* CL-Brener.

| | IC _{50/2} (µM) | |
|----------|-------------------------|-----------------|
| | Epimastigotas | Tripomastigotas |
| Controle | - | - |
| BZ | 7,91 | Não analisado |
| S | 6,56 | 280,65 |
| MLS | 7,93 | 313,35 |
| SE | 31,21 | Não analisado |

Benzonidazol (BZ), N, N'- Squaramide 17 (S), Membranas Lipídicas Miméticas Vazias (MLV), Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'-Squaramide 17 (MLS) e N, N'- Squaramide 17 Extrusado (SE). Os valores representados na tabela são referentes a IC_{50/2} para os tratamentos contra as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener.

6.5.1 Epimastigotas

As epimastigotas foram incubadas durante 72 horas com BZ, S, MLS e ES, na dose de $IC_{50}/2$ (**Tabela 7**) e as alterações ultraestruturais provocadas por estes tratamentos em comparação com o controle (sem tratamento) são mostradas na **Figura 18**. No controle (**Figura 18. A**) é possível visualizar áreas especializadas da superfície celular, como o citóstoma, que é uma estrutura envolvida na captação de macromoléculas do meio através de um processo endocítico (**Figura 18. A1**) (SOUZA, 2009) e flagelo que emerge da parte média do parasita.

Em relação aos parasitas tratados com BZ notou-se alteração na superfície celular como proeminências no corpo celular e também distorção no flagelo e citóstoma (**Figura 18. B1**). Adicionalmente, observou-se alterações provenientes do tratamento com S como protuberância no citóstoma na parte superior celular (**Figura 18. C1**) e após tratamento com MLS observou-se fissuras com diâmetro de aproximadamente de 200 nm na parte superior celular (**Figura 18. D1**). Também foram observadas distorções no flagelo, redução do corpo celular em sua extensão e aumento em sua largura induzidos pelo tratamento com N, N'-Squaramide 17 Extrusado (**Figura 18. E**).

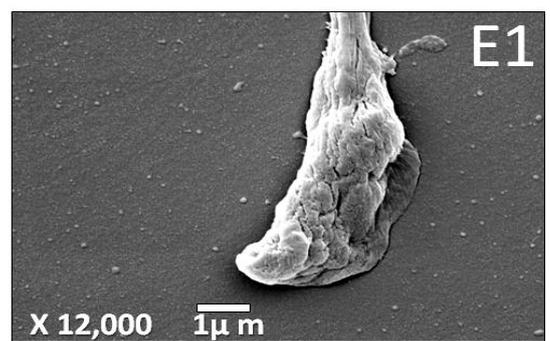
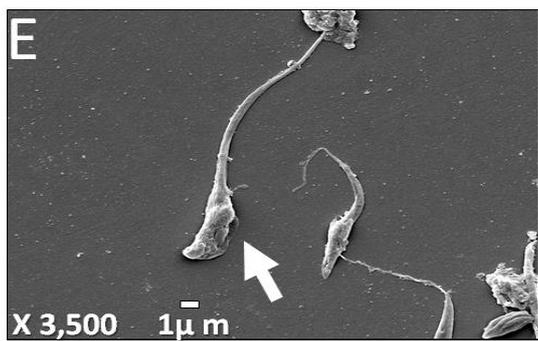
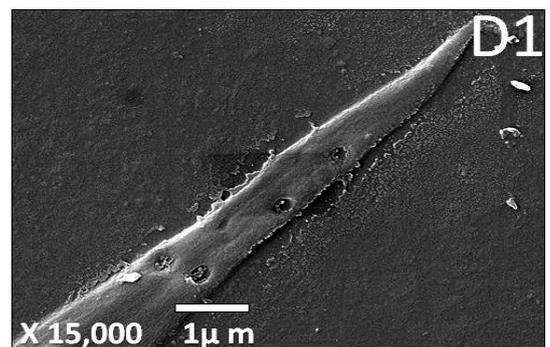
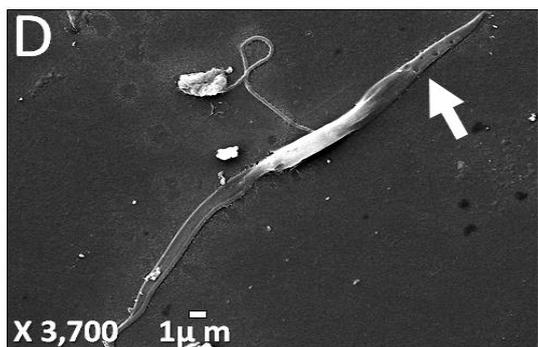
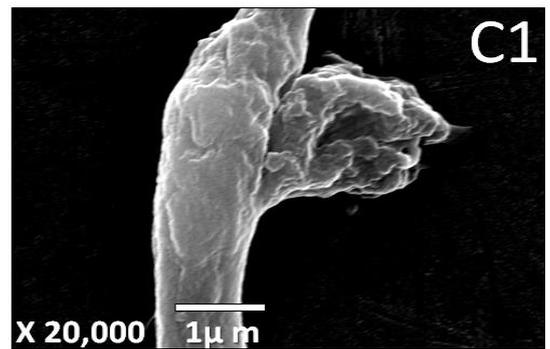
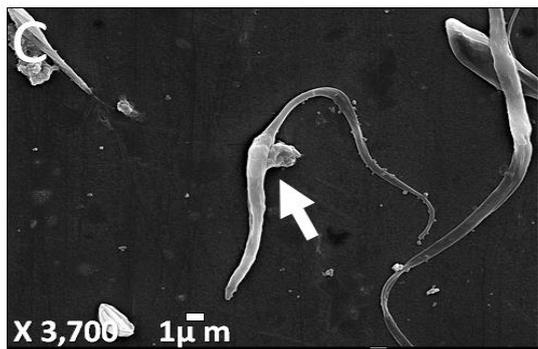
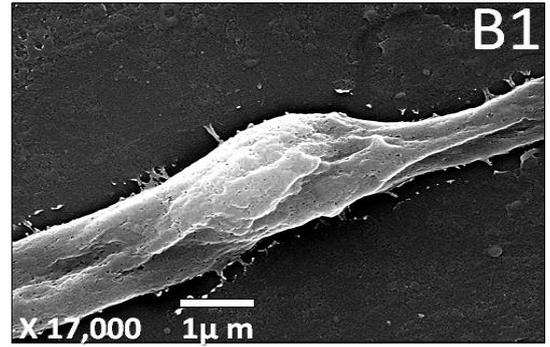
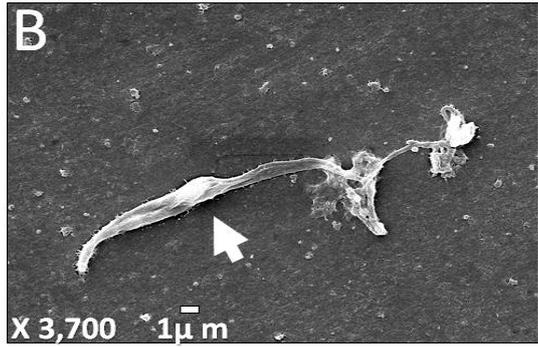
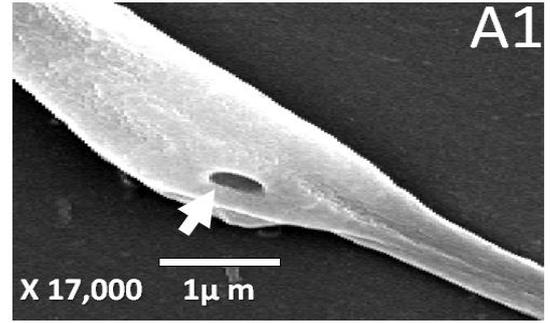
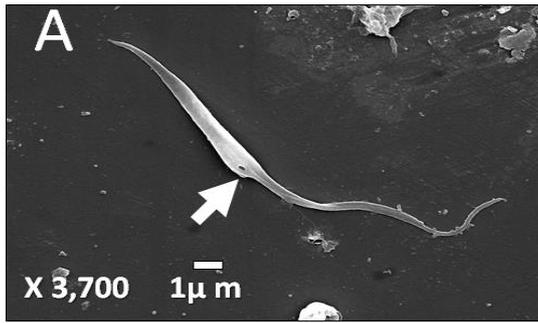


Figura 18. Alterações morfológicas analisado por MEV em epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com BZ, S, MLS, SE por 72 h. (A;A1) Controle (sem tratamento) visualizou-se a citóstoma, (B;B1) benzonidazol ($IC_{50}/2$: 7,91 μ M) observou-se no citóstoma alteração na superfície celular, (C;C1) N,N'- Squaramide 17 ($IC_{50}/2$: 6,56 μ M) notou-se uma protuberância no citóstoma na parte superior celular, (D;D1) Membranas Lipídicas Miméticas com N,N'- Squaramide 17 ($IC_{50}/2$: 7,93 μ M) observou-se fissuras com diâmetro de aproximadamente de 200 nm na parte superior celular, e, (E;E1) N,N'- Squaramide 17 Extrusado ($IC_{50}/2$: 31,21 μ M) apresentou-se distorções no flagelo, redução do corpo celular em sua extensão e aumento em sua largura. Na seta é apontado o lugar em destaque e as letras com número representam a magnificação da região apontada na seta.

6.5.2 Tripomastigotas

Tripomastigotas foram incubados durante 12 horas com diferentes tratamentos sob a dose de $IC_{50}/2$ (**Tabela 7**). Na **Figura 19** são mostradas as alterações ultraestruturais induzidas por S e MLS. Observou-se nos parasitas tratados com S uma ruptura na membrana ondulatória na parte superior celular (**Figura 19. B1**) e notou-se uma transformação de tripomastigotas para amastigota após tratamento com MLS (**Figura 19. C**).

E condições axênicas, pode ocorrer a diferenciação morfológica de tripomastigotas em amastigotas e vários fatores que estimulam essa transformação foram descritos por (VILLALTA E KIERSZENBAUM, 1982; ANDREWS *et al.*, 1987; TOMLINSON *et al.*, 1995). Alguns desses fatores são bem caracterizados como pH ácido, mudança de temperatura, meio altamente enriquecido ou estresse fisiológico. Portanto, sugerimos que a amastigogênese (processo de transformação de tripomastigotas para amastigotas) *in vitro* pode ter ocorrido em decorrência de processos de estresse fisiológico causada pela nanoestrutura MLS.

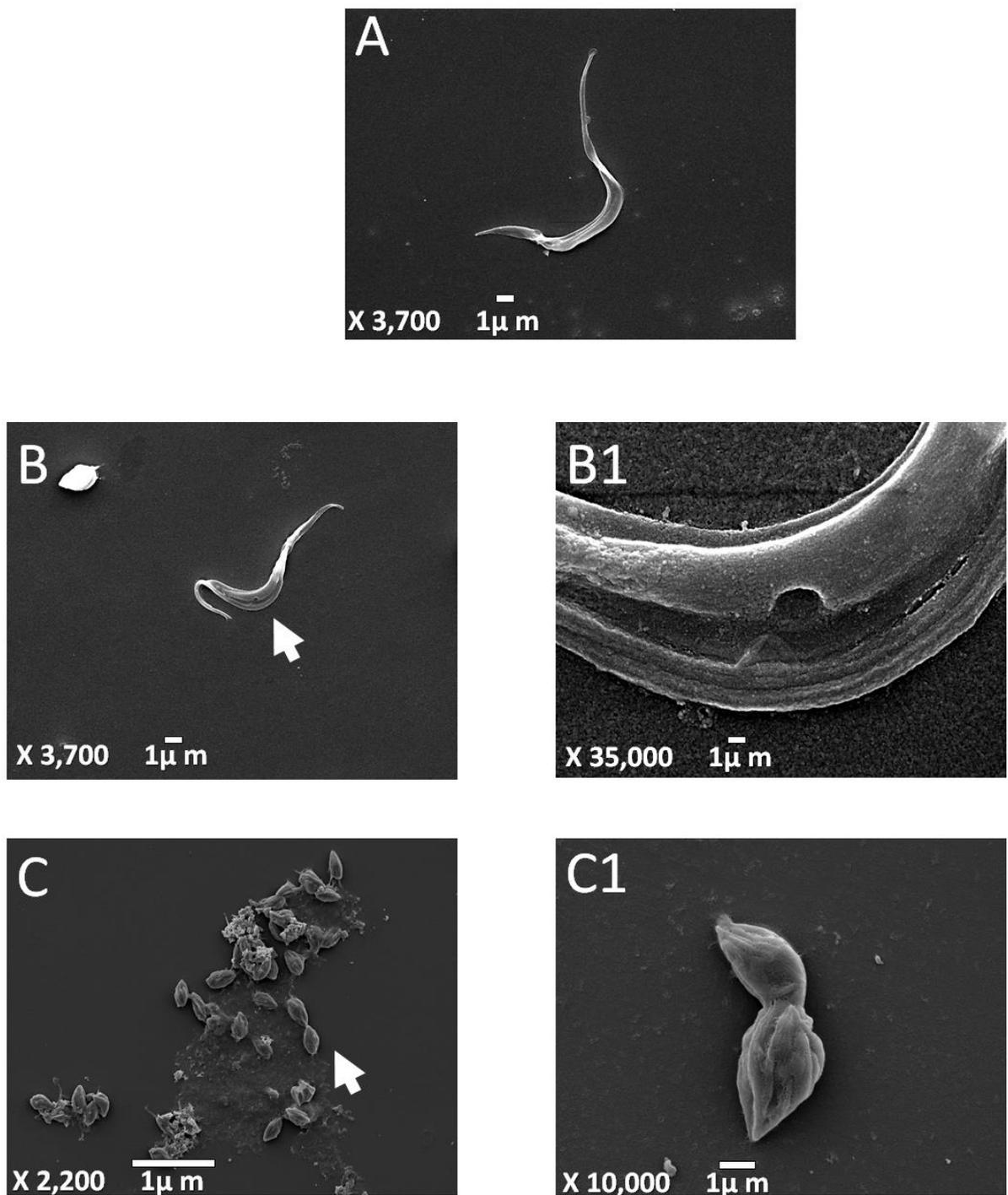


Figura 19. Alterações morfológicas analisadas por MEV em tripomastigotas de *T. cruzi* tratadas com S e MLS por 12 h.

A) Controle (sem tratamento), B) N, N'-Squaramide 17 ($IC_{50}/2$: 280,65 μ M) observou-se uma ruptura na membrana ondulatória na parte superior celulares C) Membranas Lipídicas Miméticas com N, N'- Squaramide 17 ($IC_{50}/2$: 313,35 μ M) notou-se transformação a amastigotas. Na seta é apontado o lugar da alteração estrutural em destaque e as letras com número representa a magnificação da região apontada na seta.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Conseguiu-se obter lipídios de célula de macrófago RAW 264.7 e, pelo método de extrusão permitiu-se obter diferentes sistemas nanoestruturados como a membrana lipídica vazia (MLV), membrana lipídica com N'N'- Squaramide 17 (MLS) e o N'N'- Squaramide 17 Extrusado (ES) mostrando diferentes diâmetros (203, 196 e 713 nm, respectivamente), e MLV e MLS apresentaram uma morfologia esférica a comparação do ES apresentou morfologia amorfa.
- MLV podem ser consideradas como promissoras plataformas nanoestruturados visto não ter induzido toxicidade em células VERO e Macrófago RAW 264.7.
- Notou-se redução da estabilidade de MLS após de 10 dias de armazenamento haja vista que seu diâmetro hidrodinâmico (dH) variou de 196,2 (\pm 11) nm para 126,5 (\pm 0,7) nm neste período.
- MLS tiveram uma diminuição em seu dH ao ser colocadas em soluções aquosas com diferentes potenciais hidrogeniônicos (pH de 4, 7, 9) tanto no primeiro como no décimo dia.
- Por meio da espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR) foi demonstrado que o S foi incorporado nas bicamadas lipídicas extraídas da membrana de macrófago RAW 264.7 haja vista que encontramos a presença das bandas em 1788 cm^{-1} e 1674 cm^{-1} , correspondentes às carbonilas existente em S.
- A MLS, nanoestrutura contendo o S, induziu elevada citotoxicidade em epimastigotas (IC_{50} de 15,9 \pm 4,8 μM) e amastigotas intracelulares (IC_{50} de 24,99 \pm 4,8 μM), e, induziu baixa citotoxicidade com (IC_{50} de 626.7 \pm 4.7) em células VERO e de (1974 \pm 6) em RAW 264.7,
- Observou-se que os parasitas perderam sua capacidade de infecção em 86% após tratamento com MLS sendo que houve 72 % de redução da multiplicação de amastigotas intracelulares levando, assim, à uma inibição de 81 % no número de tripomastigotas extracelulares.
- Observou-se alterações estruturais induzidas por MLS em epimastigotas como presença de fissuras com diâmetro de aproximadamente de 200 nm na parte superior celular ($\text{IC}_{50}/2$: 7,93 μM em 72 horas) e notou-se uma diferenciação de tripomastigotas para amastigotas ($\text{IC}_{50}/2$: 313,35 μM em 12 horas).

8 PERSPECTIVAS

Considerando tudo o que foi exposto e discutido neste trabalho, sugerimos algumas perspectivas para estudos futuros como:

- Realizar estudos entre a interação celular e as diferentes nanoestrutura, usando microscopia confocal ou citometria de fluxo.
- Utilizar outros tipos de fármacos, para encapsular nas membranas lipídicas miméticas e aplicar para outras doenças como leishmanioses ou câncer.
- Avaliar os efeitos tóxicos e atividade tripanocida destas nanoestruturas (MLV, MLS e SE) em ensaios *in vivo* (camundongos).
- Analisar alterações citoplasmáticas e mitocondriais nas células VERO e macrófago RAW 264.7 e as diferentes fases do parasito, nos processos metabólicos durante os tratamentos da MLS.
- Identificar os principais fosfolípidios que se encontrem nas membranas lipídicas miméticas.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

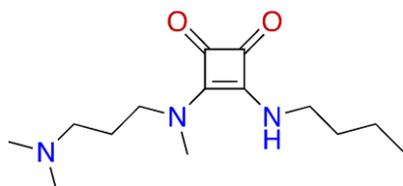
- A funcionalização biomimética mediada pela membrana celular oferece uma enorme promessa de revolucionar a nanomedicina em várias disciplinas e especialidades: como autoterapias não invasiva e entrega de fármacos, para o tratamento de câncer e outras doenças.
- Neste trabalho, temos cumpridos alguns dos objetivos principais da nanotecnologia contra a doença de Chagas que é diminuir a citotoxicidade de um fármaco em células e ter uma alta atividade tripanocida nas diminuições das formas amastigotas que atualmente são as formas mais difíceis de inibir a nível intracelular.

10 ANEXO

| | |
|---|-----------|
| ANEXO 1 CARACTERÍSTICAS DE N, N'- SQUARAMIDE 17..... | 55 |
| ANEXO 2 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS EM SISTEMAS CARREADORES MICRO E NANOESTRUTURADOS | 55 |
| ANEXO 3 ETAPAS DE OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS..... | 56 |
| ANEXO 4 OS DERIVADOS AMINO DO ÁCIDO ESQUÁRICO, PODEM SER CONSIDERADOS COMO AMIDAS VINYLOGOUS, QUE TEM A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO..... | 56 |
| ANEXO 5 TRANSIÇÕES CONFORMACIONAIS ENTRE OS ROTÂMEROS (Z, Z) E (Z, E) DA AMINOSQUAMIDA 17 | 57 |
| ANEXO 6 HIDRÓLISES DO N, N'- SQUARAMIDE 17 | 57 |
| ANEXO 7 CÉLULA VERO INFECTADA COM <i>T. cruzi</i> CL-Brener | 58 |

ANEXO 1 CARACTERÍSTICAS DE N, N'- SQUARAMIDE 17.

MATERIAL. O Material é identificado como:



UIB-A47

Para uma descrição completa, consulte:

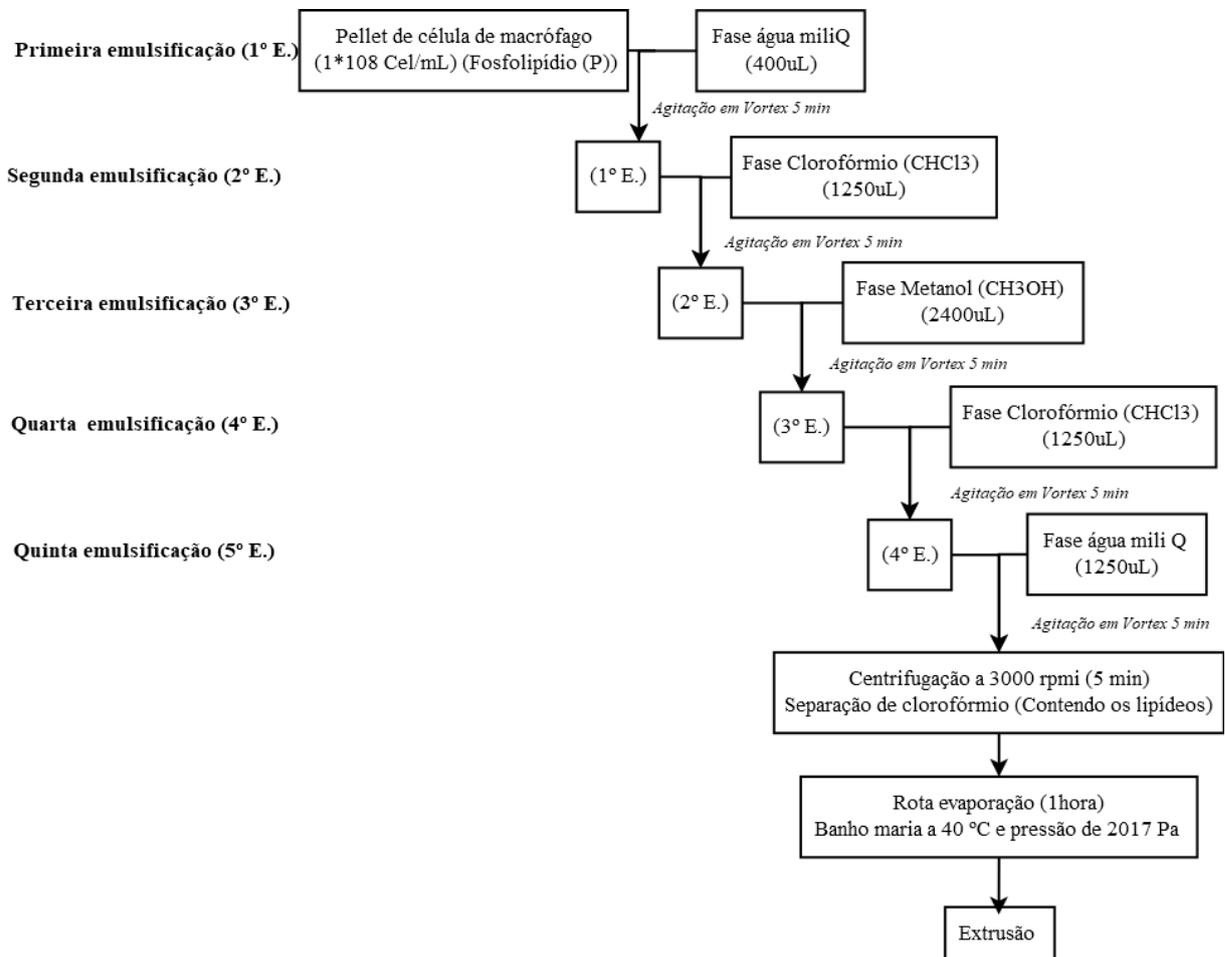
Synthesis and biological evaluation of N, N' -squaramides with high *in vivo* efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease"

F. Olmo, C. Rotger, I. Ramírez-Macías, L. Martínez, C. Marín, L. Carreras, K. Urbanova, M. Vega, G. Chaves-Lemaur, A. Sampedro, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 987-999.

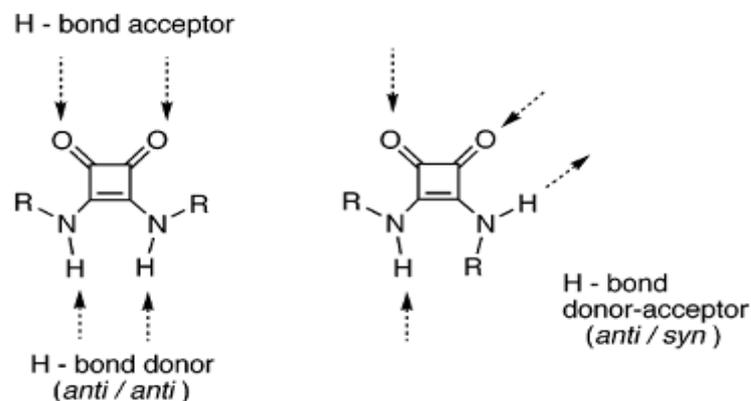
ANEXO 2 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS EM SISTEMAS CARREADORES MICRO E NANOESTRUTURADOS

Após envasamento celular, estes foi resuspendido em 400 uL de água ultrapura formando uma solução homogênea, em seguida foram adicionadas 1250 uL de clorofórmio, 2400 uL de metanol, 1250 uL de clorofórmio e 1250 uL de água, a adição de cada solvente foi seguida de agitação em vórtex por 5 minutos e logo as amostras foram centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos para a separação da fase de clorofórmio (orgânico) contendo os lipídeos. A fase orgânica, contendo os lipídeos, foi coletada e acondicionada em uma rota evaporação. Em seguida a amostra foi submetida à rota evaporação por uma hora, em banho à 40 °C e pressão de 207 Pa, para a evaporação do clorofórmio e conseqüentemente formação do filme lipídico (**ANEXO 3**).

ANEXO 3 ETAPAS DE OBTENÇÃO DE LIPÍDIOS

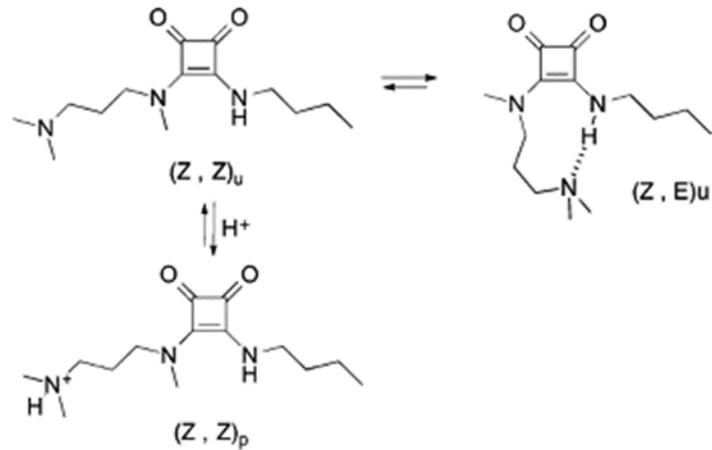


ANEXO 4 OS DERIVADOS AMINO DO ÁCIDO ESQUÁRICO, PODEM SER CONSIDERADOS COMO AMIDAS VINILOUS, QUE TEM A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DE HIDROGÊNIO.



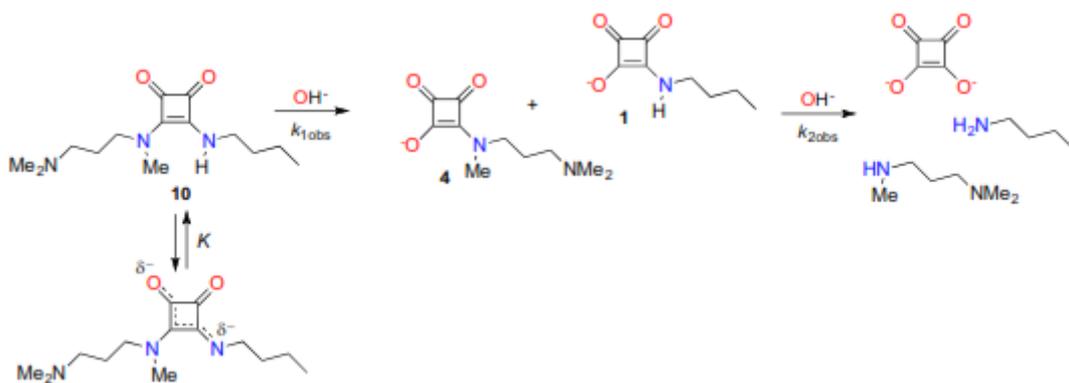
Opções de ligação de hidrogênio decorrentes anti/anti ou anti/syn, confôrmeros de Squaramide bis-secundários Fonte: (ROTGER *et al.*, 2004).

ANEXO 5 TRANSIÇÕES CONFORMACIONAIS ENTRE OS ROTÂMEROS (Z, Z) E (Z, E) DA AMINOSQUAMIDA 17

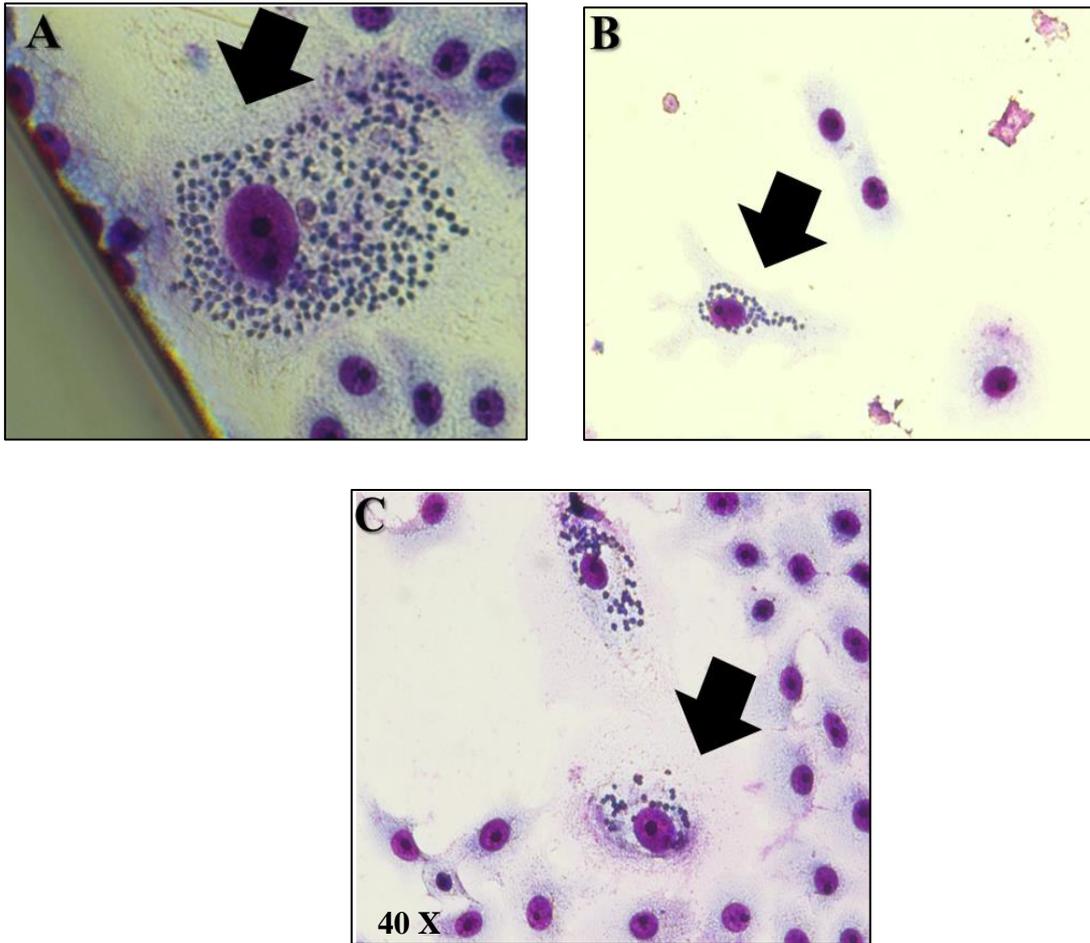


Transições Conformacionais da Aminosquaramida 17. Os subscritos "u" e "p" indicam formulários neutros e protonados, respectivamente. (OLMO *et al.*, 2014)

ANEXO 6 HIDRÓLISES DO N, N'- SQUARAMIDE 17



1 e 4 produtos do Squaramato. Hidrólise alcalina em duas etapas de um Squaramide representativa Fonte: (XIMENIS *et al.*, 2017).

ANEXO 7 CÉLULA VERO INFECTADA COM *T. cruzi* CL-Brener

As células foram coradas com kit de coloração Panótico. A seta indica amastigotas no interior da célula 40 X, após de 72 horas de tratamentos. As letras maiúsculas, apresentam: A) controle, B) Tratado com N, N Squaramide 17 e C) Tratadas com membranas lipídicas miméticas com N, N Squaramide 17.

11 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE A FORMAÇÃO DO MESTRADO

Artigo de revisão

- Autor: Review: Nanobiotechnology Solutions Against Chagas Disease
- Autor: Review Characteristics, Biological Properties and Analytical Methods of Piperine.

Patente

- Autor: Produção, caracterização e avaliação citotóxica de membranas lipídicas miméticas para a liberação do tripanocida N, N'-Squaramide 17 na linhagem CL Brener de *Trypanosoma cruzi*.

Coautor do livro

- “Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente no capítulo Nanotecnologia aplicada para tratamentos de cicatrização e regeneração tecidual”.

Ministrar minicurso

- Pesquisa e gerenciamento de referências bibliográficas.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. **The ecology and genetics of Chagas disease vectors in Ecuador, with emphasis on *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae)**. 2003. London School of Hygiene & Tropical Medicine,

AGUILAR, M. et al. Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 387-393, 1999.

ANDRADE, Z. A. Immunopathology of Chagas Disease. . **Memoria de instituto de Oswaldo Cruz**, p. 71-80, 1999.

ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 64, n. 3, p. 474-484, 1987. ISSN 0014-4894.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol Biochem Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 249-56, Mar 15 1989. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2468085> >.

ANDREYEV, A. Y. et al. Subcellular organelle lipidomics in TLR 4-activated macrophages. **Journal of lipid research**, p. jlr. M008748, 2010. ISSN 0022-2275.

AZEREDO, C. M. O. et al. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 309, 2014. ISSN 1472-6882.

BANGHAM, A.; STANDISH, M.; WEISSMANN, G. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. **Journal of molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 253-IN28, 1965. ISSN 0022-2836.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941, 2015. ISSN 1546-1696.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959. ISSN 0576-5544.

BRENER, Z. (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*). **Ann Trop Med Parasitol**, v. 59, p. 19-26, Mar 1965. ISSN 0003-4983 (Print) 0003-4983 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14297351> >.

BRIDELLI, M.; CAPELLETTI, R.; MORA, C. Structural features and functional properties of water in model DMPC membranes: thermally stimulated depolarization currents (TSDCs) and Fourier transform infrared (FTIR) studies. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 46, n. 48, p. 485401, 2013. ISSN 0022-3727.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 175-200, 1995. ISSN 0066-4227 (Print) 0066-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561458> >.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010. ISSN 0074-0276.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. et al. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 522-528, 2011. ISSN 0144-8617.

CASTRO, J. A.; DEMECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & experimental toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, 2006. ISSN 0960-3271.

CAZZULO, J.-J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **The FASEB Journal**, v. 6, n. 13, p. 3153-3161, 1992. ISSN 0892-6638.

COLLIER, J. H.; MESSERSMITH, P. B. Phospholipid strategies in biomineralization and biomaterials research. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, n. 1, p. 237-263, 2001. ISSN 1531-7331.

CHO, E. C. et al. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. **Nano letters**, v. 9, n. 3, p. 1080-1084, 2009. ISSN 1530-6984.

CHONO, S. et al. Uptake characteristics of liposomes by rat alveolar macrophages: influence of particle size and surface mannose modification. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 75-80, 2007. ISSN 0022-3573.

CHOWDHARY, S.; CHOWDHARY, A.; KASHAW, S. Macrophage targeting: A strategy for leishmaniasis specific delivery. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 8, n. 11, p. 16-26, 2016.

DE ARAUJO-JORGE, T. C. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 441-62, Oct-Dec 1989. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2487443> >.

DE ARAUJO-JORGE, T. C.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 5, p. 43-56, 1992. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1342716> >.

DE DUVE, C. et al. Lysosomotropic agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 23, n. 18, p. 2495-2531, 1974. ISSN 0006-2952.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002. ISSN 1381-6128 (Print) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366> >.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010. ISSN 1687-8884 (Electronic) 1687-8876 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811486> >.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Prog Histochem Cytochem**, v. 44, n. 2, p. 67-124, 2009. ISSN 1873-2186 (Electronic) 0079-6336 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410686> >.

DE TORANZO, E. D. et al. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988. ISSN 0014-4754.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-biological interactions**, v. 73, n. 1, p. 1-27, 1990. ISSN 0009-2797.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1521-1532, 2013. ISSN 1613-6810.

EIBL, H. Phospholipids as functional constituents of biomembranes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 23, n. 4, p. 257-271, 1984. ISSN 0570-0833.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 3, p. 283-291, 2010. ISSN 0014-4894.

FAHY, E. et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S9-S14, 2009. ISSN 0022-2275.

FERNÁNDEZ-PRESAS, A. M. et al. Specific antibodies induce apoptosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, v. 106, n. 6, p. 1327-1337, 2010. ISSN 0932-0113.

GARIDEL, P. et al. The mixing behavior of pseudobinary phosphatidylcholine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and chain length. **European biophysics journal**, v. 26, n. 6, p. 447-459, 1997. ISSN 0175-7571.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010. ISSN 0036-8075.

GONZÁLEZ, P. et al. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 2, p. 136-141, 2005. ISSN 0924-8579.

GUZMÁN-MARIN EUGENIO, D. S. Los transmisores de la enfermedad de Chagas **Revista Biomedica**, v. 1, n. 3, p. 144, 1990. Disponible em: < <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb90135.pdf> >.

HERRERA, C. et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. **Infect Genet Evol**, v. 7, n. 4, p. 535-9, Jul 2007. ISSN 1567-1348 (Print) 1567-1348 (Linking). Disponible em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287152> >.

HUNTER, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. Academic press, 2013. ISBN 1483214087.

ISRAELACHVILI, J.; MARČELJA, S.; HORN, R. G. Physical principles of membrane organization. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 13, n. 2, p. 121-200, 1980. ISSN 1469-8994.

IVERSEN, T.-G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, v. 6, n. 2, p. 176-185, 2011. ISSN 1748-0132.

JULIETA, F. R. M. et al. Lipid-polymer membranes as carriers for L-tryptophan: molecular and metabolic properties. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 31, 2013. ISSN 2164-3121.

JUNGHANNS, J.-U. A.; MÜLLER, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **International journal of nanomedicine**, v. 3, n. 3, p. 295, 2008.

KANNAN, V. et al. Effect of sucrose as a lyoprotectant on the integrity of paclitaxel-loaded liposomes during lyophilization. **Journal of liposome research**, v. 25, n. 4, p. 270-278, 2015. ISSN 0898-2104.

KIM, J. A. et al. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. **Nature nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 62, 2012. ISSN 1748-3395.

KIRBY, B. J.; HASSELBRINK JR, E. F. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. **Electrophoresis**, v. 25, n. 2, p. 187-202, 2004. ISSN 0173-0835.

KOVAČIČ, B.; VREČER, F.; PLANINŠEK, O. Spherical crystallization of drugs. **Acta pharmaceutica**, v. 62, n. 1, p. 1-14, 2012. ISSN 1330-0075.

KROPF, S. P. Carlos Chagas e os debates e controvérsias sobre a doença do Brasil (1909-1923). **Oswaldo Cruz**, RJ-Brasil, v. 16, p. 205-207, 2008.

LAOUINI, A. et al. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. **Journal of colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147-168, 2012. ISSN 2164-9634.

LIAN, T.; HO, R. J. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 90, n. 6, p. 667-680, 2001. ISSN 0022-3549.

LOPES, M. A. et al. Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials**, v. 45, n. 4, p. 370-375, 1999. ISSN 0021-9304.

LUK, B. T.; ZHANG, L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 600-607, 2015. ISSN 0168-3659.

MACEDO, A. M. et al. Trypanosoma cruzi: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1-12, Feb 2004. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057339> >.

MAHANTY, S. et al. Particle design of drugs by spherical crystallization techniques. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 912-918, 2010.

MAO, Z.; ZHOU, X.; GAO, C. Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 9, p. 896-911, 2013.

MARÍN, C. et al. In vitro activity of scorpiand-like azamacrocyclic derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of Leishmania infantum and Leishmania braziliensis. **European journal of medicinal chemistry**, v. 62, p. 466-477, 2013. ISSN 0223-5234.

MARÍN, C. et al. Effective anti-leishmanial activity of minimalist squaramide-based compounds. **Exp Parasitol**, v. 170, p. 36-49, 2016a. ISSN 0014-4894. _____. Effective anti-leishmanial activity of minimalist squaramide-based compounds. **Experimental Parasitology**, v. 170, p. 36-49, 2016b. ISSN 0014-4894.

MCNAMARA, R. K. et al. Selective deficits in erythrocyte docosahexaenoic acid composition in adult patients with bipolar disorder and major depressive disorder. **Journal of affective disorders**, v. 126, n. 1-2, p. 303-311, 2010. ISSN 0165-0327.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 401-4, 1999. ISSN 0074-0276 (Print) 0074-0276 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677765> >.

MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against Trypanosoma cruzi: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific reports**, v. 4, p. 4703, 2014. ISSN 2045-2322.

MOSCHETTA, M. et al. Novel targeting of phospho-cMET overcomes drug resistance and induces antitumor activity in multiple myeloma. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 16, p. 4371-82, Aug 15 2013. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804425> >.

NOGUEIRA, E. et al. Design of liposomal formulations for cell targeting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 514-526, 2015. ISSN 0927-7765.

NZAI, J.; PROCTOR, A. Determination of phospholipids in vegetable oil by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 10, p. 1281-1289, 1998. ISSN 0003-021X.

OLMO, F. et al. Synthetic single and double aza-scorpian macrocycles acting as inhibitors of the antioxidant enzymes iron superoxide dismutase and trypanothione reductase in *Trypanosoma cruzi* with promising results in a murine model. **RSC Advances**, v. 4, n. 110, p. 65108-65120, 2014.

OLMO, F. et al. Specific primers design based on the superoxide dismutase b gene for *Trypanosoma cruzi* as a screening tool: validation method using strains from Colombia classified according to their discrete typing unit. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, n. 11, p. 854-9, 2014. ISSN 2352-4146.

OLMO, F. et al. Prospects of an alternative treatment against *Trypanosoma cruzi* based on abietic acid derivatives show promising results in Balb/c mouse model. **European journal of medicinal chemistry**, v. 89, p. 683-690, 2015. ISSN 0223-5234.

OLMO, F. et al. Scorpian-like azamacrocycles prevent the chronic establishment of *Trypanosoma cruzi* in a murine model. **European journal of medicinal chemistry**, v. 70, p. 189-198, 2013. ISSN 0223-5234.

OLMO, F. et al. Synthesis and biological evaluation of N,N'-squaramides with high in vivo efficacy and low toxicity: toward a low-cost drug against Chagas disease. **J Med Chem**, v. 57, n. 3, p. 987-99, Feb 13 2014. ISSN 1520-4804 (Electronic) 0022-2623 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24410674> >.

ORGANIZATION, W. H. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases: executive summary**. World Health Organization. 2017

PACE, R. T.; BURG, K. J. L. Toxic effects of resazurin on cell cultures. **Cytotechnology**, v. 67, n. 1, p. 13-17, 2015. ISSN 0920-9069.

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and their applications in cancer therapy. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016. ISSN 1516-8913.

PARK, K. Facing the truth about nanotechnology in drug delivery. **ACS nano**, v. 7, n. 9, p. 7442-7447, 2013. ISSN 1936-0851.

PETROS, R. A.; DESIMONE, J. M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 8, p. 615-27, Aug 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616808> >.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect Dis**, p. 92-100, 2001.

RAMANA, L. N. et al. Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine. **Journal of biomedical science**, v. 17, n. 1, p. 57, 2010. ISSN 1423-0127.

RASSI, A.; DE REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012. ISSN 0891-5520.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152-158, 2009. ISSN 0074-0276.

REYES, L. Parásitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A**, 1991.

RODRIGUEZ, A. M. et al. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. **Z Parasitenkd**, v. 69, n. 2, p. 141-7, 1983. ISSN 0044-3255 (Print) 0044-3255 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6407226> >.

ROLÓN, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitol Res**, v. 99, n. 2, p. 103-107, 2006. ISSN 0932-0113.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 4-5, p. 576-88, Mar 18 2010. ISSN 1872-8294 (Electronic) 0169-409X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19941920> >.

ROTGER, C. et al. Efficient macrocyclization of preorganized palindromic oligosquaramides. **Angewandte Chemie**, v. 118, n. 41, p. 6998-7002, 2006. ISSN 0044-8249.

ROTGER, M. C. et al. Conformational preferences and self-template macrocyclization of squaramide-based foldable modules. **The Journal of organic chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2302-2308, 2004. ISSN 0022-3263.

ROY, B. et al. Influence of lipid composition, pH, and temperature on physicochemical properties of liposomes with curcumin as model drug. **Journal of oleo science**, v. 65, n. 5, p. 399-411, 2016. ISSN 1345-8957.

SAMPEDRO, A. et al. Cell uptake and localization studies of squaramide based fluorescent probes. **Bioconjugate chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1537-1546, 2014. ISSN 1043-1802.

SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. In vivo trypanosomicidal activity of imidazole-or pyrazole-based benzo [g] phthalazine derivatives against acute and chronic phases of Chagas disease. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 4, p. 970-979, 2011. ISSN 0022-2623.

SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of crystal growth**, v. 211, n. 1-4, p. 122-136, 2000. ISSN 0022-0248.

SOSNIK, A.; CHIAPPETTA, D. A.; CARCABOSO, Á. M. Drug delivery systems in HIV pharmacotherapy: what has been done and the challenges standing ahead. **Journal of Controlled Release**, v. 138, n. 1, p. 2-15, 2009. ISSN 0168-3659.

SOUZA, W. D. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89-100, 2009. ISSN 0074-0276.

STORER, R. I.; ACIRO, C.; JONES, L. H. Squaramides: physical properties, synthesis and applications. **Chem Soc Rev**, v. 40, n. 5, p. 2330-46, May 2011. ISSN 1460-4744 (Electronic) 0306-0012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21399835> >.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of clinical Investigation**, v. 118(4), p. 1301–1310, 2008.

TEIXEIRA, N.; GUIMARO, G.; SANTOS, B. Review: Chagas disease. **Chagas disease**, v. J;82, n. 788-789, 2006.

TEMPONE, A. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005. ISSN 0944-7113.

TOMÀS, S. et al. An Effective Fluorescent Sensor for Choline-Containing Phospholipids. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 15, p. 2208-2211, 1999. ISSN 1433-7851.

TOMLINSON, S. et al. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. **Parasitology**, v. 110, n. 5, p. 547-554, 1995. ISSN 1469-8161.

TONG, C. et al. Squaramide-based supramolecular materials for three-dimensional cell culture of human induced pluripotent stem cells and their derivatives. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 4, p. 1091-1099, 2018. ISSN 1525-7797.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 145, 2005. ISSN 1474-1784.

TYAGI, N.; GHOSH, P. C. Folate receptor mediated targeted delivery of ricin entrapped into sterically stabilized liposomes to human epidermoid carcinoma (KB) cells: effect of monensin intercalated into folate-tagged liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 343-353, 2011. ISSN 0928-0987.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 495-501, Nov 2003. ISSN 1471-4922 (Print) 1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580960> >.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p. 12-21, 2010. ISSN 1613-6829.

VIDEIRA, M. A.; ARRANJA, A. G.; GOUBEIA, L. F. Experimental design towards an optimal lipid nanosystem: a new opportunity for paclitaxel-based therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 2, p. 302-310, 2013. ISSN 0928-0987.

VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Growth of Isolated Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in Cell-Free Medium 1. **The Journal of protozoology**, v. 29, n. 4, p. 570-576, 1982. ISSN 0022-3921.

VILLANUEVA, A. et al. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. **Nanotechnology**, v. 20, n. 11, p. 115103, 2009. ISSN 0957-4484.

WHO. Commite on the Control of Chagas Disease 2012.

WILHELM, C. et al. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. **Langmuir**, v. 18, n. 21, p. 8148-8155, 2002. ISSN 0743-7463.

WIN, K. Y.; FENG, S.-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2713-2722, 2005. ISSN 0142-9612.

XIMENIS, M. et al. Kinetic Analysis and Mechanism of the Hydrolytic Degradation of Squaramides and Squaramic Acids. **The Journal of organic chemistry**, v. 82, n. 4, p. 2160-2170, 2017. ISSN 0022-3263.

YANDRAPATI, R. K. Effect of lipid composition on the physical properties of liposomes: a light scattering study. 2012.

YAZDANBAKHS, K.; LOMAS-FRANCIS, C.; REID, M. E. Blood groups and diseases associated with inherited abnormalities of the red blood cell membrane. **Transfusion medicine reviews**, v. 14, n. 4, p. 364-374, 2000. ISSN 0887-7963.

YUSUF, M. et al. Plausible antioxidant biomechanics and anticonvulsant pharmacological activity of brain-targeted β -carotene nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4311, 2012.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p.

1051-4, Nov 2009. ISSN 1678-8060 (Electronic) 0074-0276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>>.

ZINGALES, B. et al. Trypanosoma cruzi genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta tropica**, v. 68, n. 2, p. 159-173, 1997. ISSN 0001-706X.

ΤΖΑΝΕΤΟΠΟΥΛΟΣ, Π. **Διερεύνηση/μοντελοποίηση της κινητικής αποδέσμευσης υδατοδιαλυτών μορίων από μικρά μονοστοιβαδικά λιπосώματα**. 2014.