



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

Lucas Sales Queiroz

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CNICINA E SEUS COMPLEXOS DE
INCLUSÃO EM CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ESQUISTOSSOMICIDA**

**Juiz de Fora
2019**

Lucas Sales Queiroz

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CNICINA E SEUS COMPLEXOS DE
INCLUSÃO EM CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ESQUISTOSSOMICIDA**

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

Orientador: Prof. Dr Ademar Alves da Silva Filho

Co-orientador: Prof. Dr Ângelo Márcio Leite Denadai

**Juiz de Fora
2019**

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

Sales Queiroz, Lucas .

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA CNICINA E SEUS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EM CICLODEXTRINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA / Lucas Sales Queiroz. -- 2019.

134 p.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Coorientador: Ângelo Márcio Leite Denadai

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.

1. Centaurea benedicta L. (Asteraceae). 2. Esquistossomose mansônica. 3. Ciclodextrina. 4. Lactona sesquiterpênica. I. Alves da Silva Filho, Ademar, orient. II. Márcio Leite Denadai, Ângelo, coorient. III. Título.

"Isolamento e caracterização da cnicina e seus complexos de inclusão em clicodextrina e avaliação da atividade esquistossomicida"

Lucas Sales Queiroz

ORIENTADOR: Ademar Alves da Silva Filho

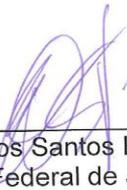
COORIENTADOR: Ângelo Márcio Leite Denadai

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

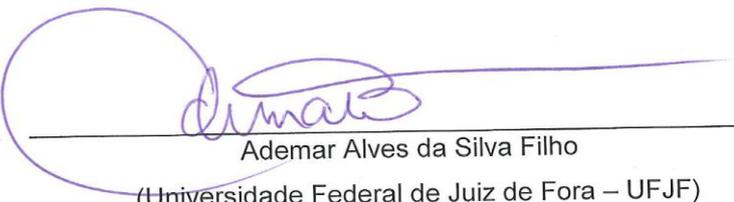
Aprovada em 31/07/2019



João Paulo Barreto de Sousa
(Universidade de Brasília – UnB)



Olavo dos Santos Pereira Junior
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)



Ademar Alves da Silva Filho
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Resumo

A esquistossomose, causada pelo parasito do gênero *Schistosoma*, está na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), sendo considerada como grave problema de saúde pública no mundo, principalmente no estado de Minas Gerais. No entanto, seu tratamento se baseia em um só fármaco, o praziquantel (PZQ), ineficaz contra as formas jovens do parasito e apresentando focos de resistência. A cnicina (Cn) é uma lactona sesquiterpênica, presente na espécie *Centaurea benedicta* (Asteraceae), que apresenta atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antitumoral e antimalárica. A associação dessa substância em complexos supramoleculares pode auxiliar na atividade diante de modelos biológicos, melhorando solubilidade, reduzindo toxicidade e biodisponibilidade. O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a atividade esquistossomicida da Cn e de seus complexos de inclusão em ciclodextrinas. Para isto, a cn foi isolada a partir do extrato de *C. benedicta* utilizando cromatografia líquida à pressão reduzida. Para caracterização da Cn pura foi realizado CLAE-DAD, CLUE-MS-Q-TOF, RMN ^1H , COSY e ^{13}C e DEPT. Os complexos de inclusão da Cn com β -ciclodextrina e HP β -ciclodextrina foram produzidos e caracterizados. A caracterização dos complexos Cn/ β CD e Cn/HP β CD foi feita por espectrometria de infravermelho (IV), titulação calorimétrica, espalhamento de luz dinâmico e valores de potencial zeta. Após a verificação da atividade esquistossomicida *in vitro* da Cn e o grau de citotoxicidade, a Cn e seus complexos de inclusão com β -ciclodextrina e HP β -ciclodextrina foram avaliados frente a atividade esquistossomicida *in vivo*, tanto por via intraperitoneal quanto por via oral. A Cn complexada com HP- β -ciclodextrina (Cn/HP β CD) apresentou o melhor resultado esquistossomicida *in vivo*, com 66 % de redução da carga parasitária por via intraperitoneal e 43 % de redução quando administrada por via oral. Os arranjos com Cn e ciclodextrinas (HP β CD e β CD) foram capazes de reduzir o número de ovos no oograma bem como o OPG (ovos por grama). A citotoxicidade adiante de células de mamíferos da Cn foi reduzida quando a mesma foi complexada em HP- β -ciclodextrina (Cn/HP β CD).

Palavras-chave: Esquistossomose, *Centaurea benedicta*, cnicina, ciclodextrina.

Abstract

Schistosomiasis, caused by bloodworms of the genus *Schistosoma*. It is included on the list of Neglected Tropical Diseases (NTDs), being considered as a relevant health problem in the world. Therefore, it directly affects Brazil, where the State of Minas Gerais shows the highest prevalence. Unfortunately, the treatment still relying on only one drug, praziquantel, which is ineffective against juvenile worms and relevant cases of emerging drug resistance has already been reported. Cnicin (Cn), a sesquiterpene lactone, present in the specie *Centaurea benedicta* (Asteraceae), has demonstrated large anti-inflammatory, anti-tumor and antimalarial activity. The association of cnicin with supramolecular assembly can aid in the activity against biological models, improving solubility, reducing toxicity and bioavailability. The general objective was to evaluate the schistosomicidal activity of cnicin and its inclusion complexes in cyclodextrins. Cnicin was isolated from extract of *C. benedicta* using liquid chromatography under reduced pressure. HPLC-DAD, UPLC-MS-Q-TOF, ¹H NMR, COSY and ¹³C and DEPT were performed to characterize cnicin. Cn / βCD and Cn / HPβCD complexes were chemically characterized by infrared (IR) spectrometry, calorimetric titration, dynamic light scattering and zeta potential values. After assessing *in vitro* schistosomicidal activity of cnicin, inclusion complexes with β-cyclodextrin (Cn /βCD) and HP-β-cyclodextrin (Cn/HPβCD) were tested against schistosomicidal activity *in vivo*, either intraperitoneally and orally. Cn when complexed with HP-β-cyclodextrin (Cn / HPβCD) showed the best *in vivo* result, 66 % worm burden reduction by I.P route and 43 % reduction when administered orally. Cnicin and cyclodextrins (HPβCD and βCD) were able to reduce the number of eggs in the oograma as well as OPG (eggs per gram). Cytotoxicity was also evaluated by MTT and Cn/HPβCD was able to decrease cnicin toxicity.

Key words: Schistosomiasis, *Centaurea benedicta*, cnicin, cyclodextrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo INPEG 2010/2015 .	15
Figura 2 – Foto por microscopia eletrônica de uma fêmea do verme <i>S. mansoni</i> no canal ginecóforo do macho	17
Figura 3 - Ciclo biológico da espécie <i>Schistosoma mansoni</i>	18
Figura 4 - Representação da fórmula estrutural do enantiômero R do Praziquantel	19
Figura 5 - Algumas substâncias naturais e derivados com atividade esquistossomicida	21
Figura 6 - Exemplo de grupo α -metileno- γ -lactona presente em LSTs.....	22
Figura 7 - Foto da espécie <i>C. benedicta</i> L. (Asteraceae)	23
Figura 8 - Estrutura química da cnicina	24
Figura 9 - Exemplos de sistemas supramoleculares e aplicações tecnológicas.....	27
Figura 10 - Esquema representativo de formação de nanopartículas supramoleculares	28
Figura 11 - Representação Estrutural das ciclodextrinas e unidade de glucopiranosose	30
Figura 12 - Estrutura tridimensional cônica da β -ciclodextrina.	31
Figura 13 - Estrutura da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD).....	35
Figura 14 - Modelo de penetração de um fármaco através da pele com auxílio de formulação aquosa de ciclodextrina	37
Figura 15 - Fluxograma geral dos ensaios de obtenção e caracterização da Cn, Cn/HP β CD e Cn/ β CD.....	44
Figura 16 - Cromatografia Líquida a Vácuo realizada durante o processo de separação.....	48

Figura 17- Esquema de isolamento da cnicina a partir do lavado de <i>C. benedicta</i> ..	49
Figura 18 - Esquema de preparo do complexo de Inclusão	52
Figura 19 - Esquema de preparo da mistura mecânica (MM).....	52
Figura 20 - Esquema de obtenção do espectro de Infravermelho	53
Figura 21- Esquema representativo de um Microcalorímetro para análise VP-ITC..	54
Figura 22 - Cromatograma e espectro de massas do extrato de <i>C. benedicta</i> evidenciando a cnicina	63
Figura 23 - Cromatograma e espectro de massas do extrato de <i>C. benedicta</i> evidenciando a cnicina	64
Figura 24 - Frações obtidas após separação por coluna cromatográfica a vácuo....	66
Figura 25 - Precipitado formado no balão após rotaevaporação e filtrado	67
Figura 26- Frascos contendo cnicina ao final do processo.....	67
Figura 27 - Cromatograma da fração isolada do extrato de <i>C. benedicta</i>	68
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina.....	71
Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina a) 5,68 – 6,24 ppm b) 5,30 – 4,30 ppm c) 4,10 – 3,45 ppm d) 1,44-2,55 ppm	72
Figura 30- Mapa de contorno COSY de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina.....	73
Figura 31 - Expansão do mapa de contorno COSY modo stacked plot de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina, região de 3,80 ppm a 4,12 ppm	75
Figura 32 - Expansão do mapa de contorno COSY de RMN de ^1H (500 MHz) da cnicina	76
Figura 33 - Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz) da Cnicina	78
Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT (125 MHz) da Cnicina.....	79
Figura 35 - Espectro de infravermelho da cnicina (Cn), βCD , Cn/ βCD e Mistura mecânica de cnicina e βCD	83

Figura 36 - Espectro de infravermelho da cnicina (Cn), HP β CD, Cn/HP β CD e Mistura mecânica de cnicina e HP β CD	84
Figura 37 - Titulação isotérmica calorimétrica de cnicina em β CD e HP β CD	85
Figura 38 - Dados da condutividade frente a cnicina livre, cnicina/ β CD e cnicina/HP β CD em meio aquoso em função da concentração.....	87
Figura 39 - Distribuição dos valores de PZ de cnicina (Cn) e cnicina/ β CD em função da concentração	89
Figura 40 - Distribuição dos valores de PZ de cnicina (Cn) e cnicina/HP β CD em função da concentração	89
Figura 41 - Modelo da equação de Stokes-Einstein	90
Figura 42 - Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de cnicina (Cn) e Cn/ β CD em função da concentração.	91
Figura 43 - Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de cnicina (Cn) e Cn/HP β CD em função da concentração.....	91
Figura 44 - Análise quantitativa do número de ovos para os diferentes tratamentos por via oral.....	104
Figura 45 - Análise quantitativa do número de ovos para os diferentes tratamentos por via intraperitoneal.....	106
Figura 46 - Efeito do tratamento por via I.P com Cn, Cn/ β CD e Cn/HP β CD sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose	109
Figura 47 - Efeito do tratamento por via oral com Cn, Cn/ β CD e Cn/HP β CD sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Algumas doenças tropicais negligenciadas listadas pela OMS	14
Tabela 2 - Inquérito para esquistossomose mansoni no Brasil de 2010/2015	16
Tabela 3 - Características das principais ciclodextrinas naturais	31
Tabela 4 - Gradiente utilizado durante a análise por CLUE-MS-Q-TOF	46
Tabela 5 - Esquema de CLV aplicada ao extrato de <i>C. benedicta</i>	47
Tabela 6 - Gradiente de eluição em CLAE	50
Tabela 7 - Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via oral.....	60
Tabela 8 - Disposição dos animais nos grupos experimentais e respectivos tratamentos via intraperitoneal	61
Tabela 9 - Fragmentos gerados pela cnicina no modo positivo e negativo	65
Tabela 10 - Deslocamentos químicos δ (ppm) observados e calculados da cnicina	74
Tabela 11 - Deslocamentos químicos δ (ppm) observados e calculados da Cnicina	80
Tabela 12 - Ensaio de citotoxicidade in vitro da cnicina e dos respectivos complexos de inclusão cn/ β CD e cn/HP β CD frente a macrófagos murinos.	93
Tabela 13 - Resultados da atividade contra <i>S. mansoni</i> do extrato de Cardo Santo (<i>C. benedicta</i>).....	94
Tabela 14 - Atividade esquistossomicida in vitro da cnicina	96
Tabela 15 - Recuperação de vermes após tratamento via intraperitoneal	98
Tabela 16 - Recuperação de vermes após tratamento via oral.....	100
Tabela 17 - Quantificação de ovos após tratamento via oral	104
Tabela 18 - Quantificação de ovos após tratamento via intraperitoneal	106
Tabela 19 - Porcentagem de redução do peso de fígado e baço por via IP e oral de administração.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV – Cromatografia Líquida à pressão reduzida.
DAD – Detector de Arranjo de Diodo
DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DLS - *Dynamic Light Scattering*
DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
TMS- Tetrametilsilano
DMSO-d₆- Dimetilsulfóxido deuterado
IAL - Instituto Adolfo Lutz
NIPPAN - Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais
NUPEP - Núcleo de pesquisas em parasitologia
βCD- beta ciclodextrinas
HPβCD- hidroxipropil-beta-ciclodextrina
Cn- Cnicina
Cn/βCD- Cnicina/ beta-ciclodextrina
Cn/HPβCD- Cnicina/ hidroxipropil-beta-ciclodextrina
OMS - Organização Mundial de Saúde
PZQ – Praziquantel
Rf - Fator de Retenção
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H – Ressonância Magnética de Hidrogênio
RMN ¹C – Ressonância Magnética de Carbono
COSY- *Homonuclear Correlation Spectroscopy*
DEPT- *Distortion-less Enhancement by Polarization Transfer*
UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ESQUISTOSSOMOSE.....	14
1.2 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	16
1.2.1 <i>Schistosoma mansoni</i>	16
1.2.2. Tratamento	19
1.2.3 Produtos naturais com atividade antiparasitária	20
1.3 A ESPÉCIE <i>Centaurea benedicta</i> L. (Asteraceae).....	22
1.3.1 Cnicina	24
1.4 COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES	26
1.5 CICLODEXTRINAS.....	29
1.5.1 Estrutura química das ciclodextrinas naturais e o uso da hidroxipropil-beta-ciclodextrina	30
1.5.2 Estabilidade e toxicidade das ciclodextrinas	35
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	45
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>Centaurea benedicta</i> PELO MÉTODO DE LAVAGEM FOLIAR.....	45
3.2.1 Identificação química da Cnicina no extrato de <i>C. benedicta</i> por CLUE-MS-Q-TOF	45
3.2.2 Isolamento da cnicina	47
3.2.3 Análise do precipitado obtido no processo de isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	50
3.3 IDENTIFICAÇÃO DA CNICINA.....	50

3.4 PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA E CNICINA	51
3.4.1 Preparo das misturas mecânicas	52
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO	53
3.5.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	53
3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO/SUSPENSÃO	53
3.6.1 Titulação calorimétrica isotérmica	53
3.6.2 Análise por Condutividade elétrica, Espalhamento de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ZP).....	54
3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO.....	55
3.8 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i>	56
3.8.1 Linhagem do <i>S. mansoni</i> e animais hospedeiros utilizados	56
3.8.2 Manutenção do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>.....	57
3.8.3 Preparo das amostras para ensaio	57
3.8.4 Ensaios <i>in vitro</i> com vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	58
3.9 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>	58
3.9.1 Manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> para ensaio <i>in vivo</i>. ...	59
3.9.2 Preparo das amostras para ensaio <i>in vivo</i>	59
3.9.3. Grupos experimentais de animais com administração por via oral...59	59
3.9.4 Grupos experimentais de animais com administração via intraperitoneal.....	60
3.9.5 Oograma	61
3.9.6 Análises estatísticas	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 IDENTIFICAÇÃO DA CNICINA NO EXTRATO DE <i>C. benedicta</i> POR CLUE-MS-Q-TOF	62

4.2 ISOLAMENTO DA CNICINA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	66
4.2.1 Caracterização da cnicina por RMN ¹H e ¹³C.....	68
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO FORMADOS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (IV).....	81
4.3.1 Análise no estado sólido.....	81
4.4- TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA (ITC).....	84
4.5 ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP).....	86
4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO.....	92
4.7 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA.....	93
4.8 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>	98
4.8.1 Análise de Oograma	102
4.8.2 Avaliação do peso médio dos fígados e baços dos animais após tratamento	107
5. CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

AGRADECIMENTOS

Dizer “obrigado” seria simples e injusto demais diante de toda ajuda, confiança e principalmente amor que recebi. Por isso, além de agradecer eu gostaria de dizer contem comigo. Primeiramente a Deus, conte comigo na missão de levar o bem e buscar fazer aquilo que o senhor nos ensinou, levando principalmente o AMOR a cada pessoa.

Aos meus pais, Isaías Sales dos Reis e Magda Queiroz Moreira Sales, contem comigo, pois eu sei que para chegar até aqui os senhores se sacrificaram e se doaram para que eu pudesse vencer. Obrigado pai por proporcionar tudo que eu precisei para focar nos meus estudos, você é um exemplo de superação para mim!

Em especial, mãe, você lutou muito para que eu me levantasse da cama, todos os dias e fosse para a escola, obrigado por não desistir do seu filho teimoso, te amo!

Minha irmã, Elza Sales Queiroz, sua garra, inteligência e dedicação me inspiram sempre, você é meu exemplo de superação e força de vontade, obrigado!

Ao Professor Dr. Ademar A. Da Silva Filho, não sei nem como agradecer, acho que se fosse eu no seu lugar teria perdido a paciência algumas vezes, com tanta teimosia, tanta ideia perdida e viajada, nomes em documentos trocados, computador que não corrigia os textos...erros e erros... mas também, por outro lado, o papo era sempre muito bom, quantas vezes cheguei desanimado e depois de uma simples conversa me sentia animado com a pesquisa novamente, a gente também riu bastante, jogou muito papo fora, sempre aprendendo alguma coisa nova...acho que você nunca vai saber o tanto que me ensinou.

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

A professora Dra Priscila de Faria Pinto, por todos os conselhos e orientações, por estar presente em toda minha vida acadêmica. Você é realmente uma referência muito importante para mim, obrigado pelo carinho e amizade de sempre!

A professora Dra. Mara Rubia Costa Couri, por toda atenção e disponibilidade, além da excelente e admirável didática, sempre muito acessível e disposta a ajudar.

Ao professor Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai, por toda disponibilidade e paciência em explicar os mais complexos temas sobre nanopartículas e física! Além da ótima recepção em sua casa, Governador Valadares.

Agradeço a todos do grupo NIPPAN que contribuíram diretamente ou indiretamente para esse trabalho, Lorena, Lara, Livia, Mirela, Bia, Renato, Igor, Ohana, Lauriene, Ismael, Marcela e Monique...ah Allan!

Everton, mais conhecido como Allan ou fotógrafo? Artista? Farmacêutico? Sem você esse mestrado não saía meu amigo, lembrar de você me faz sorrir e isso já vale mais que qualquer palavra, acho que essa é a marca que deixamos por onde vamos, sempre juntos, sempre rindo da vida...vou sentir saudades de tudo isso, mas fico feliz que acabou, e eu ganhei um irmão, para sempre!

Priscila, obrigado por ser minha válvula de escape, morada do meu sorriso, não vou esquecer todo apoio que me proporcionou corrigindo minha dissertação, estudando juntos até tarde, além de compreender minhas doideiras e principalmente acreditar em mim...cada momento foi muito importante, obrigado por fazer sempre questão!

À FAPEMIG (Processo: PPM 00296-16), UFJF, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro deste projeto.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE

Esquistossomose, conhecida popularmente como barriga d'água, é uma doença crônica e de grande prevalência entre as parasitoses. Dentre as espécies de *Schistosoma* que causam esta parasitose, temos o *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e o *S. haematobium* (LEOW et al., 2015). No Brasil, o *S. mansoni* é a única espécie, sendo o molusco de água doce *Biomphalaria glabrata* o principal e o mais importante hospedeiro intermediário da doença. Alguns fatores ambientais favorecem o desenvolvimento do ciclo da doença, como ocupação humana irregular e contaminação por excrementos das águas de rios e lagos (MELO & COELHO, 2005; GRYSEELS & STRICKLAND, 2012).

A esquistossomose está inserida no grupo das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (Tabela 1) listadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2017b). Estimativas demonstram que pelo menos 220,8 milhões de pessoas requeriam tratamento no ano de 2017, sendo que, neste ano, 102,3 milhões de pessoas foram tratadas contra a doença. Casos de transmissão da doença foram reportados em 78 países, no entanto, a quimioterapia preventiva é requerida em 52 países endêmicos, onde a transmissão da doença apresenta um quadro alto a moderado (WHO, 2019).

Tabela 1 - Algumas doenças tropicais negligenciadas listadas pela OMS

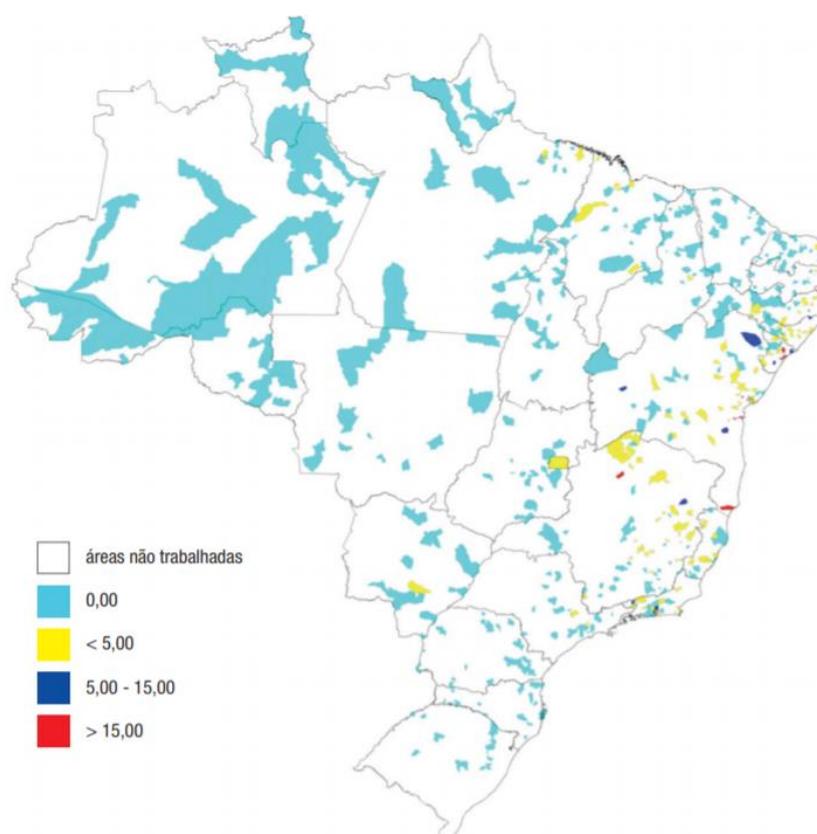
Doenças Tropicais Negligenciadas		
Dengue	Leishmaniose	Raiva
Tracoma	Cisticercose	Filariose linfática
Doença de Chagas	Equinococose	Hanseníase
Treponematoses endêmicas	Esquistossomose	Oncocercose
Micetoma, cromoblatomicose e outras micoses	Úlcera de Buruli (infecção por <i>Mycobacterium ulcerans</i>)	

Fonte: WHO, 2017b.

Na América do Sul, a esquistossomose encontra-se em alguns países como Venezuela, Antilhas, Suriname, Porto Rico e Brasil. Estudos recentes, realizados por Naftale Katz, através do inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses, relatam a situação epidemiológica atual da doença. O

estudo trata-se de um corte transversal de base populacional realizado em escolares de 7 a 17 anos de idade por todo território nacional (Figura 1). O estudo revela que as macrorregiões Nordeste e Sudeste apresentam os maiores índices de positividade para a esquistossomose. Dentre os estados, podemos destacar Minas Gerais com 5,81 % de positividade e Sergipe com 10,67 % (KATZ, 2018). Para este trabalho foram analisados 521 municípios ou 96,1 % do planejado. Nas áreas endêmicas, a proporção de positivos para o país foi de 0,27 % nos municípios com mais de 500.000 habitantes, o que equivale aproximadamente a 1.350 indivíduos. Nos municípios com menos de 500.000 habitantes, essa porcentagem foi maior, cerca de 3,28 %. Os estados que mostravam uma maior proporção de quadros positivos estão listados a seguir em ordem decrescente, Sergipe (8,19 %), Minas Gerais (3,86 %), Alagoas (2,31 %), Bahia (2,19 %), Pernambuco (2,14 %) e Rio de Janeiro (1,65%). Abaixo de 1,0 %, pela ordem, Espírito Santo (0,71%), Mato Grosso do Sul (0,19 %), Paraíba (0,18 %), Maranhão (0,13 %), São Paulo (0,04 %), sendo Pará, Rio Grande do Norte e Distrito Federal 0,02% cada.

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo INPEG 2010/2015



Fonte: INPEG 2010/2015; KATZ, 2018.

Na tabela 2, é possível perceber a prevalência da parasitose entre os anos de 2010 a 2015. Se comparado com resultados de inquéritos anteriores, é possível perceber uma redução na prevalência da doença no país, que se deve à urbanização de um modo geral. Alguns fatores importantes da redução da prevalência são: instalação de redes de esgoto e tratamento de água. Implementação de métodos de tratamento específicos que vêm sendo realizados há alguns anos no Brasil, principalmente, por políticas de orientação à população sobre cuidados e higiene (KATZ, 2018).

Tabela 2 - Inquérito para esquistossomose mansoni no Brasil de 2010/2015

Estados	INPEG (2010/2015)	
	Nº examinados	% para <i>S. mansoni</i>
Maranhão	9.214	0,13
Piauí	7.004	0,001
Ceará	8.533	0,00
R. G. do Norte	8.918	0,02
Paraíba	8.415	0,18
Pernambuco	19.025	2,14
Alagoas	11.813	2,31
Sergipe	10.302	8,19
Bahia	28.382	2,19
Espirito Santo	6.554	0,71
Minas Gerais	26.689	3,86
Total Geral	147.849	1,79

Fonte: Adaptado de INPEG 2010/2015; KATZ, 2018.

Mesmo com uma redução da prevalência da esquistossomose, a taxa de positividade ainda se encontra elevada para alguns estados brasileiros, indicando a necessidade de intervenção com medidas de controle mais efetivas bem como a busca por novos esquemas de tratamento.

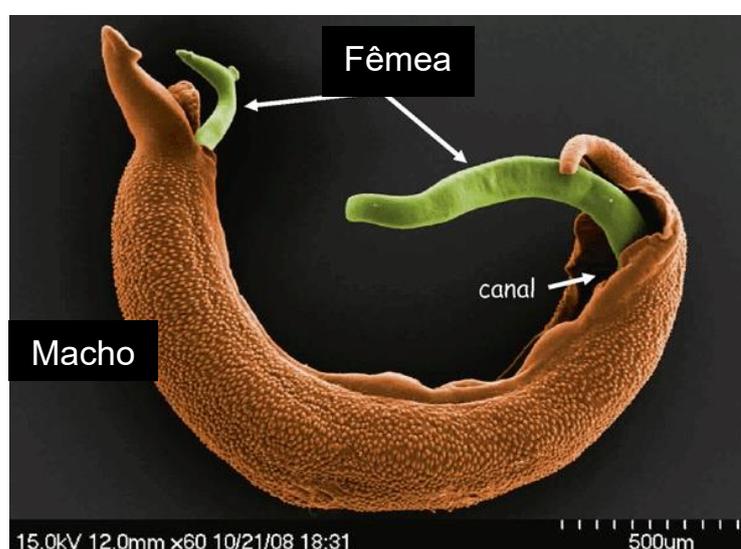
1.2 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

1.2.1 *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni*, causador da esquistossomose mansônica, é pertencente à classe Trematoda e família Schistosomatidae. Apresentam-se como vermes

delgados e dioicos, alimentando-se do sangue do hospedeiro e chegam a consumir até 300 mil hemácias por hora. No corpo do hospedeiro, esses parasitos são geralmente encontrados acasalados, estando a fêmea alocada no canal ginecóforo do macho (Figura 2). Eles podem ser comumente encontrados nos vasos mesentéricos, no sistema porta e ainda nos pulmões, baço, pâncreas e bexiga (SOUZA et al., 2011; GRYSEELS & STRICKLAND, 2012; SILVA, 2018).

Figura 2 – Foto por microscopia eletrônica de uma fêmea do verme *S. mansoni* no canal ginecóforo do macho



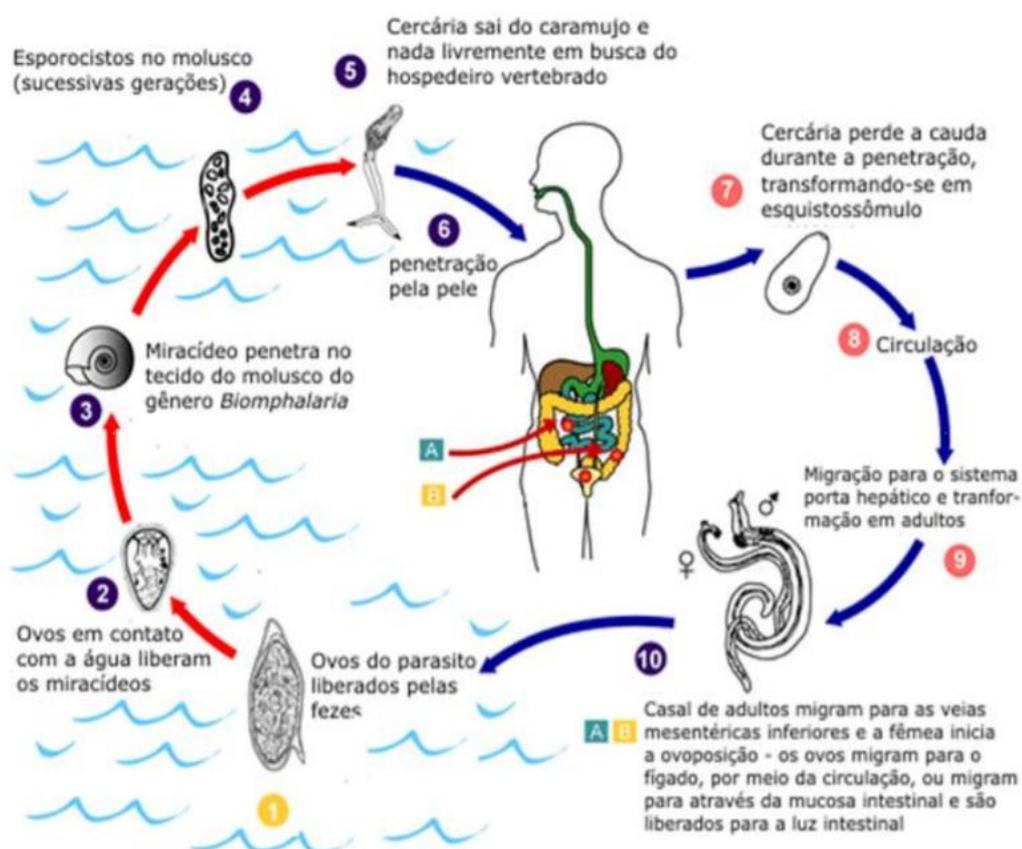
Fonte: Adaptado de CHEVILLON et al., 2012.

O *Schistosoma* possui ciclo de vida heteroxênico, alternando entre as fases sexuadas e assexuadas, e tendo a necessidade de mais de um hospedeiro para que o ciclo se complete (SKELLY, 2015). É, no hospedeiro definitivo, que o parasito alcança sua forma adulta, ocorrendo a cópula, em que a fêmea será então fecundada. Após a fecundação, as fêmeas migram contra a corrente sanguínea e iniciam a postura dos ovos na submucosa da parede intestinal do hospedeiro. Em aproximadamente seis dias, os ovos tornam-se maduros, contendo a larva miracídio já formada (SOUZA, 2011). Em até 20 dias, chegam à luz intestinal, podendo ser eliminados pelo hospedeiro através do bolo fecal que, ao alcançarem a água doce de rios, podem contaminar o ambiente. Condições ideais, como altas temperaturas, luminosidade e boa oxigenação das águas, facilitam a eclosão da larva miracídio

dos ovos que irão infectar os caramujos do gênero *Biomphalaria* (PORDEUS, et al., 2008).

Nos caramujos, as larvas transformam-se em esporocistos primários que, ao se multiplicarem através da poliembrionia, darão origem às cercárias por reprodução assexuada após 3 a 5 semanas (SOUZA, 2011; GRYSSELS & STRICKLAND, 2012). As cercárias liberam-se dos caramujos e penetram ativamente na pele do ser humano (hospedeiro definitivo) durante o contato com águas contaminadas. Uma vez no sistema porta hepático, desenvolvem-se em machos e fêmeas, amadurecem, acasalam-se e migram para veias mesentéricas inferiores, onde ocorrerá a ovoposição (MELO & COELHO, 2005). Os primeiros ovos serão eliminados pelo hospedeiro definitivo 40 dias após a infecção (Figura 3), completando, assim, o ciclo do parasito (SOUZA, 2011).

Figura 3 - Ciclo biológico da espécie *Schistosoma mansoni*



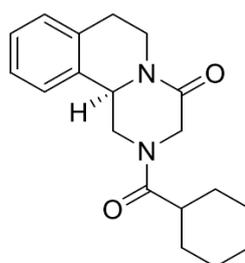
Fonte: CVE, 2005.

1.2.2. Tratamento

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a farmacoterapia como principal forma de tratamento e controle da esquistossomose (WHO, 2006). Inicialmente, o tratamento era feito com fármacos antimoniais, os quais possuem intensos efeitos adversos, como a trombocitopenia. Posteriormente, adotou-se o uso da mistura racêmica do praziquantel (PZQ) e o uso da oxaminiquina para o tratamento da doença. Entretanto, a oxaminiquina possui custo muito elevado, causa vários efeitos, principalmente no sistema nervoso central, além de apresentar efeitos carcinogênicos e atuar somente contra o *S. mansoni* (SILVA, 2018). A quimioterapia com PZQ (Figura 4), um fármaco que foi desenvolvido na década de 1970, surgiu como a principal alternativa no tratamento da esquistossomose (VALENTIM et al., 2013; CIOLI et al., 2014; LAGO et al., 2017).

Atualmente, o PZQ é o único fármaco de escolha, sendo comercializado como uma mistura racêmica de enantiômeros *R* e *S*, sendo apenas o isômero *R* ativo (MEISTER et al., 2014).

Figura 4 - Representação da fórmula estrutural do enantiômero *R* do Praziquantel



Fonte: Autor, 2018.

O PZQ é conhecido por atuar promovendo imobilidade muscular dos parasitos, devido à inibição da despolarização de membrana e lesões tegumentares nos vermes adultos, facilitando a atuação do sistema imune do hospedeiro (NEVES, 2004; GRYSEELS & STRICKLAND, 2012). Recentemente, um novo mecanismo de ação para o PZQ foi proposto por Chan (2017), em que o fármaco atuaria tanto no hospedeiro quanto no verme, através da ligação a receptores acoplados à proteína G. Assim o PZQ atuaria como agonista dos receptores serotoninérgicos 5HT_{2B}

humano, o que regularia o tônus muscular dos vasos sanguíneos na região do mesentério, local onde encontra-se os vermes, provocando o “deslocamento hepático” do verme para o fígado, através de contrações que promoveriam sua eliminação. Em resumo, seu mecanismo de ação seria uma combinação do efeito paralítico deletério nos vermes adultos auxiliado aos benefícios de contração e eliminação dos vasos sanguíneos humanos (MAGNUSSEN, 2003; CHAN et al., 2017).

Assim, como o ocorrido com a oxaminiquina, já foram relatados casos de linhagens resistentes frente ao PZQ, além desse não apresentar efetividade contra as formas jovens do parasito. Devido aos efeitos adversos como náuseas, dores abdominais e tontura, a não adesão ao tratamento é algo comum entre os pacientes (VALENTIM et al., 2013; CIOLI et al., 2014).

Portanto, a busca por novos princípios ativos que solucionem as deficiências apresentadas pelo atual fármaco de escolha, faz-se necessário (UTZINGER et al., 2001). Ao longo da história, os produtos naturais vêm demonstrando seu potencial como fonte de inúmeras substâncias ativas no combate às diversas patologias e é possível que essa seja novamente a solução para combate à esquistossomose (DE MORAES, 2015; KEISER & UTZINGER, 2012).

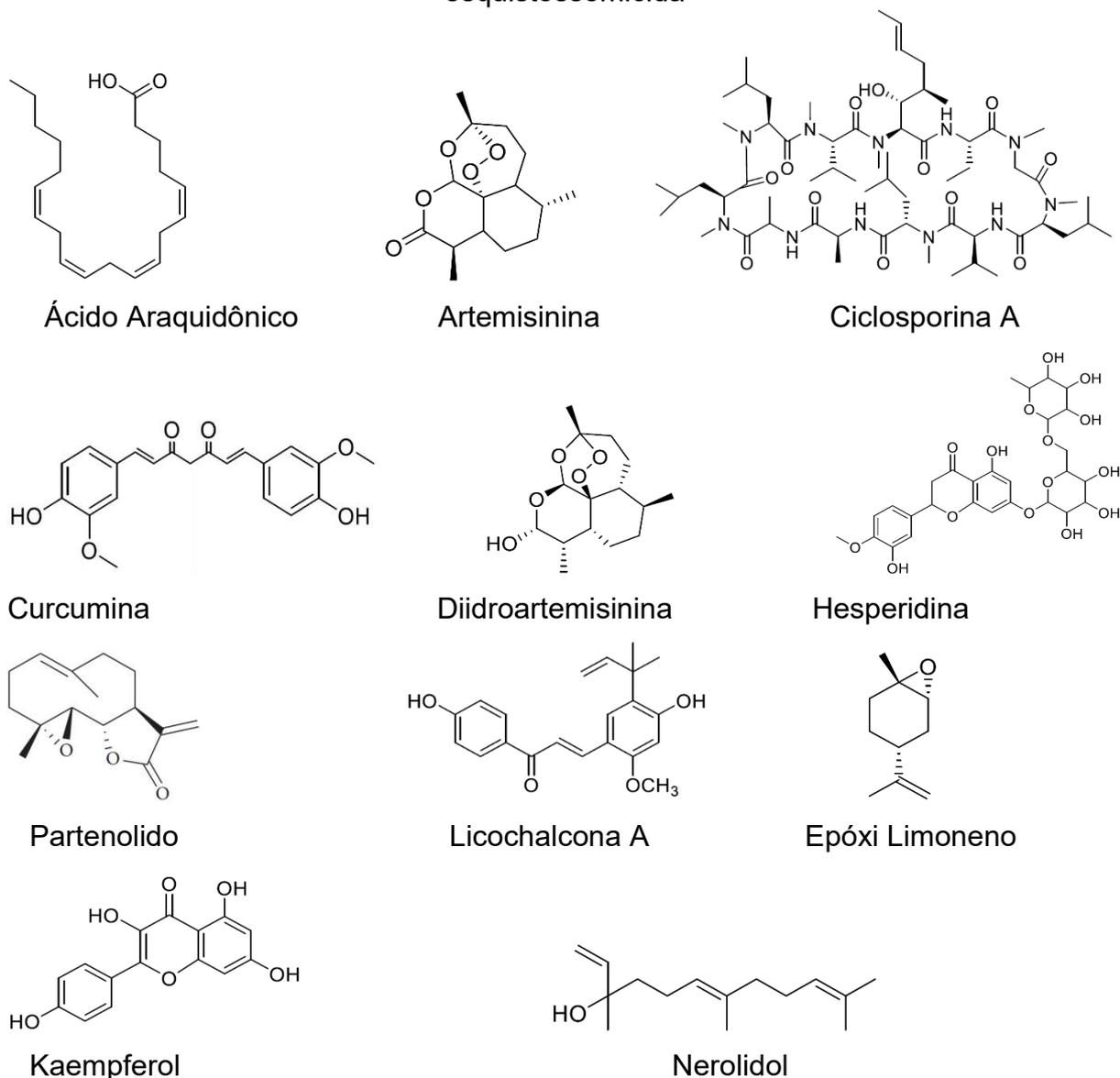
1.2.3 Produtos naturais com atividade antiparasitária

A descoberta de substâncias naturais, no combate a doenças, foi primeiramente descrita no início do século XIX e, a partir de então, a prática da exploração de fontes naturais, como as plantas, e a incessante busca por novos metabólitos se tornaram parte das ciências moleculares. Alguns exemplos marcantes que podemos citar da história dos metabólitos secundários são: atropina, aspirina, pilocarpina, tubocurarina, digoxina, vincristina, dentre outros. Além desses, no campo das doenças parasitárias, encontramos representantes das diversas classes de metabólitos como artemisinina (lactona sesquiterpênica) e quinina (alcaloide) (BUTLER, 2004; BARREIRO & BOLZANI, 2009; NEWMAN, CRAGG & KINGSTON, 2015).

Nesse contexto, os produtos naturais têm ganhado enorme destaque para a pesquisa de novos fármacos no controle e tratamento da esquistossomose. Na figura 5, a seguir, encontram-se alguns dos mais recentes e relevantes metabólitos

secundários com atividade esquistossomicida (LAGO et al., 2017). Dentre os compostos com atividade esquistossomicida, podemos destacar as lactonas sesquiterpênicas, como a artemisinina, diidroartemisinina e o partenolido (DE MORAES, 2015; KEISER & UTZINGER, 2012).

Figura 5 - Algumas substâncias naturais e derivados com atividade esquistossomicida



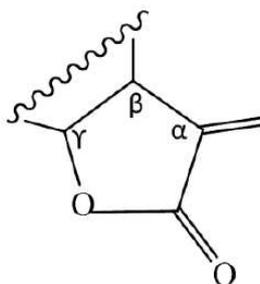
Fonte: Adaptado de DE MORAES, 2015; LAGO et al., 2017; SILVA, 2018.

As lactonas sesquiterpênicas (LSTs) são amplamente encontradas em exemplares da família Asteraceae. Esses metabólitos localizam-se em apêndices epidérmicos vegetais, conhecidos como tricomas, que possuem grande variação

quanto sua morfologia (JERBA & FERNANDES, 2004). De modo geral, as LSTs atuam como substâncias de defesa, afetando o crescimento de outras plantas e atraindo polinizadores (AMBRÓSIO et al., 2008; CHADWICK et al., 2013; PERASSOLO et al., 2018).

Nos relatos encontrados na literatura, correlacionando estrutura-atividade das LSTs, a atividade biológica dessas moléculas está normalmente associada à presença de grupos carbonílicos α,β -insaturados e, principalmente, ao grupo α -metileno- γ -lactona (Figura 6). Esses grupos são considerados potentes alquilantes e vão reagir como nucleófilos, em especial com grupos sulfidrilas de cisteínas presentes nas proteínas, através da reação de adição de Michael (DEWICK, 2009; ALVES, 2011). Em função dessa reatividade, as LSTs constituem substâncias com grande atividade terapêutica, apresentando potencial anti-inflamatório, antitumoral, antimicrobiana e antiparasitário, em específico esquistossomicida (MERFORT, 2002; KIM et al., 2006).

Figura 6 - Exemplo de grupo α -metileno- γ -lactona presente em LSTs



Fonte: RODRIGUEZ, TOWERS & MITCHELL, 1976.

1.3 A ESPÉCIE *Centaurea benedicta* L. (Asteraceae)

Atualmente, reconhecida como *Centaurea benedicta* L. ou *Cnicus benedictus* Linnaeus (Asteraceae), essa espécie medicinal é comumente chamada de Cardo Santo ou *Blessed Thistle* nos países de língua inglesa. Uma planta que atinge cerca de 70 cm de altura, considerada como planta anual, essa espécie apresenta várias estruturas botânicas na superfície de suas folhas, incluindo tricomas e espinhos, além de muitas brácteas espinhosas ao redor do topo da flor (Figura 7). Tal planta encontra-se bem distribuída por toda região do mediterrâneo da Europa, bem como a parte sul da África e toda a América do Sul. A origem do nome remonta diferentes

histórias, sendo a mais conhecida delas a que se refere a monges beneditinos que costumavam distribuir suas sementes pela Europa até as regiões do sul de Portugal, o que teria dado origem ao nome *Benedictus* (ULBRICHT et al, 2008; SPITELLER, 2009; PENG et al., 2017).

Figura 7 - Foto da espécie *C. benedicta* L. (Asteraceae)



Fonte: Autor, 2019.

O uso dessa espécie na medicina popular já é bem conhecido, principalmente das partes aéreas da planta, as quais são utilizadas na medicina tradicional indígena como tônico, antidepressivo, alívio estomacal, atividade anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiano, antiviral, antisséptico, dentre outras (DJAMILA et al., 2013; AL-SNAFI, 2016; GHIASY-OSKOEI et al., 2018). Além de ser usada na medicina popular, essa planta apresenta participação no desenvolvimento de formulação de cervejas e licores, principalmente devido às características amargas de algumas substâncias presentes, as quais podem aumentar o apetite e melhorar a digestão. O extrato etanólico de *C. benedictus* também apresenta atividade neuroprotetora, podendo ser estudado como uma opção ao tratamento de doenças

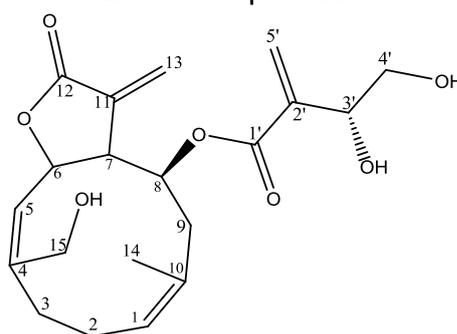
degenerativas, especialmente quando estresse oxidativo e atividade colinérgica estão envolvidas na hipótese por atuarem inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase e tirosinase (ULBRICHT et al., 2008; AL-SNAFI, 2016).

Na composição química desta espécie, há inúmeras classes de metabólitos secundários, especialmente de LSTs, como a cnicina, absintina, artemisifolina e salonitenolideo. A espécie ainda é rica em flavonoides, como a apigenina-7-O-glucosídeo, luteolina e astragalina, além de triterpenos como a α -amirina e acetato de α -amirina. Além desses, a planta também apresenta taninos, óleos essenciais, saponinas e alcaloides (SÓLYOMVÁRY et al., 2014; HORN et al., 2015; AL-SNAFI, 2016; CAN et al., 2017).

1.3.1 Cnicina

A cnicina (Cn) (Figura 8) é uma LST com anel γ -lactônico, sendo a principal substância responsável pelas características amargas da espécie *C. benedicta*. Essa LST, também encontrada em outras espécies do gênero *Centaurea*, como *C. maculosa* Lam, *C. pullata* L. e *C. jacea* L., apresenta inúmeras atividades farmacológicas, sendo uma das substâncias de maior relevância medicinal desse gênero (TEŠEVIĆ et al., 2007; GHIASY-OSKOEI et al., 2018).

Figura 8 - Estrutura química da cnicina



Fonte: Autor, 2018.

No âmbito das atividades biológicas da cnicina, essa demonstrou amplo espectro de inibição diante de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ILDIKO et al., 2009). Assim, por exemplo, a cnicina foi ativa diante de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina na concentração de 124 $\mu\text{g/mL}$ (BACH et al., 2011). Nesse sentido, a cnicina demonstrou ser um inibidor potente e irreversível da enzima

bacteriana enolpiruvil transferase (MurA), ligando-se covalentemente ao grupo tiol do aminoácido cisteína (Cis) 115 desta enzima, no qual ficou concluindo que a parte éster da cadeia lateral da estrutura química dessa substância está intimamente relacionada à inibição da enzima MurA (UDP-*N*-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferase) (BACHELIER, MAYER & KLEIN, 2006).

A cnicina também foi avaliada por sua atividade inibitória frente a células tumorais HeLa, MCF-7 e A431, apresentando moderada atividade antitumoral diante dessas linhagens. Mediante linhagens de células de câncer de mama MCF-7 e adenocarcinoma de próstata PC-3, a cnicina (isolada do extrato clorofórmico de *C. kilaea*) demonstrou ser uma molécula promissora, com CI_{50} de 3,25 e 4,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SEN, TURAN & BITIS, 2017). Além disso, a cnicina também apresentou atividade diante de células epiteliais de rim de porco (LLC-PK₁₁), melanoma maligno humano (SK-MEL), carcinoma ductal humano (BT-549), mostrando CI_{50} de 23,3, 14,0 e 18,3 μM , respectivamente (EREL et al., 2011). A molécula também apresenta atividade fitotóxica, inibindo o crescimento de raízes de algumas espécies de plantas, dentre elas a alface (KELSEY & LOCKEN, 1987).

A atividade anti-inflamatória da cnicina também foi avaliada mediante vários tipos celulares, com intuito de verificar a inibição de NF- κ B e inibição da indução da síntese de óxido nítrico e de espécie reativas de oxigênio. A cnicina mostrou inibição do NF- κ B e inibição da atividade da iNOS com valores IC_{50} de 1,8 μM e 6,5 μM , respectivamente (EREL et al., 2011).

A cnicina, juntamente com outras LTS, já foi avaliada diante do *Trypanosoma brucei*, o parasito responsável pela tripanossomíase humana africana, conhecida também como doença do sono. Para essa parasitose a substância demonstrou potente atividade inibitória (IC_{50} de 0,4 μM) diante do *Trypanosoma* (KURITA, 2016).

Contudo, devido à toxicidade apresentada pela cnicina, o uso dessa substância em modelos biológicos *in vivo* pode apresentar alguns riscos (JÖHRER et al., 2012). Dessa forma, considerando o potencial biológico dessa substância, o uso de uma estrutura ou formulação que possa promover a redução dessa toxicidade é de grande interesse farmacêutico. Além disso, a baixa solubilidade da molécula, bem como o pouco conhecimento sobre a farmacocinética e dinâmica da cnicina, quando administrada em modelos *in vivo* remetem a uma possível estratégia de formulação para esta molécula na busca de melhores resultados frente as possíveis atividades biológicas.

Dentre as estratégias promissoras, o uso de associações com outras moléculas que possam promover maior solubilidade e melhorias na atividade biológica, pode ser de grande valia. Dentre essa vasta possibilidade de arranjos moleculares, destacam-se os complexos supramoleculares por inclusão em ciclodextrinas. Esta associação com ciclodextrinas forma complexos nanoestruturados com facilidade, baixo custo relativo e é de fácil inclusão e aceitação em formulações devido, principalmente, à baixa toxicidade.

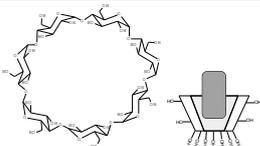
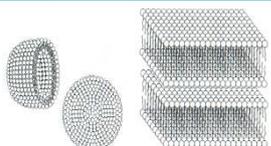
1.4 COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES

O estudo da química tem deixado de ser uma ciência de átomos isolados ou moléculas individuais e, assim, ganhado um campo muito mais amplo e de vasta aplicabilidade através do estudo de arranjos químicos e complexos formados pelo agrupamento de moléculas (DENADAI, 2005).

A química supramolecular é o ramo da ciência que irá estudar esses arranjos moleculares que são formados através de ligações não covalentes. O objetivo dessa ciência é entender as possíveis interações, tanto intra quanto intermoleculares e, através da previsão e caracterização desse processo, atribuir uma funcionalidade à nova estrutura resultante (ISRAELACHVILI, 1991; EVANS & WENNERSTROM, 1999; HALL, 2004; DENADAI, 2005).

A funcionalidade dessa formação foi fator decisivo para um estudo mais aprofundado dessa ciência, que ganhou seu espaço no final do século XIX, quando bioquímicos descobriram que a relação enzima substrato se dava através de ligações não covalentes e, posteriormente, através do estudo mais detalhado de células e organelas permitiu a descoberta de que, no meio biológico, as interações não covalentes desempenham papel fundamental nas funções bioquímicas (figura 9) (DENADAI, 2005).

Figura 9 - Exemplos de sistemas supramoleculares e aplicações tecnológicas

Sistema Supramolecular	Descoberta	Aplicação tecnológica
 Complexos enzimáticos	Século XVII	Reações bioquímicas, catálise, reconhecimento molecular.
 DNA e RNA	1953 e 1965 respectivamente	Armazenamento e transferência de informações.
 Ciclodextrinas e seus compostos de inclusão	1948	Encapsulamento molecular, liberação sustentada de fármacos, solubilização de materiais insolúveis em água, emulsificação, catálise, etc.
 Vesículas e bicamadas biológicas	Século XIX	Constituintes de membranas celulares ou sintéticas. Servem de barreira para difusão livre de moléculas. Permitem o encapsulamento de muitas substâncias ao mesmo tempo, como nas organelas celulares.

Fonte: Adaptado de DENADAI, 2005.

É interessante notar que a maioria dos sistemas supramoleculares são formados por alguma molécula anfifílica, formadas por partes hidrofílicas e hidrofóbicas, o que permite a formação de inúmeras interações intermoleculares (ISRAELACHVILI, 1991; DENADAI 2005), algumas delas são:

- Interações de curta distância: ligações de hidrogênio, interações dipolares (dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido, multipolos induzidos), interações eletrostáticas (íon-íon e íon-dipolo) (ISRAELACHVILI, 1991);
- Interações a longa distância, como efeitos de exclusão de volume que são responsáveis por modificações na estrutura do solvente e interações devido ao efeito hidrofóbico (ISRAELACHVILI, 1991).

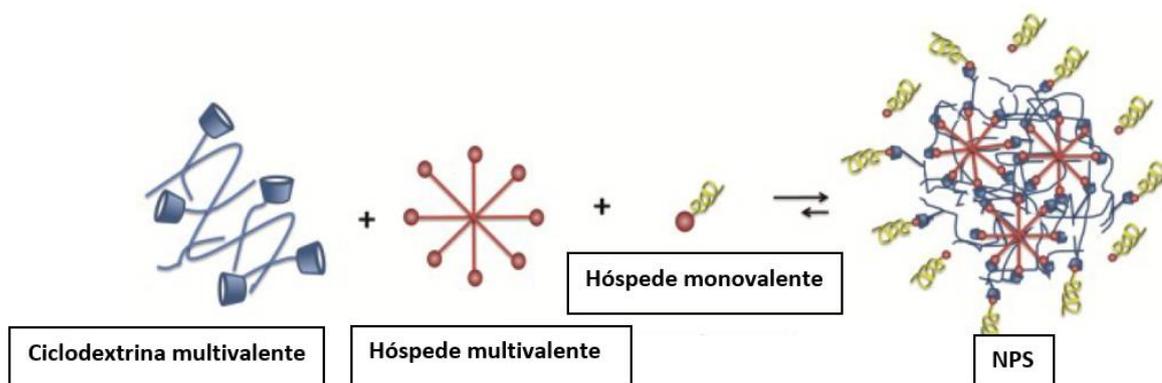
Para análise de todas as propriedades estruturais, termodinâmicas e funcionais desse sistema é necessário o uso de técnicas físico-químicas otimizadas.

Dentre essas técnicas termodinâmicas, podemos citar algumas como: calorimetria isotérmica de titulação – ITC, técnicas de equilíbrio de fases (como solubilidade e particionamento) e propriedades coligativas. Com relação às “técnicas espectroscópicas”, destaca-se a ressonância magnética nuclear – RMN e infravermelho (IR); “Técnicas de espalhamento de luz Rayleigh” e “microscopias” são fundamentais para a determinação do tamanho e forma de partículas bem como o potencial zeta dos complexos formados (DENADAI, 2005).

A ciência supramolecular, quando trazidas ao campo da nanotecnologia, forma as nanopartículas supramoleculares (NPS). O sistema NPS demonstra grande versatilidade por abordar tanto a estrutura hóspede-hospedeiro quando o conceito de multivalência das moléculas envolvidas (TOMIOTTO-POLLISSIER et al., 2017).

As características desse sistema fazem deles candidatos ideais para as novas tendências da biomedicina, devido à sua natureza multifuncional de permitir com que a carga no seu interior seja incorporada e liberada para o meio sem a necessidade de redesenvolvimento de todo o sistema. NPS, em resumo, são múltiplas cópias de “tijolos” de construção ligados por ligações não covalentes que resultam na montagem de “blocos de construção” ainda maiores. Um esquema representativo de formação das NPSs pode ser visto na figura 10, em que um sistema contendo ciclodextrina, um hóspede multivalente (Ad) e um agente monovalente para controlar o tamanho da partícula foram adicionados (DENADAI, 2005; MEJIA-ARIZA et al., 2013).

Figura 10 - Esquema representativo de formação de nanopartículas supramoleculares



Fonte: Adaptado de MEJIA-ARIZA et al., 2013.

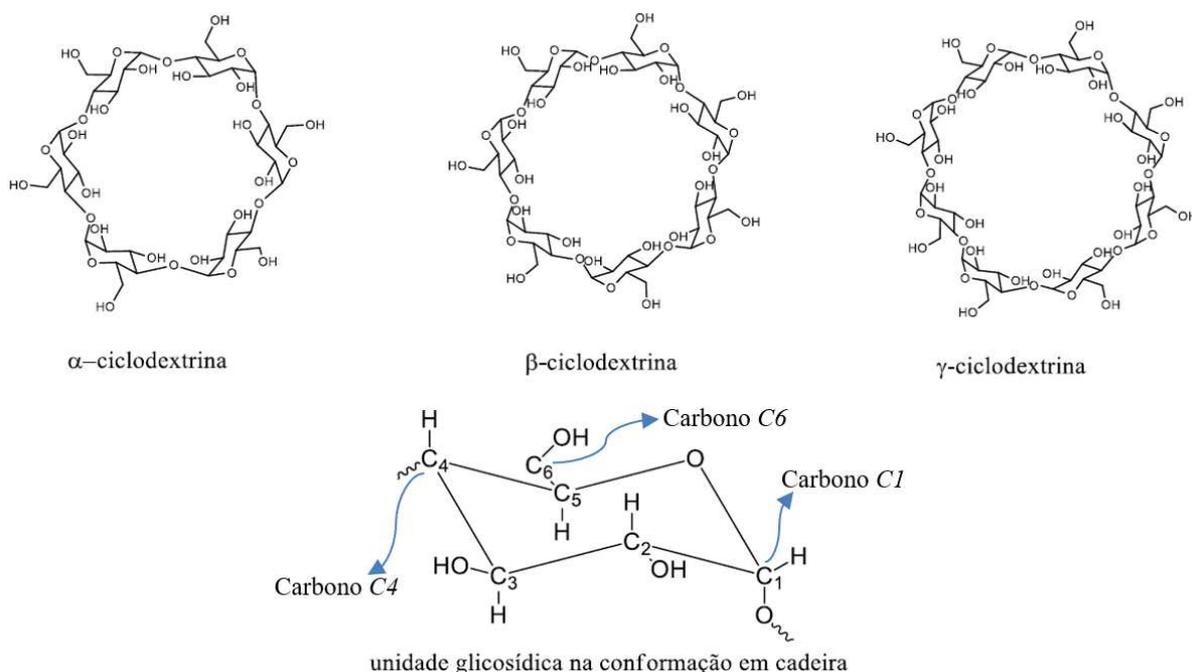
Nanopartículas de ciclodextrinas são hoje amplamente empregadas no mercado e na pesquisa farmacêutica como nanocarreadores, sendo geralmente associados a sistemas poliméricos ou outras modificações estruturais que promovem maior estabilidade, liberação em ambientes específicos ou mesmo sensíveis a gatilhos de temperaturas e pH. Devido à essa ampla aplicação, alguns trabalhos têm reportado melhorias de solubilidade e biodistribuição da associação de ciclodextrinas, β CD e HP β CD, em formulações com PZQ para o tratamento da esquistossomose, tanto para estudos *in vitro* quanto *in vivo* (MARAGOS et al., 2009; JESUS et al., 2010).

1.5 CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) foram descobertas há mais de cem anos por Villiers em 1891 através da digestão de 1000 g de amido pelo *Bacillus amylobacter*, em que foram obtidos 3 g de uma substância cristalina, a qual denominou-se inicialmente de “celulosina”. No entanto, foi, em 1903 que essas moléculas foram primeiramente detalhadas em um processo de produção e isolamento por Schardinger. Apesar de sua descoberta e caracterização terem ocorrido há mais de um século, sua utilização na prática industrial é algo bem recente. As ciclodextrinas são produzidas como resultado da reação de transglicosilação intramolecular de degradação do amido pela ciclodextrina glucanotransferase (CGTase). No processo de produção das CDs, a enzima CGTase age principalmente na amilose, catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4') e a subsequente reação de transglicosilação intramolecular ou ciclização dos oligossacarídeos; obtendo-se assim dextranas cíclicas como produto da reação (LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007).

As ciclodextrinas naturais mais conhecidas são oligossacarídeos formados por 6, 7 ou 8 unidades de glicopiranoose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1-4 (Figura 11), podendo ser chamada de α -ciclodextrina, β -ciclodextrina ou γ -ciclodextrina respectivamente, de acordo com sua composição. São homogêneas, policristalinas e não higroscópicas (THOMPSON, 1997; SZEJTLI, 1998). Podem existir ciclodextrinas com nove ou mais unidades de glicose, no entanto, seis é o número mínimo para a formação desses oligossacarídeos, devido a fatores estéricos de formação (UEKAMA, HIRAYAMA & IRIE, 1998; SZEJTLI, 1998).

Figura 11 - Representação Estrutural das ciclodextrinas e unidade de glucopirranose



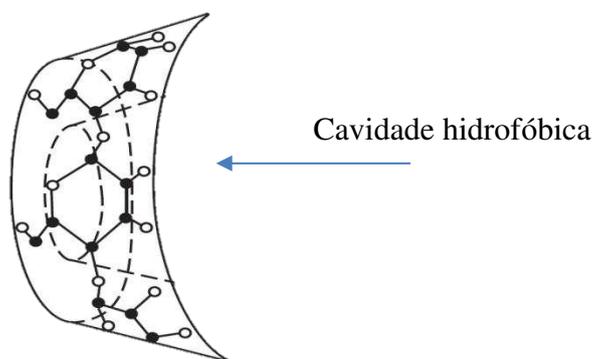
Fonte: Adaptado de BITTENCOURT, 2016.

1.5.1 Estrutura química das ciclodextrinas naturais e o uso da hidroxipropil-beta-ciclodextrina.

Devido à conformação de cadeira das unidades de glucopirranose e a ausência de rotação livre dessas unidades, a estrutura das CDs recebe o formato de cone truncado ou capsulas ocas de altura 7,9 Å (Figura 12) abertas em ambas as extremidades com um lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias nos carbonos C2 e C3, e uma face mais estreita, promovida pela livre rotação das hidroxilas primárias ligadas em C6. O interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos C3 e C5 e pelo oxigênio da ligação éter. Os pares de elétrons não ligantes das pontes de oxigênios estão direcionados para a parte interna das CDs, o que faz com que essas estruturas apresentem grande densidade de elétrons nessa região e se comportem como uma base de Lewis (KRZYSZTOF & KATARZYNA, 2008). Ao contrário do que parece, a cavidade interna da CD não se encontra vazia, essa está ocupada por moléculas de água de cristalização que vão originar vários estados de hidratação e, também, por moléculas de água da própria solução. Essas moléculas de água presentes na

cavidade das CDs podem formar ligações de hidrogênio com os grupos presentes na cavidade. Entretanto, devido à tensão do anel essas interações não são totalmente satisfeitas, resultando em ligações de hidrogênio anômalas e de alta energia em relação às ligações de hidrogênio convencionais, formadas entre as moléculas de água e as hidroxilas externas ou entre as moléculas de água da rede. O somatório dessas moléculas de água aprisionadas desconfortavelmente, juntamente com a presença de grupamentos C-H, promove um caráter hidrofóbico à essa região interna da molécula de ciclodextrina (LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007).

Figura 12 - Estrutura tridimensional cônica da β -ciclodextrina.



Fonte: Autor, 2019.

Na tabela 3, estão as principais características químicas das três CDs naturais mais comuns. A face externa das CDs apresenta um maior número de hidroxilas (C3-OH equatorial voltado para o exterior da cavidade e a hidroxila primária ligada ao carbono C6), essas hidroxilas das extremidades atribuem, à essa região, um caráter hidrofílico pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio com o solvente (SZEJTLI, 1988).

Tabela 3 - Características das principais ciclodextrinas naturais

CD	Nº de monômeros	Altura da molécula	Diâmetro interno (borda superior)	Diâmetro externo (borda superior)	Massa Molar	Solubilidade
α CD	6	7,9 Å	5,7 Å	13,7 Å	972,8 g mol^{-1}	149,2 mmolL $^{-1}$
β CD	7	7,9 Å	7,8 Å	15,3 Å	1135,0 g mol^{-1}	16,3 mmolL $^{-1}$
γ CD	8	7,9 Å	9,5 Å	16,9 Å	1297,1 g mol^{-1}	178,8 mmolL $^{-1}$

Fonte: Adaptado de THOMPSON, 1997.

A presença de grupos hidroxilas nas extremidades favorece a solubilidade das CDs em água, pela possibilidade de ligações de hidrogênio. No entanto, as hidroxilas, posicionadas na face exterior da molécula, podem formar ligações de hidrogênio intramoleculares, através da interação entre o grupo 'HO-C2' de uma unidade glicopiranosídica com o grupo 'HO-C3' da unidade adjacente, criando uma cinta secundária que influencia na flexibilidade da estrutura dessas moléculas e em sua solubilidade em água. Quanto mais intensas e numerosas essas interações intramoleculares, mais rígido será o cone e conseqüentemente menor será a solubilidade, fato esse que explica em partes a reduzida solubilidade em água da β CD que também está relacionada a propriedades termodinâmicas de entalpia e entropia (SZEJTLI, 1988; ASTRAY, 2009).

Se uma outra molécula com propriedades adequadas entrar em contato com as CDs, ela pode interagir com a cavidade interna através de ligações não covalentes, podendo formar os complexos de inclusão. Essa interação fica conhecida como "hóspede/hospedeiro", em inglês *host-guest*, em que a CD é o hospedeiro das moléculas hóspedes que irão interagir. Essas moléculas precisam deslocar as moléculas de H₂O na cavidade interna da CD, para que venham a ocupar esse sítio, o que promove uma redução da energia do sistema. Essa redução da energia se deve à redução da área superficial de contato entre o solvente e o soluto tanto quanto uma redução da solvatação entre o solvente polar e a cavidade apolar da molécula. O deslocamento de moléculas de água leva a um aumento da entropia do sistema, devido ao ganho de liberdade rotacional e translacional das moléculas de H₂O (SZEJTLI, 1998; LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007). Outros fatores como ligações de hidrogênio, mudanças da tensão superficial e interações de Van der Waals também apresentam influência sobre a formação do complexo. Devido à ligação hóspede-hospedeiro se tratar de um equilíbrio dinâmico, esses complexos formados podem ser facilmente dissociados na presença de grandes volumes de água, promovendo a liberação lenta de princípios ativos (DEL VALLE, 2004; KRZYSZTOF & KATARZYNA, 2008).

No processo de complexação, a constante de formação (K) do complexo apresenta importância ímpar, pois, através dela, é possível inferir sobre o grau de afinidade entre as duas espécies. Alguns autores defendem que apenas compostos com constantes na faixa de 200 a 5000 poderiam ser utilizados comercialmente, pois as interações seriam fortes o suficiente para garantir a integridade das formulações,

mas não tão fortes a ponto de impedir a dissociação no meio biológico e comprometer a atividade da molécula (PITHA & SZENTE, 1983).

De acordo com o tamanho da molécula hóspede e da cavidade das CDs, complexos de diferentes estequiometrias podem ser formados (CD:hóspede) 1:1, 2:1, 3:1, 1:2, 2:2 ou 1:3, sendo que dentre esses, a estequiometria 1:1 é a mais comum (THOMPSON, 1997; SZEJTLI, 1998; KRZYSZTOF & KATARZYNA, 2008).

O processo de formação dos complexos de inclusão pode ocorrer de várias formas, dentre eles temos:

- Co-precipitação, em que a molécula hóspede, no estado sólido, é adicionada a uma solução aquosa de CD formando uma suspensão que é agitada vigorosamente. O complexo é formado em um intervalo de 2 a 24 horas em temperatura ambiente, após este período, a suspensão é filtrada. O complexo, dissolvido no filtrado, pode ser seco em estufa ou por liofilização. Esse processo apresenta a vantagem de uma homogeneidade final razoável, no entanto, as etapas de secagem ou liofilização são longas, apresentando custos de operação dos equipamentos e ainda possíveis problemas com precipitação fracionada, o que leva a uma heterogeneidade (MOREIRA, 2016).
- Empastagem (*kneading*) é um método no qual a molécula hóspede, no estado sólido, é adicionada a uma mistura de CD com água, sendo utilizadas apenas 0,5 partes de água por parte de CD. O complexo sólido formado pode ser removido sob vácuo ou aquecimento. Esse é um método simples e barato. Mas que, em larga escala, demanda misturadores que têm um maior custo de operação. Ao final, pode ainda promover maior heterogeneidade (MOREIRA, 2016).
- Moagem conjunta (*grinding*) é um método no qual uma mistura de CD e molécula hóspede no estado sólido são trituradas vigorosamente por um determinado tempo na presença de uma pequena quantidade de água até que ela evapore durante a mistura. A maior desvantagem desse método é o custo operacional final, no entanto, ele promove ótima homogeneidade (MOREIRA, 2016).

Para se comprovar as inclusões, visando a identificação das interações intermoleculares, emprega-se um grande número de técnicas analíticas, sendo as mais usadas: análise térmica diferencial (DTA)/calorimetria de varredura diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria isotérmica de titulação (ITC), as técnicas espectroscópicas na região do infravermelho (IV), na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), ressonância magnética nuclear (RMN uni e/ou bi-

dimensionais), além de técnicas de equilíbrio de fases como solubilidade e particionamento (DENADAI, 2006b; LANNA, et al. 2016).

Além das ciclodextrinas naturais, ainda podemos encontrar derivações sintéticas, como é o caso da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD) (Figura 13), um derivado hidroxialquil, sendo uma alternativa às ciclodextrinas naturais por apresentar melhor solubilidade em água e menor toxicidade em relação à β -ciclodextrina, além de boa taxa de complexação e inclusão de moléculas em sua cavidade interna. Atualmente, a molécula de HP β CD é comercializada sob o nome de MolecusolTM e/ou EncapsinTM. HP β CD foi a primeira molécula derivada das CDs naturais aprovada pelo FDA, apresentando grande variedade de aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e agricultura (SZENTE, 1999; BREWSTER & LOFTSSON, 2007; ROY, 2018).

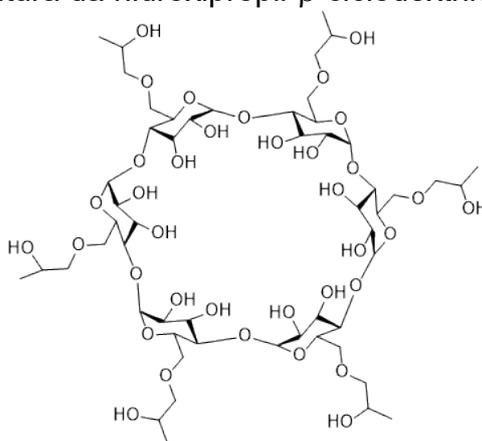
O uso da HP β CD foi patenteado quase que simultaneamente pela *Janssen Pharmaceutica* e *National Institutes of Health* em 1983 e 1984, respectivamente. A partir deste ponto, mais de 3000 artigos e 1000 patentes já foram gerados o que permitiu sua aceitação e publicação da monografia nas farmacopeias europeia e americana, sendo aprovado como excipiente (MALANGA, 2016).

Devido às propriedades da HP β CD, no melhoramento da solubilidade e estabilidade de formulações, inúmeros produtos já foram lançados nas mais diversas vias de administração tais como via oral, retal, dermatológica, ocular e parenteral. No entanto, de acordo com Pitha et al (1986), as moléculas de HP β CD poderiam atuar mais amplamente no organismo, além de funcionar somente como um excipiente. Após serem administradas via parenteral e liberação do fármaco para o meio, essas moléculas não permaneceriam vazias, mas sim tenderiam a encapsular moléculas lipofílicas presentes no meio, como por exemplo, vitaminas e hormônios. Assim, em 1987, o mesmo grupo aplicou HP β CD por via intravenosa para tratamento de hipervitaminose A, em que o indivíduo não consegue metabolizar quantidades suficientes de vitamina A. Esse fato foi registrado como a primeira vez em que HP β CD foi utilizada como fármaco e não só apenas como excipiente (CARPENTER, 1987).

As amostras de HP β CD são caracterizadas pelo grau de substituição da molécula, como excipiente a faixa aceitável de substituição pode variar de 0.4 a 1.5 por unidade de glicose. No entanto, para as novas aplicações como fármaco, uma

caracterização mais detalhada e melhores especificações devem ser realizadas antes de ser aceita pelos órgãos de autoridade em cada país (MALANGA, 2016; PITHA et al, 1986).

Figura 13 - Estrutura da hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD)



Fonte: ROY, 2018.

1.5.2 Estabilidade e toxicidade das ciclodextrinas

Como mencionado anteriormente, as CDs apresentam vantagens como carreadores de fármacos para o desenvolvimento de novas formulações, no entanto, para garantirmos essa função, fatores de segurança devem ser levados em consideração quando pensamos em novos excipientes que serão usados no âmbito farmacêutico. Portanto, uma investigação de fatores toxicológicos, farmacocinéticos e de estabilidade diante dos destinos biológicos deve ser explorado (MARTINS & VEIGA, 2002; LOFTSSON, MASSON & BREWSTER, 2004).

A estabilidade das CDs naturais é um fator interessante a ser explorado mediante diferentes meios biológicos como, por exemplo, em meios alcalinos ou ácidos. Sabe-se que, em meios alcalinos, as CDs se mantêm, estáveis sem alteração de sua estrutura, no entanto, CDs naturais em solução 1M de HCL a 60 °C sofrem hidrólise em 6,7, 7,7 e 13,9 min para α CD, β CD e γ CD respectivamente. O que indica um aumento da taxa de abertura do anel das CDs em relação ao tamanho da molécula (IRIE & UEKAMA, 1997; JAMBHEKAR; BREEN, 2006).

As ligações glicosídicas presentes nas CDs naturais são degradadas pelas mesmas enzimas de degradação de amido. Essa degradação é bem mais lenta em relação à degradação dos açúcares de cadeias lineares. Em geral, as CDs são hidrolisadas pelas enzimas α -amilase que quebram as ligações α -1,4. A exemplo,

temos a amilase salivar e a pancreática que são capazes de hidrolisar as CDs com uma reatividade crescente na ordem $\alpha\text{CD} < \beta\text{CD} \ll \gamma\text{CD}$.

No entanto, uma substituição nos grupos hidroxila da molécula reduz essa taxa de degradação pelas enzimas, reduzindo a afinidade das CDs pelo sítio enzimático ou a reatividade intrínseca das enzimas. Por outro lado, em alguns mamíferos, como ratos, coelhos, cães e humanos as βCDs são muito pouco hidrolisadas por essas enzimas (IRIE & UEKAMA, 1997).

A grande maioria das linhagens bacterianas isoladas do colón humano são capazes de degradar as CDs naturais, usando essas como fonte principal de carbono para seu crescimento. O que gera uma afinidade das CDs por essa região, sendo possível o uso desses carreadores como vantagem para a entrega de fármacos na região do colón. O estudo farmacocinético sobre as diferentes vias de administração *in vivo* das CDs é um fator importante para se saber a dose, tempo de meia vida e principais vias de eliminação. A administração intravenosa das CDs apresenta excreção principalmente renal, a αCD e βCD são excretadas praticamente intactas, enquanto a γCD sofre um processo de degradação extenso. Sendo assim, a eliminação de βCD é fortemente dependente da função renal o que pode gerar efeitos indesejáveis sobre o rim (IRIE & UEKAMA, 1997; DEL VALLE, 2004).

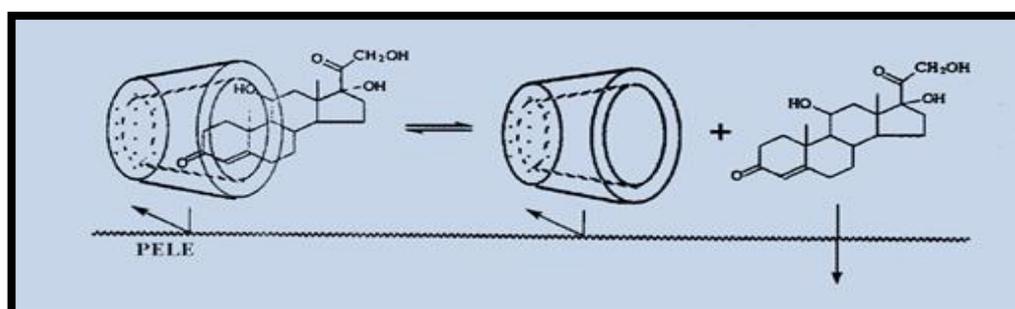
A viabilidade de CDs em formulações orais já é bem estabelecida tanto no Japão quanto por toda Europa. No entanto, sua absorção gastrointestinal é bem limitada devido ao grande volume de sua molécula e sua natureza hidrofílica, sendo assim, o mais provável é que essas moléculas volumosas atuem carreando as moléculas hospedes até o local de absorção, mas permanecendo no trato gastrointestinal posteriormente (CAL; CENTKOWSKA, 2008). Tanto a αCD quanto a βCD demonstraram ser bem resistentes ao pH ácido do estômago e as enzimas amilases pancreáticas e salivares, no entanto, a βCD sofre um intenso processo de hidrólise na região do colón, devido às bactérias mencionadas anteriormente. Outras vias de absorção também já foram exaustivamente avaliadas, como as mucosas. O uso dessas moléculas foi muito positivo para o melhoramento da absorção transmucosa de peptídeos e proteínas devido à redução de barreiras metabólicas e físicas, como, por exemplo, pela via nasal. Nesse mesmo sentido, as CDs também apresentam um melhoramento da absorção de fármacos através da via pulmonar,

indicando que a fraca barreira física de mucosa pulmonar, em modelos *in vivo*, permite a absorção de CDs para o sistema circulatório (IRIE & UEKAMA, 1997).

As ciclodextrinas também podem auxiliar na absorção transdérmica de fármacos melhorando sua solubilidade, estabilidade, liberação e/ou permeação. Como exemplo de formulações já conhecidas com o uso de ciclodextrinas para tais fins, temos o uso de α CD com miconazol, β CD com clorafenicol, betametasona, Indometacina e piroxican, sendo que, nesses casos, elas atuaram melhorando a liberação e/ou permeação do fármaco. O fato é que as ciclodextrinas são grupos de moléculas hidrofílicas e bastante volumosos de 1000 até 1500 Da, sendo sua absorção através da pele algo de uma dificuldade considerável. Assim, as CDs atuam de inúmeras formas melhorando essa absorção dos fármacos por mecanismos diferentes, como melhora da solubilidade do ativo em um veículo ou geralmente como um transportador. A combinação de ciclodextrinas com promotores de permeação também é uma estratégia de grande vantagem que eleva a absorção do fármaco no local (MARTINS; VEIGA, 2002; CAL; CENTKOWSKA, 2008).

Geralmente, nessa associação, o fármaco hidrofóbico é distribuído por toda superfície da membrana (pele, mucosa ou córnea) e a ciclodextrina por apresentar baixa afinidade por essa membrana continuará no veículo. Assim dificilmente as ciclodextrinas são absorvidas através da pele, ou seja, apenas a fração de fármaco livre vai sendo absorvida. Logo, temos um equilíbrio dinâmico entre o fármaco complexado com fármaco livre, em solução (Figura 14) (CAL; CENTKOWSKA, 2008).

Figura 14 - Modelo de penetração de um fármaco através da pele com auxílio de formulação aquosa de ciclodextrina



Fonte: Adaptado de MARTINS; VEIGA, 2002.

Devido ao baixo índice terapêutico de algumas drogas antitumorais e ao fato de que essas moléculas citotóxicas podem causar danos não só às células cancerígenas, mas, também, as células saudáveis, as ciclodextrinas podem ser empregadas nesses modelos de tratamento com intuito de uma redução desses impasses. Com o objetivo de reduzir essa toxicidade e ainda promover melhorias na solubilidade e biodisponibilidade, as ciclodextrinas já foram utilizadas amplamente na pesquisa médica para diversos esquemas de complexação com fármacos (IRIE & UEKAMA, 1997; JIANG, 2011).

Como exemplo, temos a 9-nitro camptotecina que, através da complexação com HP β CD, promoveu melhorias da atividade antitumoral e redução da toxicidade (JIANG, 2011). A cisplatina, em HP β CD, que gerou menor toxicidade e maior solubilidade e ainda o paclitaxel em β CD, o qual através da formação do complexo de inclusão promoveu maior capacidade de carregamento ou *loading* em relação ao fármaco livre. Vários outros modelos, em ciclodextrinas modificadas, também já foram desenvolvidos, o que, em resumo, acabou promovendo melhorias de solubilidade, biodisponibilidade, tempo de meia vida e, principalmente, redução da toxicidade de alguns fármacos (BALAJI, 2009).

O uso das ciclodextrinas, em diversos tipos de formulações no mercado, através tanto das vias enterais quanto parenterais, faz com que sua avaliação toxicológica seja um fator de referência para indicar qual a melhor forma de administração e qual a melhor estratégia a se adotar para um estudo de suas aplicações. A administração oral das CDs praticamente não apresenta riscos toxicológicos, devido ao fato de que as CDs não são absorvidas pelo trato gastrointestinal. Doses elevadas como 18,8 g/kg foram administradas em ratos e nenhuma mortalidade foi observada. Porém, a administração intravenosa de altas quantidade das CDs naturais pode levar a alterações no túbulo proximal dos rins, gerando nefro toxicidade (IRIE & UEKAMA, 1997). Outros estudos em ratos revelaram que as doses letais, no caso de administração intravenosa (LD₅₀) das CDs, foram de 1000, 788 e 3750 mg/kg para α CD, β CD e γ CD, respectivamente. No entanto, modificações na estrutura das CDs pode ser uma alternativa plausível para redução da toxicidade. HP β CD demonstrou baixa toxicidade quando administrada por via parenteral mesmo em doses elevadas e ainda os efeitos sobre os rins foram reversíveis com redução da nefrotoxicidade (DEL VALLE, 2004; MARTINS; VEIGA,

2002). Por via intraperitoneal, HP β CD foi testada em doses de 10 mg/kg em modelo murino e nenhuma mortalidade foi observada. Em coelhos, concentrações variando de 50 – 400 mg/kg por via intravenosa e nenhuma toxicidade, nem mesmo em animais grávidos, foi observado. Em modelos humanos, por administração intravenosa, doses agudas que chegaram a 3 g a uma taxa de 100 mg/mL, foram avaliadas e nenhum efeito adverso foi observado durante e após ensaio (IRIE & UEKAMA, 1997).

Sabe-se hoje que existem diversas características que fazem com que esses açúcares cíclicos sejam interessantes para alojar e transportar outros compostos, como, por exemplo, estrutura química conhecida, biocompatibilidade, baixa toxicidade, diferentes formas de inclusão nas cavidades, proteção das moléculas hóspedes e relativa melhoria na solubilidade (RAJEWSKI; STELLA, 1996; SZEJTLI, 1998; UEKAMA, HIRAYAMA & IRIE, 1998; DE JESUS et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a atividade esquistosossomicida da cnicina e de seus complexos de inclusão em ciclodextrinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento da cnicina a partir do extrato de *C. benedictus*;
- Realizar a identificação da cnicina por métodos espectroscópicos;
- Preparar os complexos de inclusão da cnicina em β CD e HP β CD;
- Caracterizar a formação dos complexos obtidos, em fase sólida.
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação Cn/ β CD e Cn/HP β CD.
- Avaliar o efeito das ciclodextrinas na formação de nanoprecipitados hidrofóbicos em mistura de solventes.
- Avaliar a atividade citotóxica da cnicina bem como dos complexos de inclusão em ciclodextrina Cn/ β CD e Cn/HP β CD.
- Avaliar a atividade biológica esquistosossomicida *in vitro* e *in vivo* da cnicina e dos seus complexos nanoestruturados em ciclodextrinas.
- Avaliar a atividade dos complexos de inclusão e da cnicina para oograma e OPG; bem como peso médio dos órgãos, fígado e baço, dos animais tratados e não tratados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos deste trabalho foram realizados nos laboratórios: Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Universidade Federal de Juiz de Fora, CentralBio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Físico Química e Fluidos, na Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares; laboratório *Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas* (NPDN) - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP e laboratório do Núcleo de pesquisas em parasitologia (*Nupep*) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF. O resumo de todos os processos utilizados na caracterização da Cn bem como, caracterização dos complexos supramoleculares, está descrito na figura 15.

Para execução dos métodos foram utilizados os seguintes equipamentos:

NIPPAN

- Balança analítica: marca Marte, modelo BL320H;
- Balança analítica: marca Marte, modelo AY220;
- Bomba a vácuo: marca Primatec, modelo 132;
- Rotaevaporador: marca Buchi, modelo RII;
- Bomba a vácuo: marca Buchi, modelo V-700;
- Banho ultratermostático: marca Cientec, modelo CT-281-28;
- Estufa com circulação e renovação de ar: marca Solab, modelo SL102;
- Lanterna de emissão de radiação ultravioleta: marca Boitton.
- Coluna de vidro para cromatografia à vácuo de 10 cm de diâmetro, contendo placa de 2,5 cm de espessura.

CentralBio

- Ultrassom: marca Sanders Medical, modelo Soniclean 2;
- Microcentrífuga: marca Kasvi;
- Bomba a vácuo: marca Gast, modelo DOA-P704-AA;
- Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência de bomba binária: marca Waters, modelo 1525; injetor automático: marca Waters, modelo 2707; Detector de arranjos de diodos (DAD): marca Waters, modelo 2998;

- Cromatógrafo de fase líquida de ultra eficiência de bomba quaternária com injetor automático: marca Waters, modelo Acquity CLUE H-Class; Detector de espectrometria de massas com analisador de massas do tipo quadrupolo acoplado a “*time of flight*” marca Waters, modelo Xevo G2-S.

Laboratório de Físico-Química e Fluidos

- Espectrômetro de infravermelho médio da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two™, (ATR) da marca PIKE acoplado ao espectrômetro;
- Zetasizer Nano ZS90 da Malvern;
- Microcalorímetro VP-ITC da Microcal;

Departamento de Química da UFJF

- RMN Brucker Avance III, 500 MHz;

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

Para a realização de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizaram-se cromatoplasmas de sílica gel 60 GF254 (Merck). A revelação dessas foi obtida por meio de irradiação no ultravioleta (UV) (254 e 366 nm), bem como do revelador químico, solução de anisaldeído sulfúrico.

Para a realização de cromatografia líquida a vácuo (CLV), foram utilizadas como adsorventes sílica PF254: sílica 60H: sílica 70-230 mesh, na proporção de 1:1:4 (m/m), além de bomba a vácuo e coluna de vidro com 10 cm de diâmetro e 30 cm de altura, possuindo placa sinterizada.

Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizadas coluna analítica de fase reversa (Sun Fire C18; 4,6 x 250 mm; 5 µm), na presença de pré-coluna (Sun Fire C18; 4,6 x 20 mm; 5 µm).

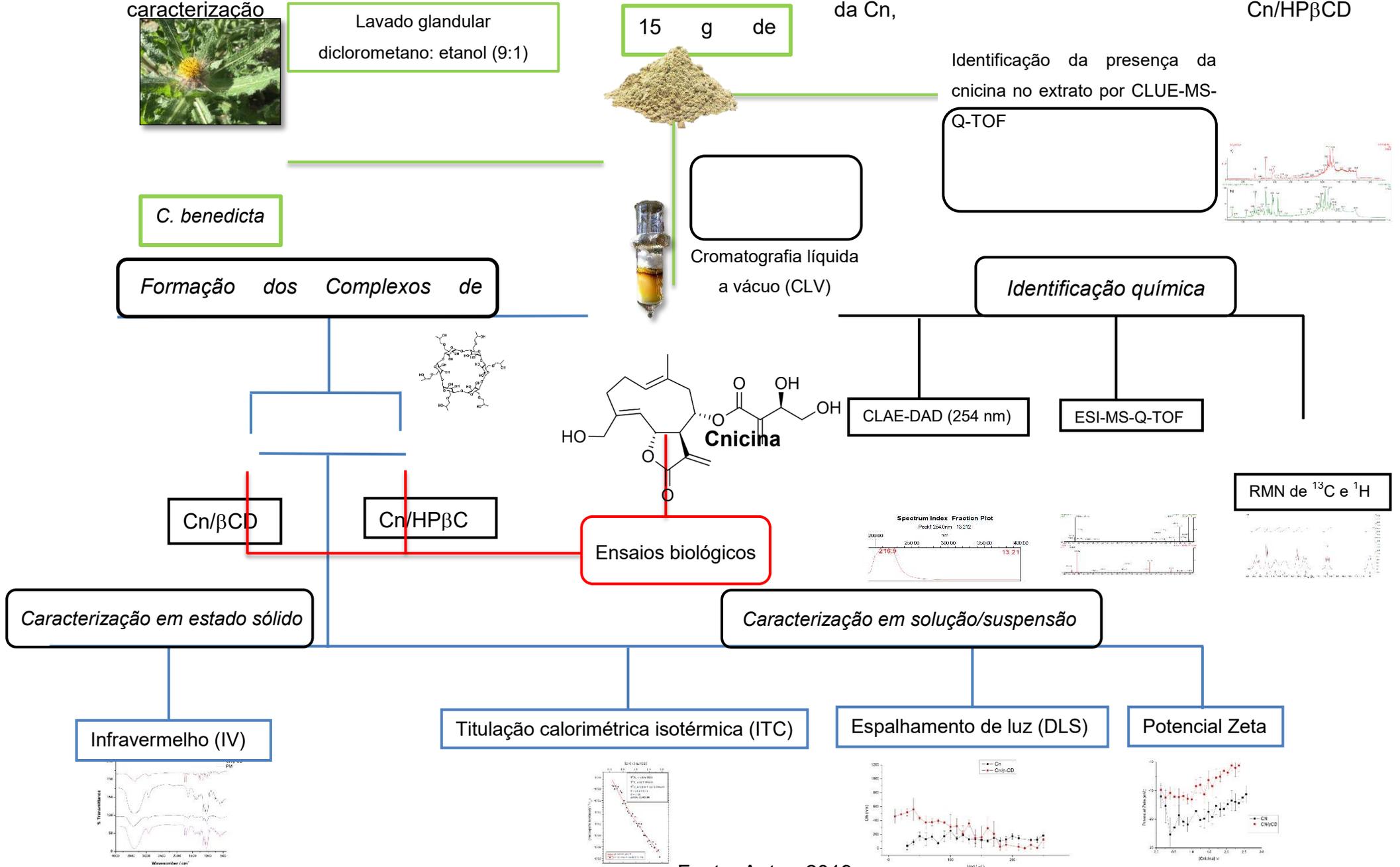
Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), foi utilizada coluna analítica de fase reversa (Acquity BEH C18; 2,1 x 100 mm; 1,7 µm), na presença de pré-coluna (Acquity BEH C18; 2,1 x 5 mm; 1,7 µm).

Para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C utilizou-se Dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆) da marca Cambridge Isotope Laboratories.

As ciclodextrinas, marca *Sigma*, utilizadas no processo de produção dos complexos de inclusão, tanto β CD quanto HP β CD, foram obtidas no Laboratório de Físico-Química e Fluidos sob orientação do Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai.

Figura 15 -
caracterização

Fluxograma geral dos ensaios de obtenção e da Cn, Cn/HPβCD



Fonte: Autor, 2019.

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Todas as etapas de extração e identificação da cnicina, a partir do material vegetal de *C. benedicta*, foram realizadas no Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais – NIPPAN, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Para esta finalidade, as partes aéreas de *C. benedicta* foram coletadas no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora em 16 de agosto de 2017. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob o número de tombo CESJ 71393.

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *Centaurea benedicta* PELO MÉTODO DE LAVAGEM FOLIAR

Para obtenção do extrato, 1500 g de folhas íntegras da espécie foram submetidas ao processo de lavagem foliar em mistura de diclorometano: etanol (9:1 v/v), seguindo metodologia adaptada de De Almeida (2016). As partes aéreas de *C. benedicta* foram mergulhadas em béquer, contendo a mistura de solventes, durante 30 segundos e, em seguida, o solvente foi filtrado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes com o mesmo material. Os filtrados foram recuperados e rotaevaporados até a obtenção de 15 g do extrato das partes aéreas de *C. benedicta*.

3.2.1 Identificação química da Cnicina no extrato de *C. benedicta* por CLUE-MS-Q-TOF

Para análise da composição química do extrato obtido e verificação da presença da cnicina, foi realizada a análise por CLUE-MS-Q-TOF.

Foram pesados em torno de 100 mg do extrato e foram adicionados 1 mL de metanol (MeOH) LC-MS para solubilizar e posterior análise. O tubo de plástico *ependorf*, contendo a solução com extrato, foi levado até o aparelho de ultrassom e aquecidos a 35 °C por 15 min, facilitando o processo de solubilização dos compostos mais polares na amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas

em microcentrífuga por 5 min a 10.000 rpm. Após essa etapa, o sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo onde 10 μ L de água ultrapura foram adicionados para facilitar uma possível precipitação de impurezas nesta etapa. As amostras em novos tubos foram centrifugadas novamente por 5 min a 15.000 rpm. O sobrenadante foi coletado novamente e filtrado em unidade filtrante de poro 0,22 μ m. A amostra e o branco (metanol + água) foram levadas para análise em CLUE-MS-Q-TOF.

Para separação dos componentes da amostra, foi usado o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) com uma coluna Waters Acquity CLUE BEH C-18 2.1mm x 100 mm, 1.7 μ m. A eluição foi feita por gradiente com fluxo linear de 400 μ L/min e como solvente A foi utilizada a água purificada (filtração Milli-Q) com 0,1 % de ácido fórmico e como fase móvel B a acetonitrila (grau cromatográfico), sendo o volume de injeção de 0,15 μ L. Os valores do gradiente estão descritos na tabela 4 abaixo:

Tabela 4 - Gradiente utilizado durante a análise por CLUE-MS-Q-TOF

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
Inicial	0,4	95	5
2	0,4	95	5
14	0,4	2	98
16	0,4	2	98
20	0,4	95	5

Fonte: Autor, 2019.

Foi usado o espectrômetro de massas da marca XEVO G2- ESI-Q-TOF híbrido, contendo dois analisadores, um quadrupolo e um por tempo de voo (TOF) de alta resolução. As condições de ESI- MS foram realizadas em modo negativo com as seguintes especificações: voltagem no cone de 40V, Capilar de 3 kV, a temperatura de dessolvatação foi de 450 °C, fluxo do gás de 50 L/hr, energia inicial de colisão foi de 6V para geração do íon precursor e taxa de fluxo de infusão 400 μ L/min. Para as análises MS/MS, foi estabelecido a taxa de variação de m/z entre 100 – 1000, a energia de colisão em MS/MS foi feita em modo rampa variando de

15-30 eV. Para garantir a precisão da massa e reprodutibilidade, leucina encefalina (m/z 554,2615 em modo negativo) foi utilizado como o *lock mass* de referência.

3.2.2 Isolamento da cnicina

Com o objetivo de separação dos constituintes presentes no extrato e, principalmente, com foco no isolamento da cnicina, 15 g do extrato foram submetidos ao fracionamento cromatográfico por cromatografia líquida a vácuo (CLV) (Figura 16). A fase móvel de escolha foi fundamentada no perfil de separação obtido por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizada mistura de clorofórmio (CHCl₃): metanol (MeOH) com aumento crescente de polaridade, conforme Tabela 5. Foi utilizada mistura de sílicas adsorventes para composição da coluna CLV (300 g de sílica 40 - 63 µm mais 100 g de sílica 70-230 µm). A amostra foi aplicada juntamente com *Celite*, atingindo altura de 0,8 cm. Durante a eluição todas as frações foram analisadas e acompanhadas por CCD clorofórmio: metanol (95:5 v/v) usando reagente revelador Vanilina sulfúrica e reagente de Lieberman Burchard a 365 nm. Após eluição, um precipitado branco foi obtido na fração 8 (eluída com MeOH 5 %). Este precipitado foi analisado por CLAE e RMN ¹H e ¹³C, confirmando a estrutura do mesmo como sendo a cnicina. O resumo do processo de isolamento da cnicina encontra-se no esquema da figura 17.

Tabela 5 - Esquema de CLV aplicada ao extrato de *C. benedicta*

Fração	Fases móveis	Proporção	Volume de solvente usado
1 e 2	Clorofórmio	100	4 L
3,4 e 5	Clorofórmio: MeOH	98:02	4,1 L
6,7 e 8	Clorofórmio: MeOH	95:05	5,75 L
9	Clorofórmio: MeOH	90:10	1 L
10	MeOH	100	1 L

Fonte: Autor, 2019.

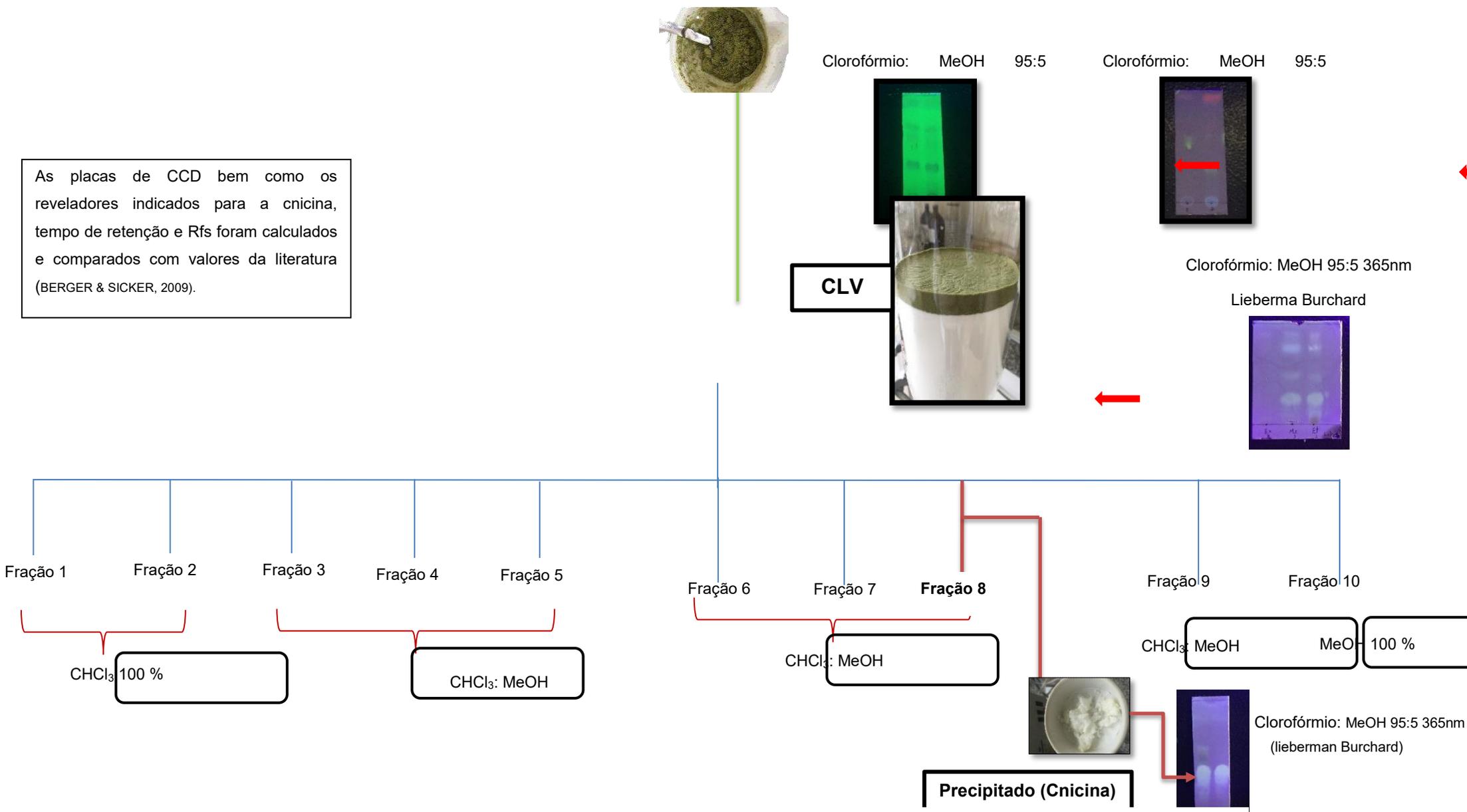
Figura 16 - Cromatografia Líquida a Vácuo realizada durante o processo de separação



Fonte: Autor, 2018.

Figura 17- Esquema de isolamento da cnicina a partir do lavado de *C. benedicta*

As placas de CCD bem como os reveladores indicados para a cnicina, tempo de retenção e Rfs foram calculados e comparados com valores da literatura (BERGER & SICKER, 2009).



Fonte: Autor, 2019

*A fração 8 foi subdividida em 7 outras subfrações, de onde foi obtido a cnicina.

3.2.3 Análise do precipitado obtido no processo de isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O precipitado branco obtido ao final da CLV foi submetido a análise por CLAE em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 mm x 250 mm, 5mm), fluxo de 1mL/min, volume de injeção foi 30 µL e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. A análise de dados foi feita a partir do *Software* Empower 3, a partir da varredura (190 – 400 nm) foi selecionado o comprimento de onda de 245 nm para leitura, sendo que o gradiente de eluição consistiu de fase binária composta de água (H₂O) (acidificada com ácido acético glacial) e metanol seguindo a tabela 6 abaixo:

Tabela 6 - Gradiente de eluição em CLAE

Tempo (min)	Fluxo	%H₂O	%MeOH
Inicial	1.00	60.0	40.0
40.00	1.00	0.0	100
45.00	1.00	0.0	100
46.00	1.00	60.0	40.0
60.00	1.00	60.0	40.0

Fonte: Autor, 2018.

A amostra foi preparada para injeção no sistema CLAE através de solubilização em MeOH, com auxílio de banho ultrassônico aquecido a 35° C por 15 minutos. Em seguida, foi diluída com água até obter a proporção de 9:1 v/v (metanol:água). A amostra foi centrifugada em microcentrífuga por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (rpm) e filtrada em unidade filtrante de poro 0,45 µm.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DA CNICINA

A amostra pura obtida anteriormente foi analisada por RMN de ¹H (500MHz) e ¹³C (125 MHz), utilizando espectrômetro de RMN BRUKER AVANCE III, localizado no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICE) da UFJF e operado a 500 MHz. O solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆)

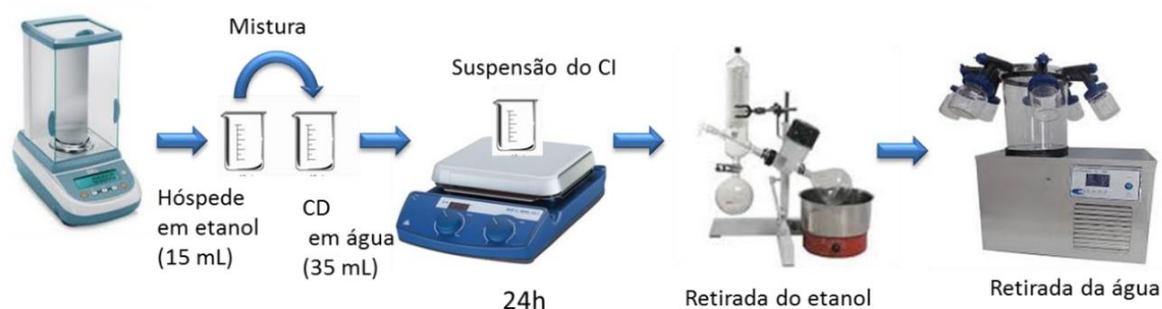
para o composto e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os dados obtidos foram tratados no programa MestReNova e comparados com dados obtidos na literatura. Além disso, a identificação do precipitado branco como sendo a cnicina, foi realizada também por espectrometria de massas (EM) em modo positivo e negativo de análise utilizando o mesmo equipamento e nas mesmas condições mencionadas anteriormente no item 3.2.1.

3.4 PREPARO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA E CNICINA

Os compostos de inclusão foram preparados usando quantidades equimolares da molécula hóspede e β CD pelos métodos de coprecipitação/liofilização com adaptações (CAO; GUO; PING, 2005; CHOWDARY; SHANKZR; TANNIRU, 2014; PATIL et al., 2010). O roteiro utilizado está descrito a seguir e esquematizado na figura 18.

Em béqueres separados foram solubilizadas a molécula hóspede e a β CD utilizando, respectivamente, 15 mL de etanol e 35 mL de água, os solventes escolhidos foram baseados em testes prévios de solubilidade das moléculas. Em seguida, a solução da molécula hóspede foi vertida para o béquer contendo a solução aquosa de β CD, sob agitação, e a suspensão formada permaneceu assim por 24 h. Depois, essa suspensão foi rotaevaporado para retirada do etanol e, por fim, congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e submetida à liofilização para obtenção do composto de inclusão desejado. O mesmo processo foi repetido para a molécula hóspede HP β CD.

Figura 18 - Esquema de preparo do complexo de Inclusão



Fonte: Adaptado de BITTENCOURT, 2016.

3.4.1 Preparo das misturas mecânicas

As misturas mecânicas foram preparadas usando quantidades equimolares da molécula hóspede e β CD, sendo os sólidos, após pesagem, levemente homogeneizados em gral de ágata com auxílio de pistilo. Posteriormente, as misturas foram acondicionadas em tubos *ependorf*® e armazenadas em geladeira. Na figura 19, está apresentada uma representação esquemática da preparação.

Figura 19 - Esquema de preparo da mistura mecânica (MM)



Fonte: adaptado de BITTENCOURT, 2016.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO NO ESTADO SÓLIDO

3.5.1 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) dos compostos puros, da β CD, das misturas mecânicas (MM) e dos compostos de inclusão (CI's) foram registrados em um equipamento da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two TM, a partir de pastilhas contendo KBr. Os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} e intervalo de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a aquisição e processamento dos espectros, foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). A figura 20 representa o esquema do experimento. Os dados foram exportados para o Microcal Origin 8.0 para edição.

Figura 20 - Esquema de obtenção do espectro de Infravermelho



Fonte: Adaptado de BITTENCOURT, 2016.

3.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE COMPOSTOS DE INCLUSÃO EM SOLUÇÃO/SUSPENSÃO

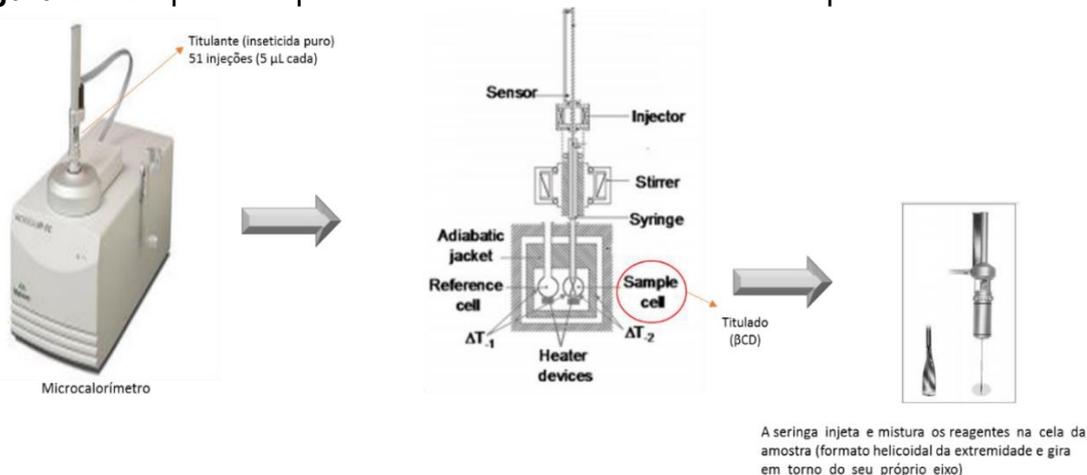
3.6.1 Titulação calorimétrica isotérmica

Os parâmetros físico-químicos envolvidos na formação dos compostos de inclusão em solução foram determinados a partir da titulação calorimétrica

isotérmica, envolvendo o sistema molécula hóspede e β CD, a 25 °C. O experimento foi realizado utilizando um microcalorímetro VP-ITC da Microcal (Figura 21) e os seguintes parâmetros experimentais: rotação de 300 rpm, tempo de injeção de 2 s, tempo de equilíbrio de 5 min, 51 injeções automáticas de 5 μ L de titulante em 1,5 mL do titulado.

A primeira injeção de 1 μ L foi descartada a fim de eliminar os efeitos de difusão de material da seringa para a cela e vice-versa. O titulante consistiu na solução da molécula hóspede a 30 mM em DMSO:H₂O (90:10 v/v). Já o titulado foi a solução de β CD a 2 mM no mesmo solvente. Os experimentos de referência (branco) consistiram de titulação da molécula hóspede a 30 mM em 1,5 mL de DMSO:H₂O (90:10 v/v). Após os experimentos, as curvas de titulação foram subtraídas dos respectivos brancos a fim de se eliminar matematicamente os efeitos de interação dos compostos com o solvente. Os experimentos foram realizados em duplicata e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0.

Figura 21- Esquema representativo de um Microcalorímetro para análise VP-ITC



Fonte: Adaptado de BITTENCOURT, 2016.

3.6.2 Análise por Condutividade elétrica, Espalhamento de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ZP)

O caráter nanométrico dos compostos puros e seus respectivos compostos de inclusão foi avaliado por medidas de tamanho de partículas (diâmetro hidrodinâmico

– Dh) por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a 25 °C, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. O Diâmetro hidrodinâmico (Dh) foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens. Nesse caso, foram pesados 1 mg do composto puro e quantidade equimolar do composto de inclusão e ambos solubilizados em 500 µL de DMSO cada. A seguir, foram realizadas 25 injeções de 20 µL da solução em 2 mL de água Milli-Q. O tratamento dos dados foi executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0. Para determinação da energia potencial normalizada pela carga superficial das partículas ou potencial zeta (ZP), foram utilizadas suspensões similares às utilizadas no experimento de tamanho hidrodinâmico citado acima. Cada uma das suspensões foi vertida em uma cubeta de vidro, a qual é imersa a célula de medida (Dip Cell) e avaliada pelo módulo Zetasizer Nano-ZS 90 através da técnica de micro-eletoforese laser-doppler (MELD), com ângulo de espalhamento de luz a 173° e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski. Assim como o diâmetro hidrodinâmico, o valor final do potencial zeta foi calculado como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0.

3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no laboratório do Núcleo de pesquisas em parasitologia (*Nupep*) do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, em parceria com a professora Dra. Elaine Soares Coimbra. Camundongos BALB/c foram inoculados por via I.P com 2 mL de tioglicolato 3 %, 72 horas antes da eutanásia. Em seguida, foram eutanasiados para a realização do lavado peritoneal, em que foram injetados, no peritônio de cada animal, 6 mL de solução de Hank's estéril, sendo que em cada camundongo, o processo foi repetido para recuperar um maior número de células. A solução obtida do lavado peritoneal foi centrifugada a 1200 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) por 10 minutos, e as células

foram ressuspensas em meio RPMI-1640 e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram suspensas em meio RPMI-1640, suplementado com 10 % de SBF e 0,5 % de penicilina/estreptomicina, na concentração de 2×10^6 células/mL e foram transferidas para placas de 96 poços. As placas permaneceram por 24 horas em estufa com 5 % de dióxido de carbono (CO₂) a 37 °C, para a adesão dos macrófagos. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada das células não aderidas e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações. As placas foram transferidas novamente para estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C, onde permaneceram por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço, 10 µL de MTT (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/mL. Após 2 horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/HCl (solução a 0,7 %) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570 nm. Os testes foram realizados em duplicatas e em alguns poços, não houve adição de compostos (controle). Os resultados foram calculados como porcentagem de morte dos macrófagos em relação ao controle. Foi então determinado o CC₅₀ (concentração citotóxica que mata 50 % das células) de cada amostra com o auxílio do programa GraFit5.

3.8 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO*

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

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

A linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, utilizada neste trabalho, foi a linhagem BH (Belo Horizonte, MG), mantido no laboratório *Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas* (NPDN) - Universidade de Guarulhos, São Paulo, SP. Os parasitos foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiro intermediário) e camundongos Swiss como hospedeiros definitivos. Os caramujos são procedentes de Barreiro de Baixo (Belo Horizonte, MG, Brasil),

mantidos em aquários de polietileno (55x22x17 cm) com cerca de 20 litros de água desclorada, temperatura de 24 °C, alimentados com alface fresca.

Os camundongos swiss foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica e alimentados com ração e água *ad libitum*. Esses roedores eram recém desmamados, fêmeas, com massa de aproximadamente 20 g e 21 dias de idade. Os animais foram acomodados em maravalha com duas trocas semanais.

3.8.2 Manutenção do ciclo de vida do *S. mansoni*

Miracídios foram recolhidos de um macerado hepático, de camundongos previamente infectados, para posterior reinfecção de caramujos (PELLEGRINO; KATZ, 1968). Após 30 a 40 dias de infecção, os caramujos são expostos à água declorada e luz artificial por 2 a 3 horas, para a liberação de cercárias. As cercárias são concentradas para a infecção dos camundongos (PELLEGRINO; KATZ, 1968). Os camundongos swiss foram infectados por meio de injeção subcutânea (seringa de 1 mL) com cerca de 80 cercárias. Após 49 dias de infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e perfundidos (os animais foram seccionados longitudinalmente na região ventral) com meio RPMI 1640 (Roswell Memorial Park Institute, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) com L-glutamina, vermelho de fenol e heparina sódica 5 UI/mL (Liquemine®, Roche, São Paulo, SP, Brasil), através do sistema porta hepático (a veia porta foi seccionada e com auxílio de uma agulha acoplada em bomba peristáltica) para a recuperação dos vermes adultos de *S. mansoni*.

O ciclo de vida do parasito foi mantido e os vermes e ovos foram recuperados devido a metodologias já descritas na literatura (SMITHERS; TERRY, 1965; PELLEGRINO; KATZ, 1968).

3.8.3 Preparo das amostras para ensaio

As amostras foram acondicionadas em microtubos de polipropileno de capacidade de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e umidade. Para diluir e solubilizar as amostras foi

utilizado dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) e adicionou-se meio RPMI 1640 para obter as concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 μM , sendo que a concentração final de DMSO não foi superior a 0,5 %. O controle positivo (PZQ 2 μM) foi preparado da mesma forma.

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

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

Em seguida, as amostras para teste de atividade, tanto extrato quanto cnicina foram adicionadas e os parasitos foram incubados em estufa (Thermo Scientific 8000 WJ, CA, EUA) a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5 %. Para cada grupo experimental, utilizou-se um grupo controle negativo (casais de parasitos cultivados somente em meio RPMI 1640 com NLS-B ou meio RPMI 1640 com DMSO a 0,5 %) e um grupo controle positivo (PZQ a 2 μM) (DE CASTRO et al., 2015; DE MORAES et al., 2013a; DE MORAES et al., 2013b).

Os casais de vermes adultos foram monitorados por 72 horas, diariamente, com auxílio de estereomicroscópio. A mortalidade dos parasitos foi avaliada pela ausência de movimentos por 2 minutos. Além disso, também foi avaliada a redução da atividade motora, classificado em moderada e significativa (DE MORAES et al., 2011a; DE MORAES et al., 2011b; DE MORAES et al., 2012).

3.9 ENSAIO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

Considerando o bom desempenho da cnicina em ensaio *in vitro*, formulações nanoparticuladas em sistemas supramoleculares com ciclodextrinas foram elaboradas para serem avaliadas no modelo esquistossomicida *in vivo*, sendo administradas por via oral e por via intraperitoneal. Ambos ensaios foram

estabelecidos sob a colaboração do Prof. Dr. Josué de Moraes na Universidade de Guarulhos. Os animais foram liberados através da comissão de ética de uso de animais, CEUA, 11.794/2008.

3.9.1 Manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni* para ensaio *in vivo*.

A manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* foi feita de acordo com o item 3.8.2 reportados anteriormente neste trabalho (DE MORAES et al., 2012).

3.9.2 Preparo das amostras para ensaio *in vivo*

Os métodos de preparo dos complexos formados Cn/ β CD e Cn/HP β CD estão citados no item 3.4 deste trabalho. As amostras para ensaio via oral foram solubilizadas em tampão PBS e etanol na concentração final de cnicina de 13,37 mg/mL.

Para ensaio via intraperitoneal, as amostras foram solubilizadas também em etanol e tampão PBS atingindo concentração final de 2 mg/mL de cnicina.

3.9.3. Grupos experimentais de animais com administração por via oral

Para o tratamento via oral, camundongos fêmeos, da linhagem Swiss, pesando em média 20 g, foram infectados (injeção subcutânea) com 80 cercárias/animal. Os animais foram divididos em 4 grupos distintos (Tabela 7) contendo 4 animais cada. Como controle negativo, foi utilizado um grupo de animais não tratados (somente PBS e etanol). Os outros três grupos de animais ficaram para os tratamentos com cnicina pura, Cn/ β CD e Cn/HP β CD todos mantendo a concentração de cnicina de 100 mg/kg de animal. O início do tratamento ocorreu 42 dias após a infecção. O esquema terapêutico elaborado foi de 1 dose de 150 μ L /dia durante 3 dias de tratamento seguido de eutanásia dos animais no quarto dia.

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

Grupo	Tratamento	Dose	Número de doses
1	Controle	-	3
4	Cnicina	100,0 mg/kg	3
5	Cn/ β CD	400,0 mg/kg*	3
6	Cn/HP β CD	467,8 mg/kg*	3

*Os valores das doses dos complexos formados (Cn/ β CD e Cn/HP β CD) equivalem a 100 mg/kg de cnicina e se devem ao somatório das massas das moléculas de ciclodextrina e da cnicina, levando em consideração que a massa de β CD é 3 vezes maior que a de cnicina e de HP β CD apresenta massa 3,7 vezes maior que a cnicina. Os cálculos estão respeitando a estequiometria de formação dos complexos que foi de 1:1 e o valor da dose desejada final do ativo de 100 mg/Kg.

Fonte: Autor, 2019

3.9.4 Grupos experimentais de animais com administração via intraperitoneal

Para o tratamento via intraperitoneal, camundongos fêmeos, da linhagem Swiss, pesando em média 20 g, foram infectados com 80 cercárias/animal. Os animais foram divididos em 4 grupos distintos (Tabela 8) contendo 4 animais cada. Como controle negativo, foi utilizado um grupo de animais não tratados (somente PBS e etanol). Os outros três grupos de animais ficaram para os tratamentos com cnicina pura, Cn/ β CD e Cn/HP β CD todos mantendo a concentração de cnicina de 10 mg/kg de animal, O início do tratamento ocorreu 42 dias após a infecção. O esquema terapêutico elaborado foi de 1 dose de 100 μ L /dia durante 3 dias de tratamento, seguido de eutanásia dos animais no quarto dia.

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

Grupo	Tratamento	Dose	Número de doses
1	Controle	-	3
4	Cnicina	10,0 mg/kg	3
5	Cn/ β CD	40,0 mg/kg*	3
6	Cn/HP β CD	46,4 mg/kg*	3

*Os valores das doses dos complexos formados, Cn/ β CD e Cn/HP β CD, equivalem a 10 mg/kg de cnicina e se devem ao somatório das massas das moléculas de ciclodextrina e da própria substância cnicina, respeitando a estequiometria de formação que foi de 1:1 e o valor da dose desejada do ativo de 10 mg/Kg.

Fonte: Autor, 2019.

3.9.5 Oograma

Após eutanásia dos animais, foram recolhidos ovos da junção íleoecal e fezes para contagem e análise morfológicas dos ovos. Foram realizados contagem do número de ovos maduros, imaturos e contagem de ovos por grama de fezes (OPG).

3.9.6 Análises estatísticas

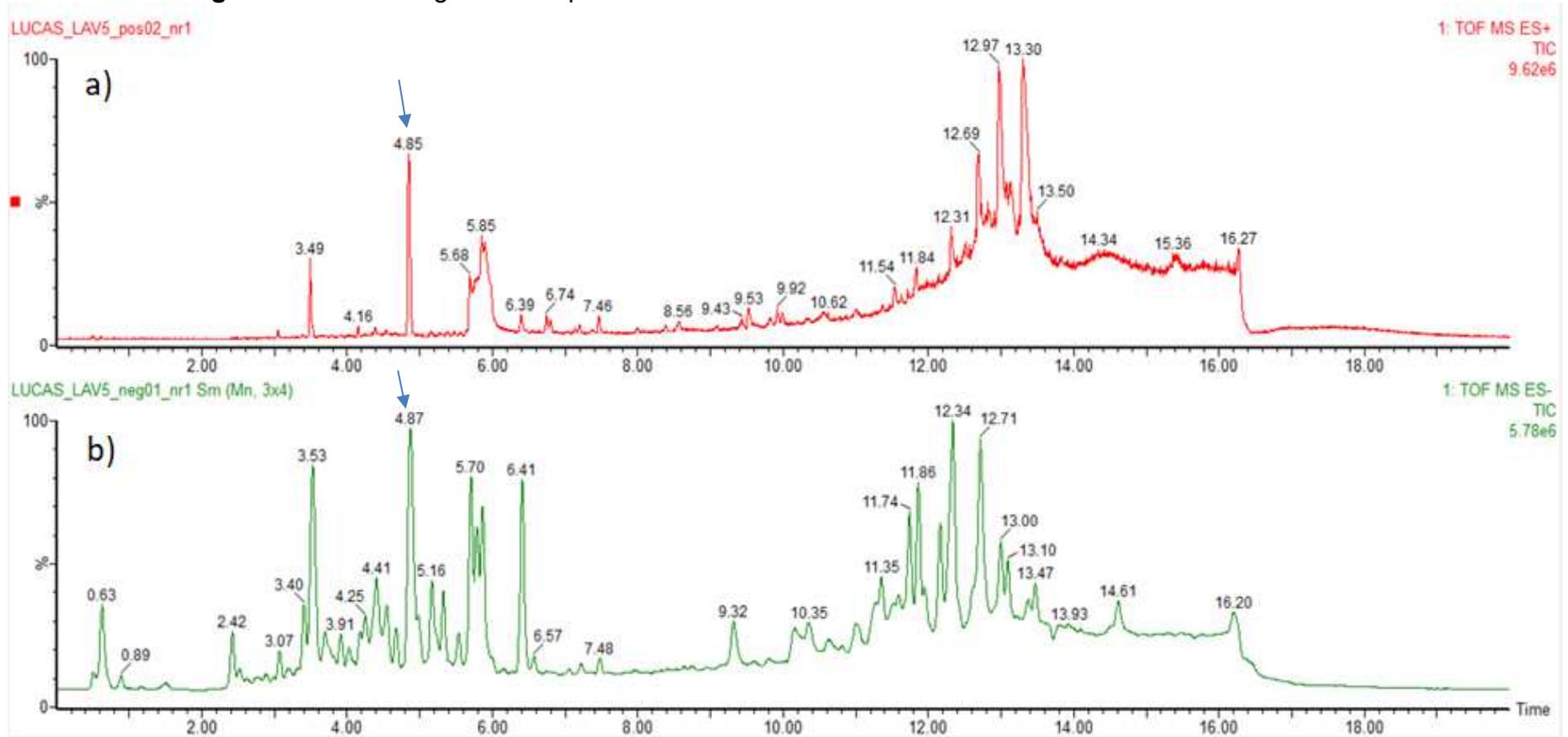
Os tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DA CNICINA NO EXTRATO DE *C. benedicta* POR CLUE-MS-Q-TOF

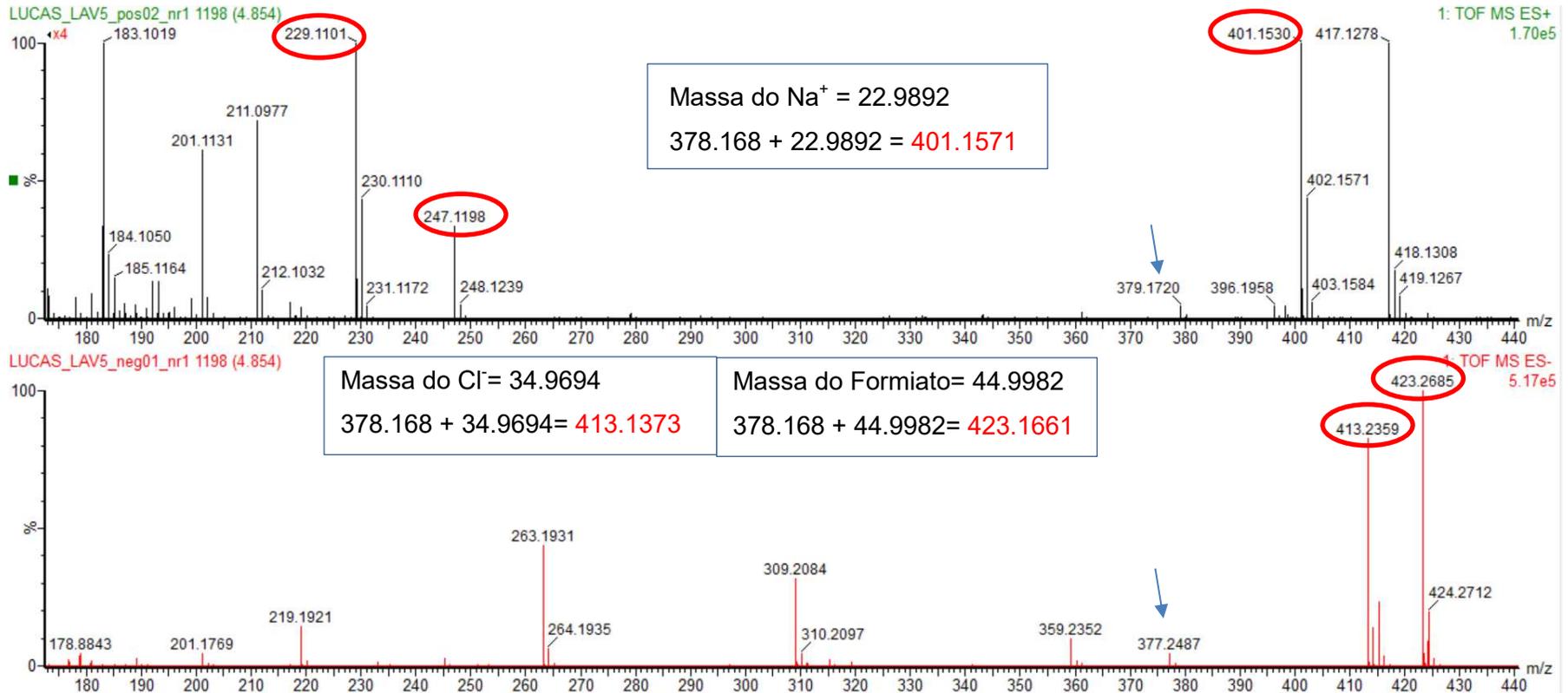
Após intenso processo de lavagem das partes aéreas, foram obtidos 15 g de extrato, o qual foi submetido a análise em CLUE-MS-Q-TOF. Após análise, foi possível observar no extrato a presença de uma substância com mesmo perfil de fragmentação da cnicina. No entanto, seu perfil de fragmentação foi caracterizado pela formação de adutos, tanto para modo positivo quanto no modo negativo. Na figura 22, é possível observar o cromatograma do extrato em modo positivo (Figura 22a) e no modo negativo (Figura 22b). Pode-se observar, no tempo de retenção de 4,85 (modo positivo) e 4,87 (modo negativo), a presença de uma substância que, após análise do perfil de fragmentação, foi identificada como sendo a cnicina. Para análise do perfil de fragmentação dessa substância, o espectro de massas foi gerado (Figura 23), devido à massa exata da cnicina de 378,168 g/mol, era esperado o aparecimento do sinal com massa carga (m/z) $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$ para os modos positivos (+) e negativos (-), respectivamente. De fato, tais sinais foram observados sendo eles 377,2487 m/z (-) e 379,172 m/z (+), no entanto, os sinais de maior intensidade foram de 423,268 m/z (-) o que indica uma possível ligação do fragmento ao íon formiato (44,9982), logo $378.1679 + 44.9982 = 423.1661$. Outro sinal com grande intensidade foi o de 413,2359 nesse caso ocorre possível formação de aduto com íon cloreto, já que massa do Cl= 34.9694, logo $378.1679 + 34.9694 = 413.1373$. Para o modo positivo, o sinal 401,1530 indica possível formação de aduto com íon sódio, sendo a massa do sódio 22.9892, logo $378.1679 + 22.9892 = 401.1571$. Todos os fragmentos foram comparados com dados presentes na literatura (BERGER, 2009) e estão ilustrados em mais detalhes na tabela 9.

Figura 22 - Cromatograma e espectro de massas do extrato de *C. benedicta* evidenciando a cricina



Fonte: Autor, 2019.

Figura 23 - Cromatograma e espectro de massas do extrato de *C. benedicta* evidenciando a cricina



Fonte: Autor, 2019.

Tabela 9 - Fragmentos gerados pela cnicina no modo positivo e negativo

Substância	TR (min)	m/z experimental [M+H]⁺ e fragmentos via MS/MS	m/z experimental [M+H]⁻ e fragmentos via MS/MS	Fórmula molecular
Cnicina	4.85	401.1530 [M+Na] ⁺ ; 379.1680; 247.1198; 229.1101	423.2685 [M+HCOO] ⁻ ; 413.2359 [M+Cl] ⁻ ; 377.2487	C ₂₀ H ₂₆ O ₇

Fonte: Autor, 2019.

4.2 ISOLAMENTO DA CNICINA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A partir de 15 g do extrato de *C. benedicta*, foi então realizada uma CLV com intuito de isolar ou obter uma fração mais pura contendo cnicina. A fase móvel inicial foi de clorofórmio (CHCl_3) 100% com adição de metanol em gradiente crescente de polaridade. Foram obtidas num total de 17 frações (Figura 24) ao término da coluna com 100 % metanol.

Figura 24 - Frações obtidas após separação por coluna cromatográfica a vácuo



Fonte: Autor, 2018.

Durante a passagem de solvente na proporção metanol 5 % pela coluna cromatográfica (fração 8), um precipitado começou a se formar no fundo do balão que, ao ser rotaevaporado, formava um precipitado branco quase cristalizado por toda extensão do fundo do balão. Esse resultado se estendeu até o final da fração 8, os quais foram então recuperados com clorofórmio, o qual não solubilizava completamente a amostra, mas auxiliava na retirada do precipitado do balão. Esse produto foi posteriormente filtrado a vácuo e todo sólido recuperado e armazenado para secagem e identificação. Foram obtidos, ao final do processo, 3,198 g de cnicina (21,33% de rendimento) (Figuras 25 e 26) o que destaca a grande eficiência desse processo de extração, principalmente, para técnica de lavagem das folhas que tornou nosso extrato final muito mais limpo e seletivo para o isolamento de substâncias presentes nos anexos foliares.

Figura 25 - Precipitado formado no balão após rotaevaporação e filtrado



Fonte: Autor, 2018.

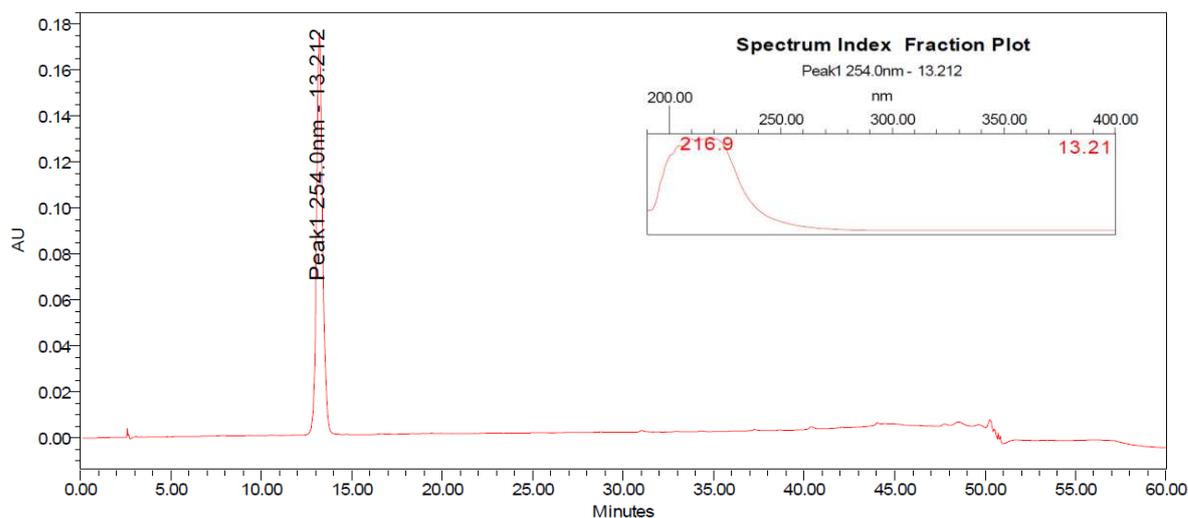
Figura 26- Frascos contendo cnicina ao final do processo



Fonte: Autor, 2018.

O precipitado branco também foi submetido a análise em CLAE-DAD no comprimento de 254 nm (Figura 27). O espectro de UV foi analisado, indicando máximo de absorção em 216 nm. Dado este que corrobora com resultados encontrados na literatura, em que cnicina demonstra o efeito Cotton negativo que é atribuído a uma transição da γ -lactona α,β -insaturada em 218 nm em MeOH de acordo com Uchida e Kuriyama (1974). No cromatograma, é possível a observação apenas de um único pico em 13,21 minutos, o que sugere alta pureza desta substância isolada.

Figura 27 - Cromatograma da fração isolada do extrato de *C. benedicta*



Fonte: Autor, 2019.

4.2.1 Caracterização da cnicina por RMN ^1H e ^{13}C .

A amostra também foi submetida a identificação espectroscópica por RMN de ^1H a 500 MHz (Figura 28) e os resultados foram comparados a dados prévios da literatura, os quais foram obtidos em 200MHz (BERGER, 2009; CHAIN et al., 2014) (Tabela 11).

A análise de RMN de ^1H a 500MHz permitiu observar que todos os 26 hidrogênios esperados da molécula da cnicina fossem identificados, mesmo aqueles ligados a oxigênio.

De acordo com a literatura (BERGER, 2009; CHAIN et al., 2014), o espectro RMN de ^1H da cnicina deve apresentar quatro sinais de absorção na região de 6,3 a 5,7 ppm, evidenciando quatro simpletos. No entanto, uma análise mais detalhada da expansão do espectro revela um duplete para H-13b e outro duplete para H-13a (Figura 29a), ambos apresentando $^2J = 2,0$, demonstrando que os hidrogênios acoplam entre si. O acoplamento entre H-5'a e H-5'b e possíveis acoplamentos com outros hidrogênios serão discutidos mais à frente por cruzamento de sinais em RMN ^1H 2D COSY (Figura 30).

Os próximos oito sinais entre 5,30 e 4,30 ppm (Figura 29b), correspondem a cinco hidrogênios metínicos. Os outros três sinais, nessa mesma região, são referentes aos hidrogênios de hidroxilas e estão descritos mais adiante. Em 4,68

ppm observa-se um tripleto correspondente ao hidrogênio OH-4' ligado a um oxigênio que acopla à H-4'a e H-4'b com ${}^3J = 5,9$ Hz e ${}^3J = 5,8$ Hz. O sinal em 4,91 ppm se refere ao hidrogênio OH-15, o qual está ligado a um oxigênio, possuindo as constantes de acoplamento ${}^3J = 5,65$ Hz e ${}^3J = 4,4$ Hz, referentes aos acoplamentos com H-15b (3,88 ppm) e H-15a (4,08 ppm). H-15a e H-15b são hidrogênios diastereotópicos e, portanto, acoplam entre si com ${}^2J = 11,6$, dessa forma, ambos são identificados como duplo duplete na figura 29, c. Já o sinal em 5,15 ppm refere-se ao hidrogênio OH-3' também ligado a oxigênio, ocorrendo como duplete com ${}^3J = 5,0$ Hz, estando acoplado a H-3'. Os acoplamentos com hidrogênios de hidroxilas e as atribuições, apesar de não evidenciados na literatura, foram atribuídos por COSY neste trabalho.

Já os sinais na região de 3,25 – 3,30 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-4'b, H-4'a e H-7, sendo os dois primeiros hidrogênios diastereotópicos geminais. Suas atribuições e acoplamentos foram obtidas através da técnica de mapeamento de contorno, COSY e serão discutidas a seguir. Assumindo que dois hidrogênios se encontram na mesma região magnética que o solvente DMSO, revelando uma integral para dois hidrogênios no deslocamento químico de 2,52 ppm, os outros quatro sinais entre 2,5 e 1,8 ppm são relacionados aos três grupos metílicos diastereotópicos. Finalmente, o simpleto em 1,44 ppm (3H) possui deslocamento químico característico de grupos metílicos ligados a ligação dupla, sendo este sinal atribuído ao H-14.

Embora no RMN de ${}^1\text{H}$ as constantes de acoplamento ${}^2J_{HH}$ para os hidrogênios metilênicos sejam bem reduzidas, com valores de J entre 0 e 2 Hz, a análise do experimento de COSY revela (em sua região inferior, na extrema esquerda), sinais evidentes de acoplamento entre o primeiro (δ 6,21) e terceiro (δ 5,96) sinais, bem como acoplamento entre segundo (δ 6,07) e quarto (δ 5,72) sinais (Figura 30).

Os sinais na região 6,07 e 5,72 ppm, quando analisados por meio do cruzamento por COSY, também evidenciam acoplamento com H-7 (3,28 ppm). Assim, foi possível atribuí-los aos hidrogênios metilênicos H-13b e H-13a. Acoplamento similar também pode ser observado entre os hidrogênios H-5'a e H-5'b (com deslocamento de 5,97 e 6,22 ppm) e o hidrogênio H-3' (4,35 ppm). Já tendo atribuído H-7 em 3,28 ppm pelo cruzamento de sinais, evidenciou-se os dois acoplamentos de H-7 com H-6 e H-8 em 5,23 e 5,08 ppm. Dessa forma, é esperado

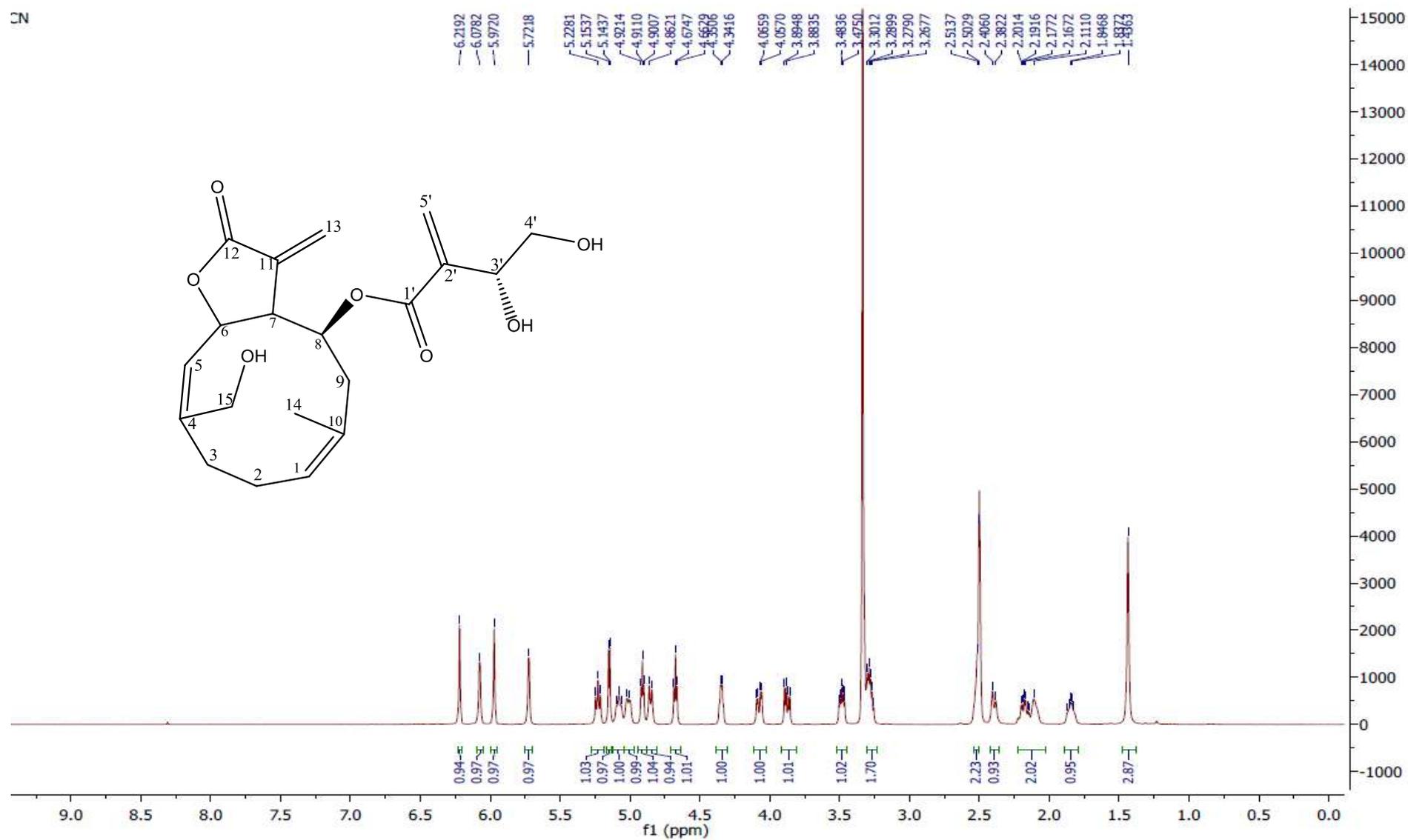
que H-6 acople por 3J com H-7 em 3,28 ppm e com H-5 em 4,85 ppm. Assim, H-8 obviamente irá também acoplar com H-7 e com H-9b localizado em 2,39 ppm e H-9a em 2,52 ppm. Seguindo o cruzamento dos sinais por COSY, H-9b deve acoplar com H-14 em 1,44 ppm e fracamente por 5J acoplar com H-2a e H-2b na faixa de 2,10 – 2,20 ppm, provavelmente devido ao encurtamento da distância entre os hidrogênios pela presença da ligação π .

O acoplamento entre H-9b e H-9a por 2J , também é esperado e está, de fato, evidenciado no cruzamento dos sinais, o qual também revela acoplamento com H-1 em 5,01 ppm e H-8 em 5,08 ppm. Conseqüentemente, H-1 acoplará com H-2a e H-2b (3J) e H-9b (4J), mas não com H-9a em 2,52 ppm, como demonstra os dados de COSY. H-2a e H-2b irão acoplar entre si por 2J geminal.

Os hidrogênios H-15b e H-15a são diastereotópicos, acoplam entre si e com hidrogênio ligado a oxigênio OH-15, como mencionado anteriormente, com deslocamento em 4,91 ppm formando um duplo duplete, a formação dos sinais de duplo duplete. A formação do duplo duplete bem como o tripleto formado por OH-15, pode, ser observadas com detalhes na figura 31.

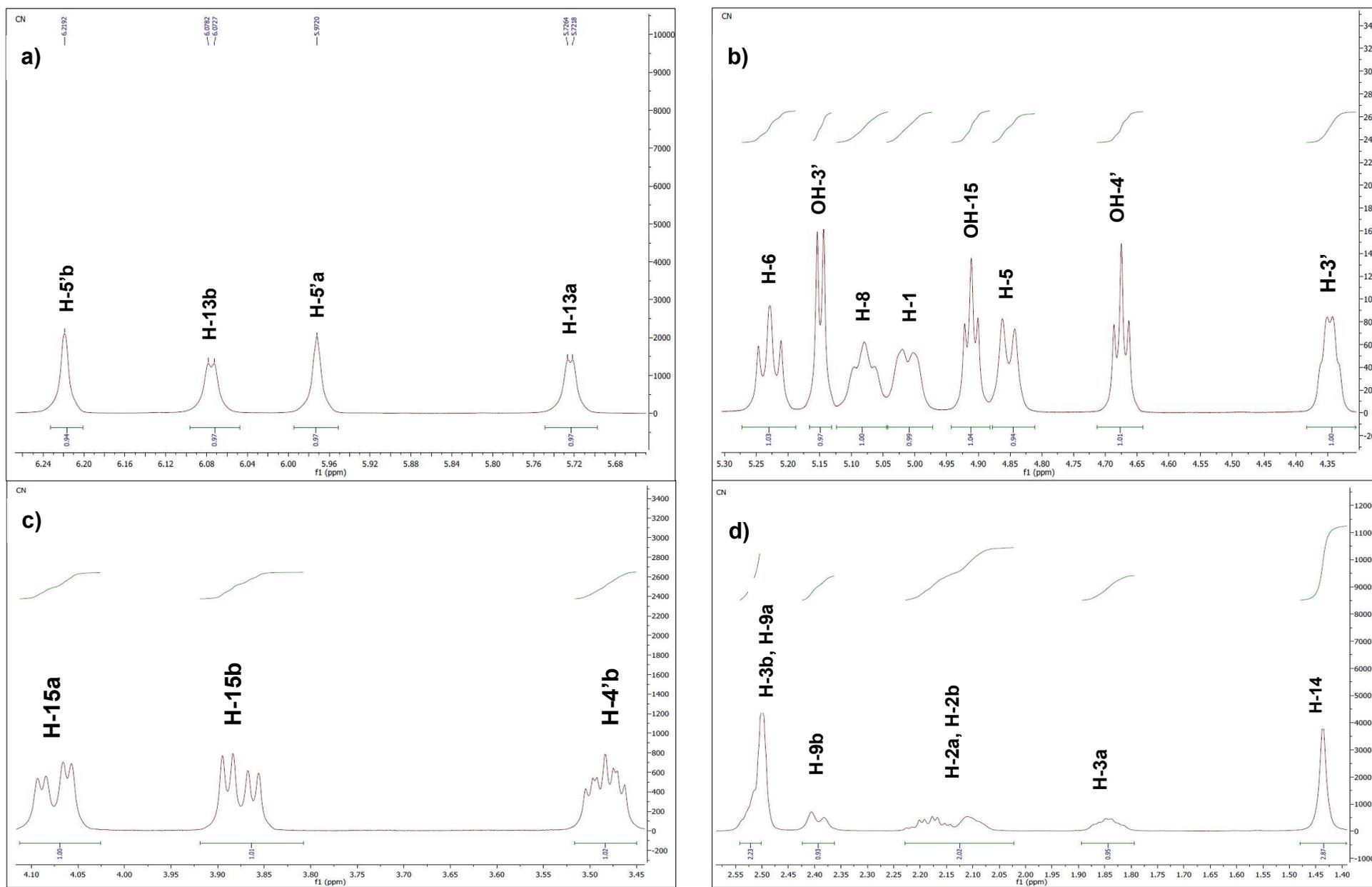
Seguindo o cruzamento das linhas de acoplamento no experimento de COSY (Figura 32), H-4'a (3,28 ppm) e H-4'b (3,48 ppm) acoplam entre si e mostram acoplamentos com os hidrogênios esperados, H-3' e o hidrogênio ligado a oxigênio OH-4' com deslocamento químico em 4,35 ppm e 4,68 ppm (Figura 32a), respectivamente. H-5'a demonstra por COSY acoplamento com H-3' por 4J . O hidrogênio ligado a oxigênio, OH-3', irá acoplar somente com H-3', o que caracteriza o duplete no RMN 1H em 5,15 ppm (Figura 32b).

Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina



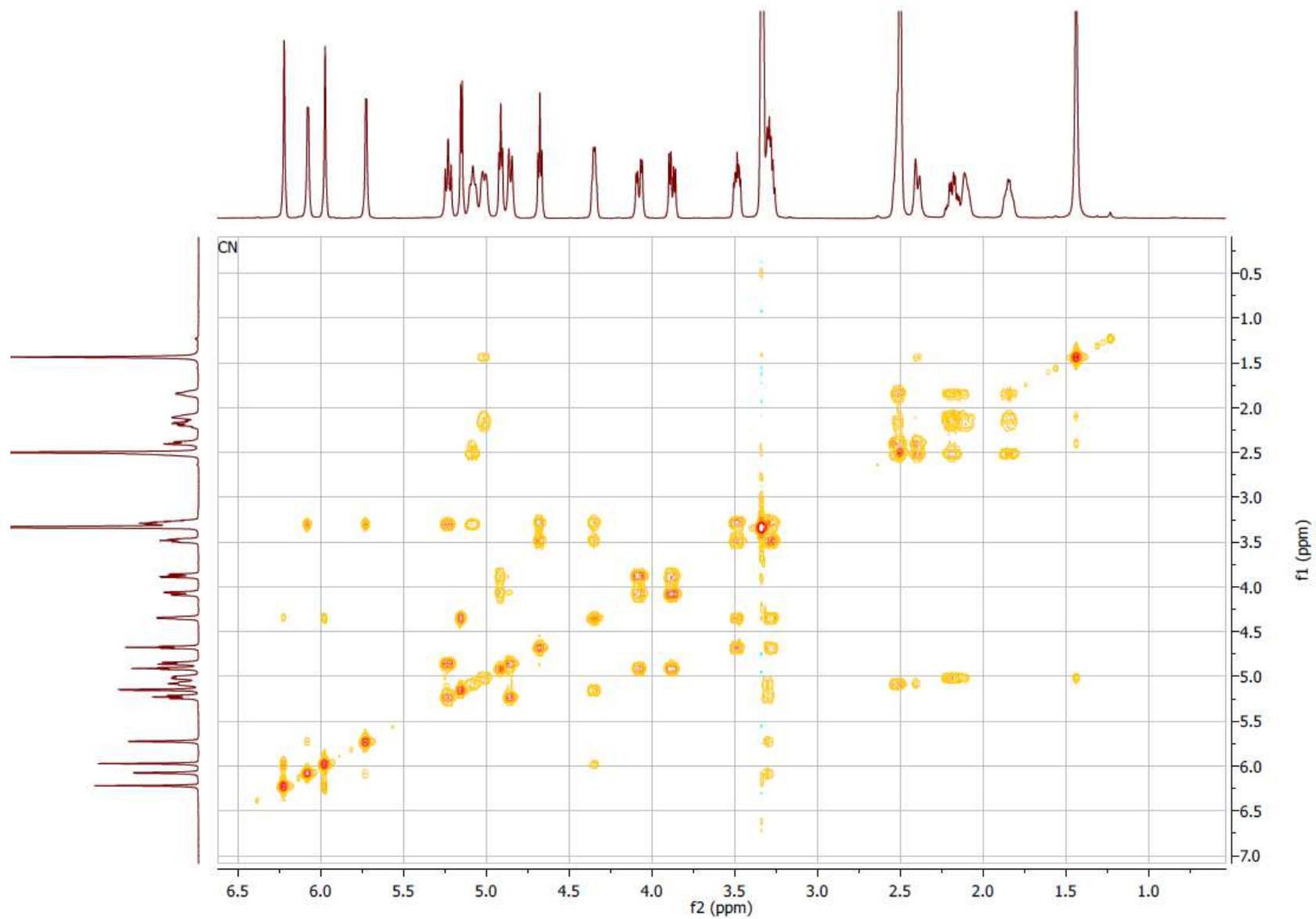
Fonte: Autor, 2019.

Figura 29 - Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina a) 5,68 – 6,24 ppm b) 5,30 – 4,30 ppm c) 4,10 – 3,45 ppm d) 1,44-2,55 ppm



Fonte: Autor, 2019.

Figura 30- Mapa de contorno COSY de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina



Fonte: Autor, 2019.

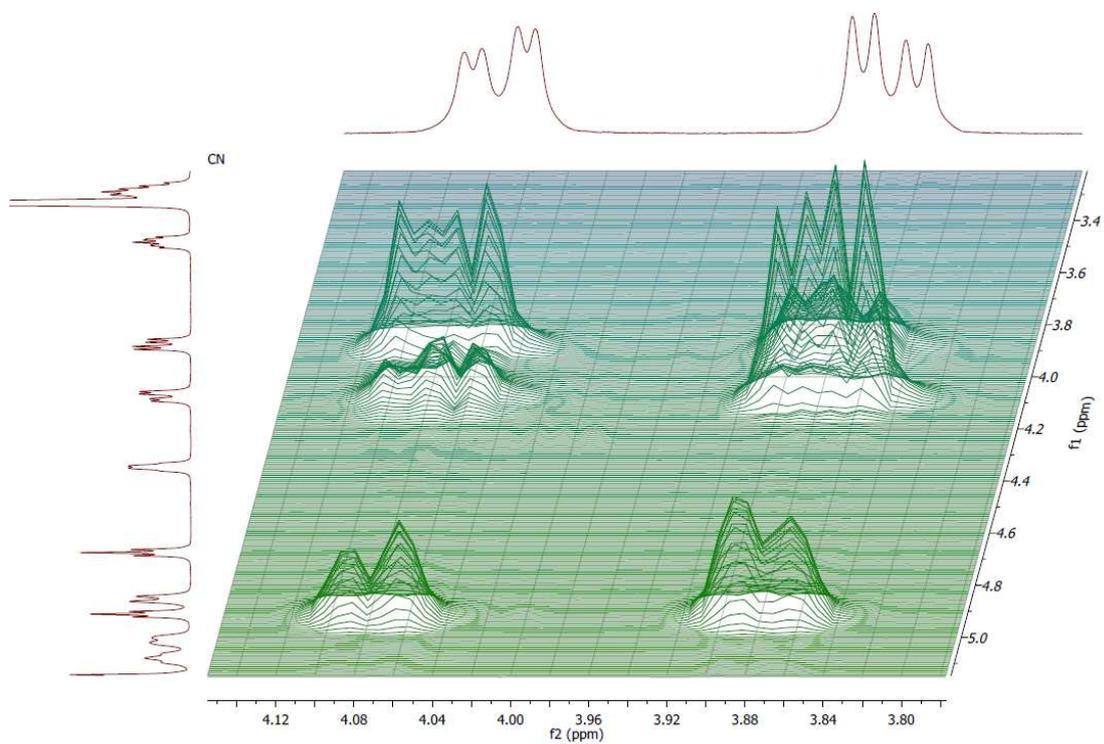
Tabela 10 - Deslocamentos químicos δ (ppm) observados e calculados da cricina

Hidrogênios	Literatura (Chain et al., 2014) δ (ppm) (200 MHz) multiplicidade	Experimental δ (ppm) (500 MHz) multiplicidade, integral
H-14	1,43 (s)	1.44 (s) (3H)
H-3a	1,84 (m)	1.84 (m) (1H)
H-2a, H-2b	2,10 (m); 2,18 (m)	2,10 – 2,20 (m) (2H)
H-9b	2,39 d	2,39 (d) (1H)
H-3b, H-9a	2,50 2,51	2,52 (m) (2H)*
H-7, H-4'a	3,26 (m); 3,29 (m)	3,25 – 3,30 (m) (2H)
H-4'b	3,48 (m)	3,48 (m) (1H)
H-15b	3,88 (dd)	3,88 (dd) (1H)
H-15a	4,10 (dd)	4,08 (dd) (1H)
H-3'	4,33 (m)	4,35 (m) (1H)
OH-4'	-	4,68 (t) (1H)
H-5	4,86 (d)	4,85 (d) (1H)
OH-15	-	4,91 (t) (1H)
H-1	5,00 (d)	5,01 (m) (1H)
H-8	5,06 (m)	5,08 (m) (1H)
OH-3'	-	5,15 (d) (1H)
H-6	5,22 (t)	5,23 (t) (1H)
H-13a	5,71 (s)	5,72 (s) (1H)
H-5'a	5,96 (s)	5,97 (s) (1H)
H-13b	6,07 (s)	6,08 (s) (1H)
H-5'b	6,21 (s)	6,22 (s) (1H)

Fonte: Autor, 2019

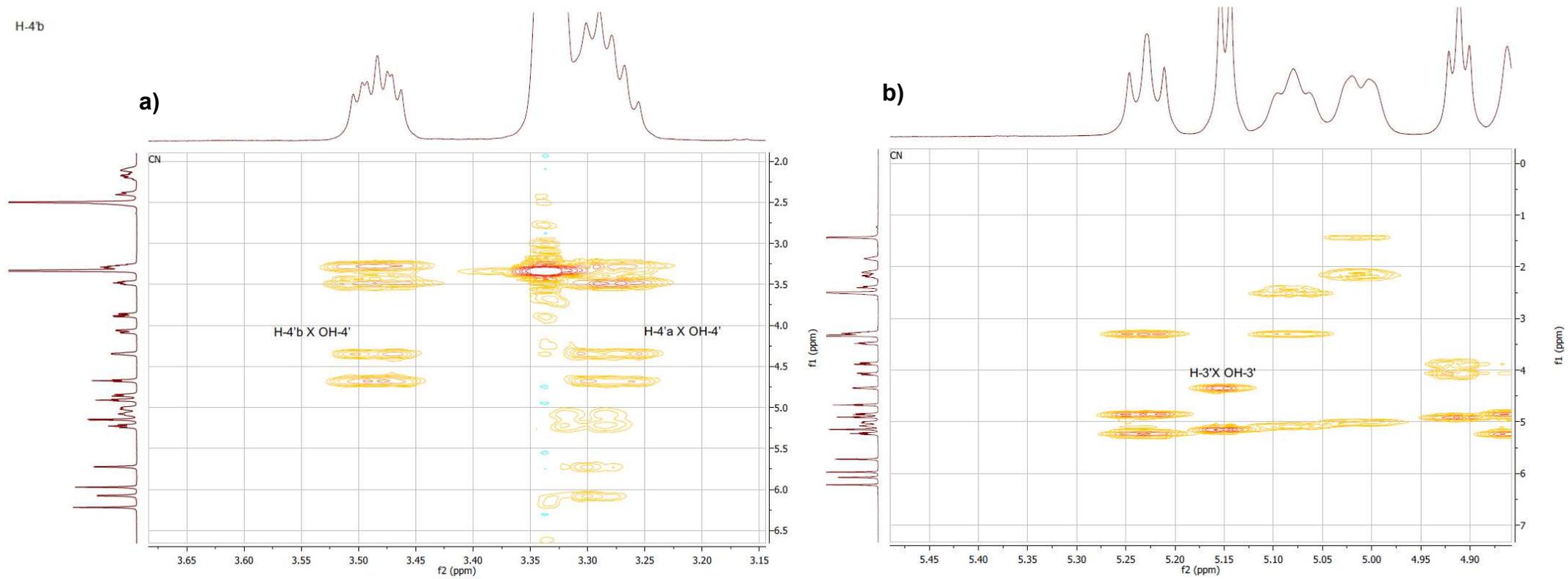
* Sinais de hidrogênios observados na região do solvente DMSO-d₆.

Figura 31 - Expansão do mapa de contorno COSY modo *stacked plot* de RMN de ^1H (500 MHz) da Cnicina, região de 3,80 ppm a 4,12 ppm



Fonte: Autor, 2019.

Figura 32 - Expansão do mapa de contorno COSY de RMN de ^1H (500 MHz) da cnicina

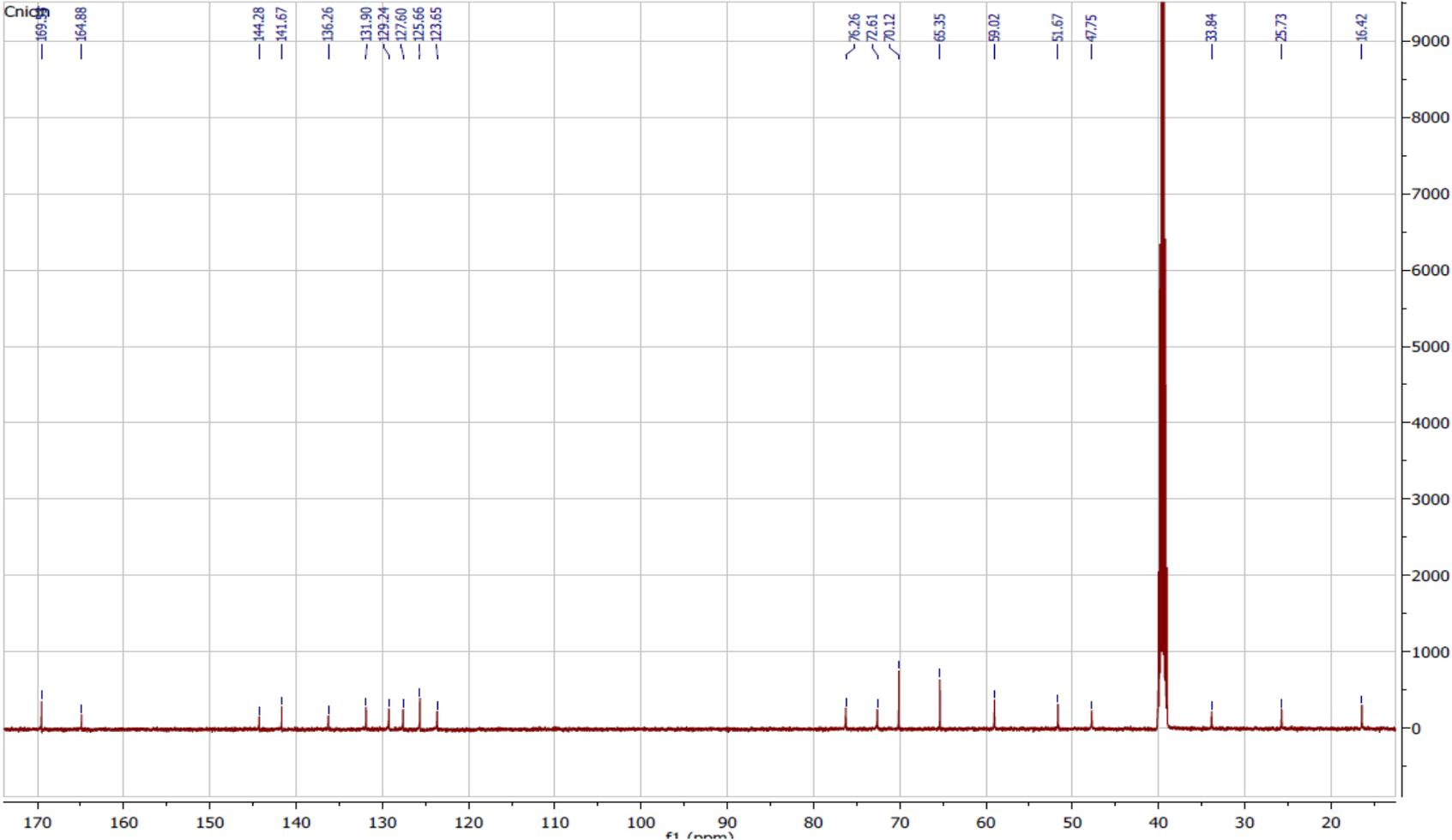


Fonte: Autor, 2019.

A amostra também foi submetida a identificação espectroscópica por RMN de ^{13}C a 125 MHz e os resultados foram comparados a dados prévios da literatura, realizados a 50 MHz (BERGER, 2009; CHAIN et al., 2014), confirmando a identificação da molécula.

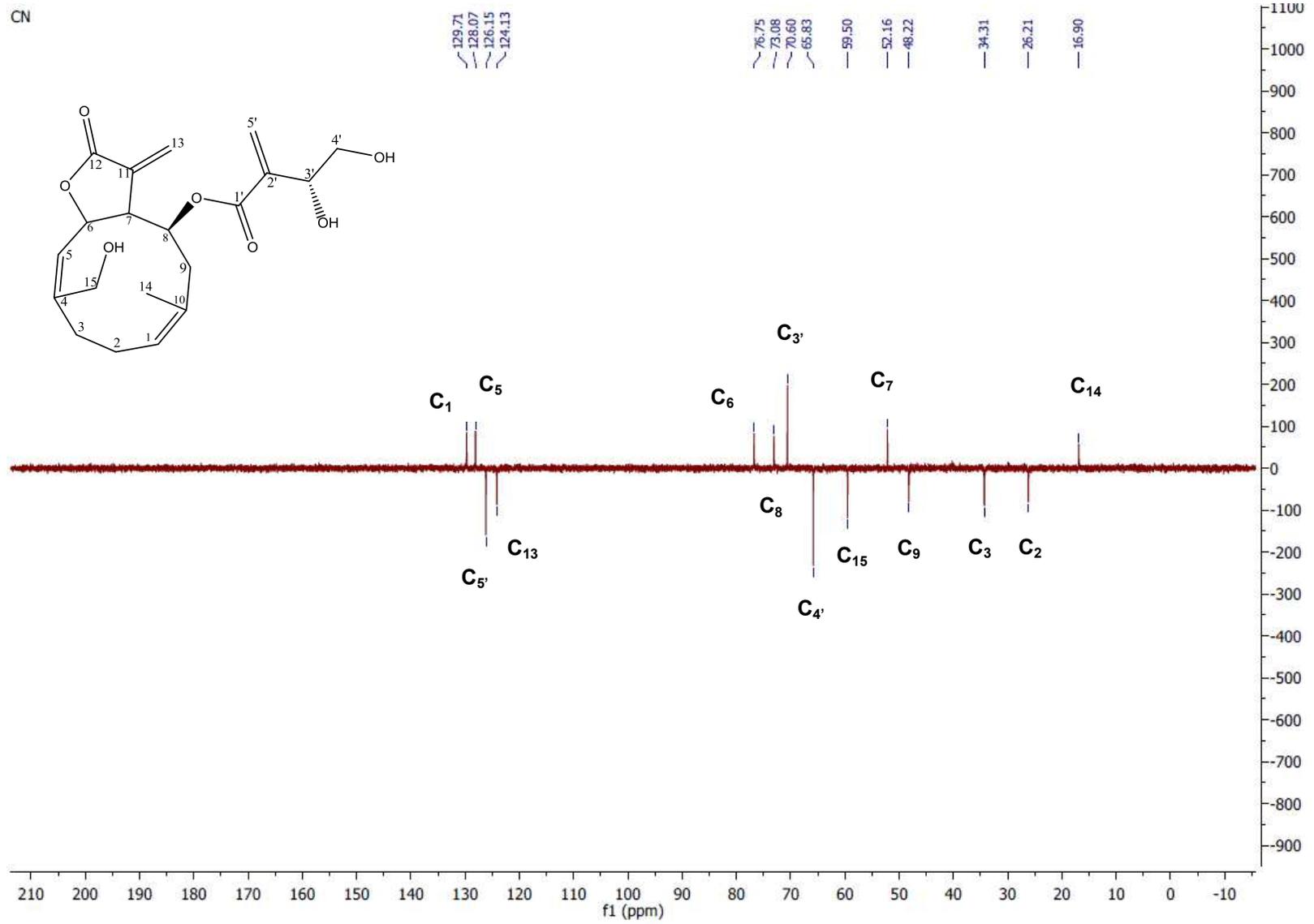
Para a análise por RMN de ^{13}C são esperados 20 sinais para a cnicina (Figura 33). Pela análise do RMN de ^{13}C pode-se observar a presença de sinais referentes aos carbonos carbonílicos C-12 e C-1' em 169,5 e 164,8 δ (ppm), respectivamente. Esses sinais são seguidos de outros quatro sinais referentes a carbonos olefínicos quaternários, até o deslocamento de 131,9 δ (ppm), o qual é referente ao C-10. Já os sinais em 125,6 e 123,6 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos terminais C-5' e C-13, respectivamente. Na região de CHO, como é previsto pela estrutura, foram encontrados seis sinais entre os deslocamentos 80 e 50 ppm, seguido de três outros carbonos metilenos alifáticos, C-9, C-3 e C-2, terminando com o carbono metílico C-14, com deslocamento de 16,4 ppm (Tabela 12). Com objetivo de diferenciar os carbonos presentes na estrutura da molécula em CH, CH₂, CH₃, o experimento de *DEPT* de ^{13}C foi realizado (Figura 34). Neste espectro, podemos observar a presença de 7 sinais negativos, referentes aos grupos CH₂ da molécula, bem como a presença de 7 sinais positivos. Para estes, somente o sinal em 16,90 ppm referente ao único carbono sp³, sendo os restantes referentes aos carbonos metílicos presentes. Uma vez que os carbonos não hidrogenados não aparecem no *DEPT*, seis carbonos não foram observados *DEPT*.

Figura 33 - Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz) da Cnicina



Fonte: Autor, 2019.

Figura 34 - Espectro de RMN de ¹³C DEPT (125 MHz) da Cnicina



Fonte: Autor, 2019.

Tabela 11 - Deslocamentos químicos δ (ppm) observados e calculados da Cnicina

Carbonos	Literatura (BERGER, 2009) (50 MHz) δ (ppm)	Experimental (125 MHz) δ (ppm)
C-14	16.4	16.4
C-2	25.7	25.7
C-3	33.8	33.8
C-9	47.7	47.7
C-7	51.7	51.6
C-15	59.0	59.0
C-4'	65.3	65.3
C-8	72.6	72.6
C-6	76.2	76.2
C-3'	70.1	70.1
C-13	123.6	123.6
C-5'	125.6	125.6
C-10	131.8	131.9
C-5	127.5	127.6
C-1	129.2	129.2
C-11	136.2	136.2
C-2'	141.6	141.6
C-4	144.2	144.2
C-12	169.5	169.5
C-1'	164.8	164.8

Fonte: Autor, 2019.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO FORMADOS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO (IV)

4.3.1 Análise no estado sólido

A espectroscopia de Infravermelho é uma das principais ferramentas para a caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido. Quando moléculas interagem para formar complexos de inclusão, podem ocorrer alterações no momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais destas moléculas. Essas alterações podem provocar aumento ou redução de bandas, restrição ou intensificação do movimento vibratório que se reflete no espectro de IV, como deslocamento, redução ou supressão das bandas (BARBOSA, 2011).

Quando tratamos dos complexos de inclusão, as moléculas hospedes podem interagir com a cavidade das ciclodextrinas, o que irá gerar uma série de interações intermoleculares, alterando a distribuição eletrônica sobre os núcleos atômicos. Dessa forma, os momentos de dipolo e os grupos funcionais de cada molécula podem sofrer alterações que resultam em alteração das bandas no espectro de infravermelho. O deslocamento de bandas também poderá ocorrer, uma vez que essa interação intermolecular pode originar de uma restrição ou intensificação do movimento vibratório. Dessa forma, foram avaliadas as interações intermoleculares entre a molécula hóspede cnicina (Cn) e as ciclodextrinas, β CD e HP β CD, através dos respectivos espectros de infravermelho da mistura mecânica e dos compostos de inclusão por co-precipitação.

Em análise geral, é possível perceber que a interação entre a ciclodextrina, β CD e HP β CD, com cnicina geram alterações e desvios de intensidade de várias bandas nos espectros. Na figura 35, está representado o espectro de IV da β CD, cnicina, cnicina complexada com β CD (Cn/ β CD), e mistura mecânica (MM) entre hóspede e hospedeiro. Os espectros da cnicina foram comparados com dados da literatura, o que confirmaram a presença das principais bandas das substâncias (CHAIN et al, 2014).

No espectro da β CD, observa-se as bandas características dessa molécula, sendo elas: uma banda associada aos estiramentos simétricos e assimétricos da ligação química O-H ($\nu_{(O-H)}$) com mínimo em 3393 cm^{-1} ; uma banda em 2920 cm^{-1}

atribuídos à $\nu(\text{C-H})$, CH_2 e CH_3 ; uma banda em 1625 cm^{-1} referente a deformações $\delta_{(\text{O-H})}$ de moléculas de água de hidratação e bandas em 1148 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} que estão associadas aos estiramentos $\nu(\text{CO-C})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{O-C-H})$, $\delta(\text{C-C-O})$ observados na maioria dos sacarídeos e atribuídas às vibrações do anel piranose e aos estiramentos assimétricos das ligações glicosídicas (EGYED, 1990).

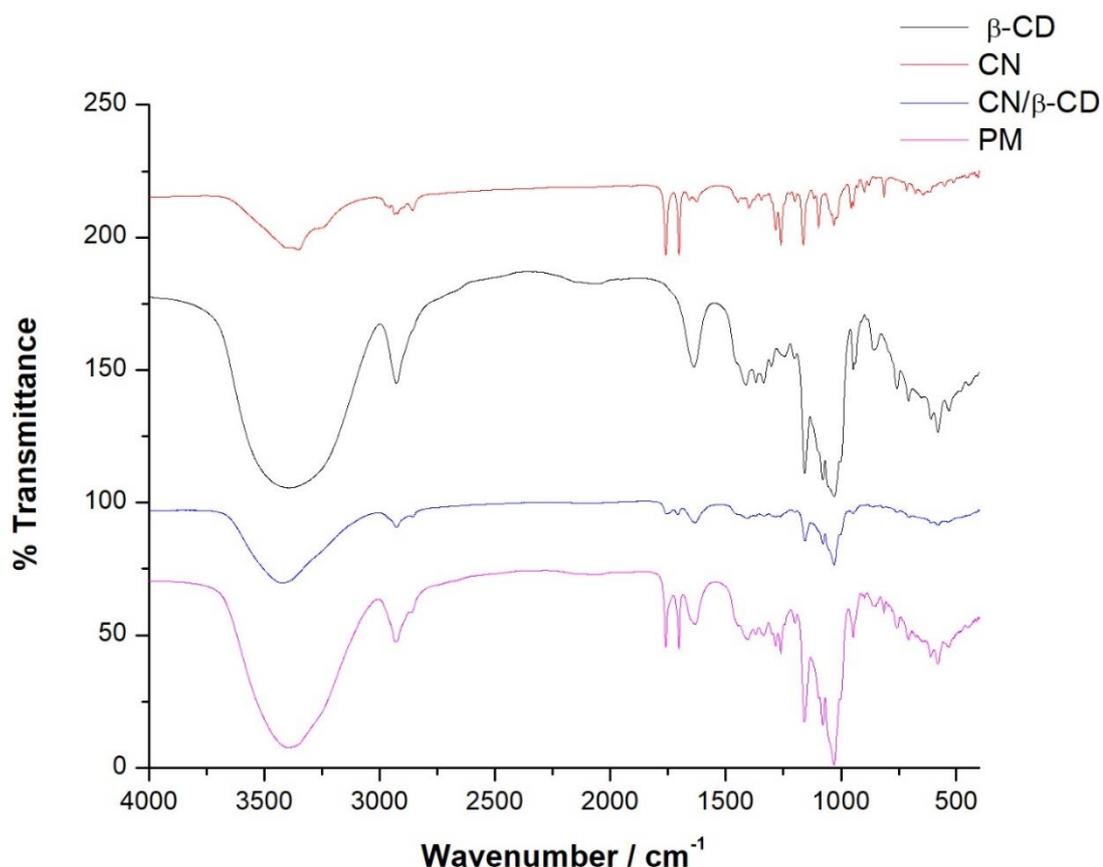
No espectro da cnicina, observa-se uma banda com mínimo em 3350 cm^{-1} , característico associado ao estiramento das três esperadas O-H, de acordo com outros compostos contendo grupos OH, a forma e a amplitude das bandas de Infravermelho indicam a existência de ligações intramoleculares nos grupos O-H. A região de 2964 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} corresponde a vibrações simétricas e assimétricas do estiramento CH_2 . Os dois modos de estiramento de C=O pertencem ao grupo COO e ao anel de lactona da cnicina, ambos podem ser facilmente identificados pelo espectro de IV como intensas bandas em 1752 cm^{-1} e 1695 cm^{-1} . As bandas em 1653 e 1612 cm^{-1} correspondem as vibrações dos grupos C=C , que se localizam no anel de dez membros da cnicina. As bandas de 1439 cm^{-1} e 1389 cm^{-1} estão associadas aos modos de deformação $\delta(\text{CH}_3)$.

Na mistura mecânica (MM), não se observa mudanças significativas das principais bandas que são observadas para Cn e βCD . O resultado do espectro de IV para MM se dá devido a sobreposição das bandas encontradas em Cn e βCD . As bandas de 1290 e 1250 cm^{-1} estão associadas à deformação angular rotacional (ρ) das ligações do grupo $\rho(\text{CH}_2)$.

Na formação do complexo Cn/ βCD pelo método de co-precipitação, é possível identificar várias mudanças no espectro de IV, como: afinamento e redução da transmitância da banda em 3377 cm^{-1} , que são referentes às hidroxilas, devido a um novo padrão de ligações de hidrogênio que são formadas. Ocorre grande redução da banda em 1625 cm^{-1} referentes a moléculas de água de hidratação; atenuação da banda em 2920 cm^{-1} associada a βCD ; modificação das bandas correspondentes ao estiramento do grupo C=O em 1752 cm^{-1} e 1695 cm^{-1} ; e quase desaparecimento do das bandas em 1148 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} que estão associadas aos estiramentos $\nu(\text{CO-C})$, $\nu(\text{C-C})$, $\delta(\text{O-C-H})$, $\delta(\text{C-C-O})$ da βCD . Todas essas modificações de bandas corroboram com a ideia da formação de um novo composto de inclusão, através de interações intermoleculares não covalentes, pois a presença da Cn na cavidade interna da βCD promove alterações como a saída de moléculas de água,

que conseqüentemente irá reduzir o número de ligações de hidrogênio. Assim como as mudanças nas bandas de Cn referentes ao grupo C=O, o que sugere uma interação dos grupos presentes tanto na cadeia lateral quanto no anel lactônico da Cn com a cavidade da ciclodextrina.

Figura 35 - Espectro de infravermelho da cnicina (Cn), β CD, Cn/ β CD e Mistura mecânica de cnicina e β CD



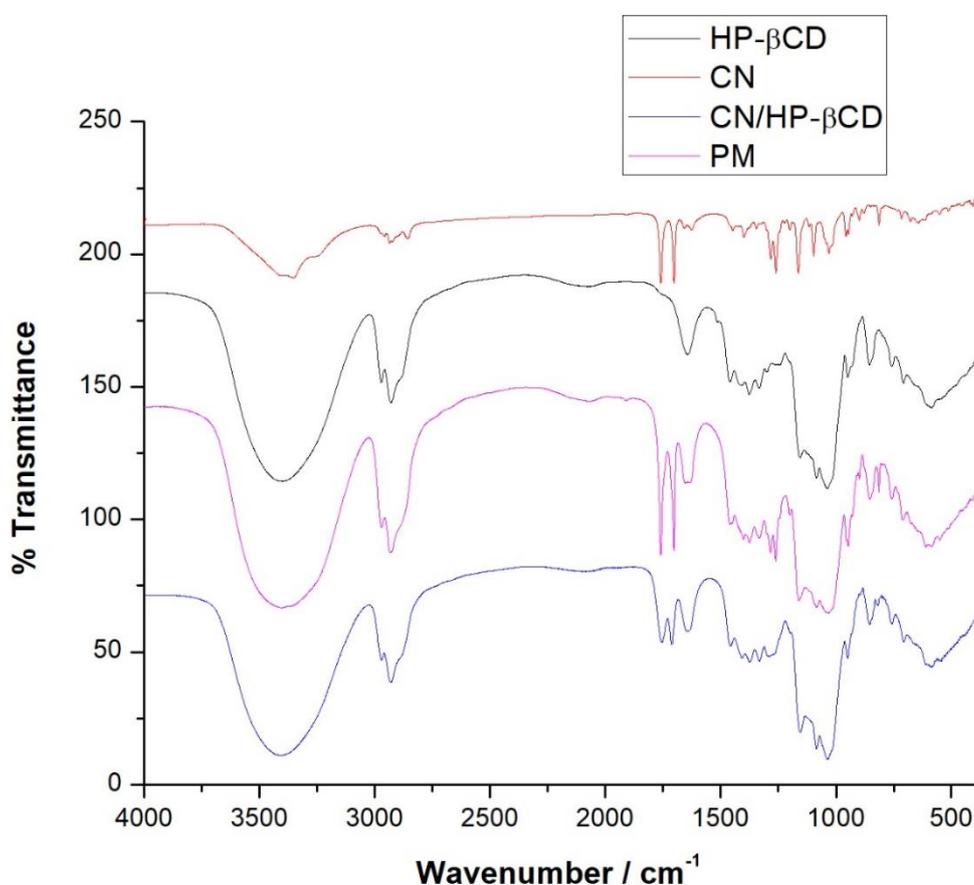
Fonte: Autor, 2019

A figura 36 mostra o espectro na região do infravermelho da HP β CD, Cn, mistura mecânica (MM) e do complexo de inclusão formado. Em análise das bandas da HP β CD, é possível observar que o espectro revela absorções típicas da β CD, a absorção em 1150 cm^{-1} que é característica das vibrações do anel piranose e estiramentos assimétricos das ligações glicosídicas, como descrito anteriormente e o estiramento em 3390 cm^{-1} característico dos grupos OH.

Em relação ao complexo de inclusão, observa-se que ocorre um somatório das bandas pertencentes a Cn juntamente com as bandas encontradas em HP β CD,

com destaque para as regiões de absorção da HP β CD, pois, na grande maioria das vezes, seu sinal sobrepõe os sinais da Cn. É possível concluir que pouca modificação ocorre no espectro de absorção do complexo de inclusão, o que se assemelha muito ao que acontece com a mistura mecânica.

Figura 36 - Espectro de infravermelho da cnicina (Cn), HP β CD, Cn/HP β CD e Mistura mecânica de cnicina e HP β CD



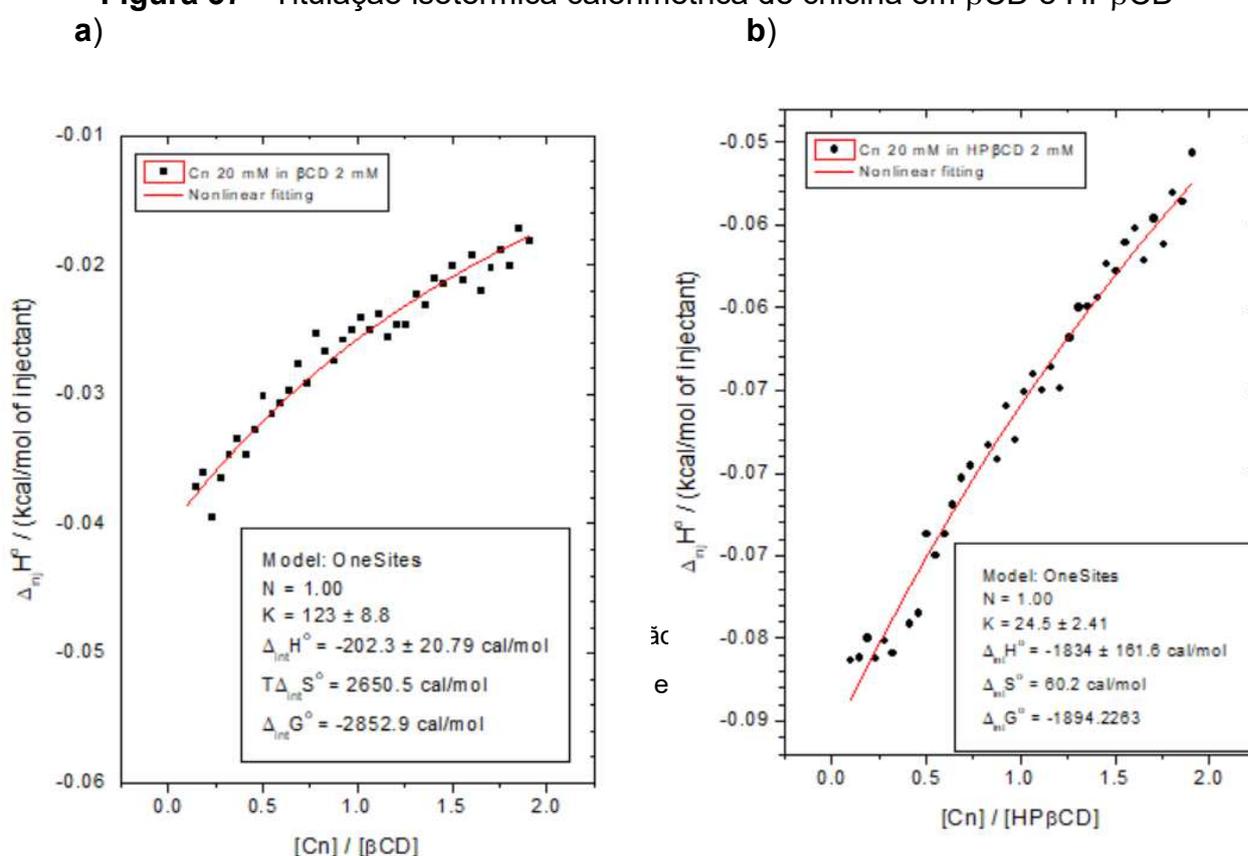
Fonte: Autor, 2019.

4.4- TITULAÇÃO CALORIMÉTRICA ISOTÉRMICA (ITC)

A técnica de ITC baseia-se na medição da quantidade de calor liberado ou absorvido de um meio reacional através da interação entre duas ou mais substâncias, por isso essa técnica tem sido amplamente empregada na determinação de interações inter e intramoleculares. A energia registrada no sistema é gerada em função da concentração do reagente titulante e o calor liberado ou

absorvido, proporcional ao reagente injetado. Por meio dos dados obtidos por uma titulação calorimétrica e utilizando a isoterma de Wiseman para modelar os dados, é possível determinar as propriedades termodinâmicas das moléculas em solução, tais como, a variação de entalpia (ΔH°) entropia ($T\Delta S^\circ$) energia livre de gibbs (ΔG°), assim como a constante de associação (K) e a estequiometria de complexação (N) (DENADAI, 2005). Na figura 37, temos os dados termodinâmicos e gráficos gerados através da formação dos complexos.

Figura 37 - Titulação isotérmica calorimétrica de cnicina em β CD e HP β CD



Fonte: Autor, 2018.

Com base nas curvas de titulação da Cn em β CD e em HP β CD, pode-se observar que as interações entre as espécies são relativamente fracas, visto que a curva não apresentou o perfil sigmoidal clássico, descrito na literatura (FREYER & LEWIS, 2008). Sem o ponto de inflexão, não foi possível determinar a estequiometria real. Porém, com base no tamanho relativo das espécies, bem como no fato de que a maioria dos compostos de inclusão possuem estequiometria 1:1, no

ajuste não linear, usando a Isoterma de Wiseman, a estequiometria 1:1 foi fixada e os demais parâmetros calculados (FREYER & LEWIS, 2008).

Ambos os sistemas apresentam uma constante relativamente baixa (VANESSA,2016; TURNBULL; DARANAS, 2003; REKHARSKY; INOUE, 1998). Sendo $K=123$, para o sistema Cn/ β CD e $K = 24.5$ para o sistema Cn/HP β CD, mas semelhantes a outros valores encontrados na literatura para complexos já estabelecidos (DENADAI et al., 2007; SILVA, 2015).

O valor negativo de entalpia ($\Delta H^\circ < 0$) indica um processo exotérmico, tanto para HP β CD quanto para β CD, em que ocorre formação de ligações no complexo de inclusão que seriam mais estáveis do que as ligações iniciais. Esse valor provavelmente origina-se das ligações de hidrogênio das moléculas de água que saíram da cavidade da molécula de ciclodextrina com as moléculas de água do solvente, ou ainda de interações da própria molécula hóspede, cnicina, dentro da cavidade das ciclodextrinas.

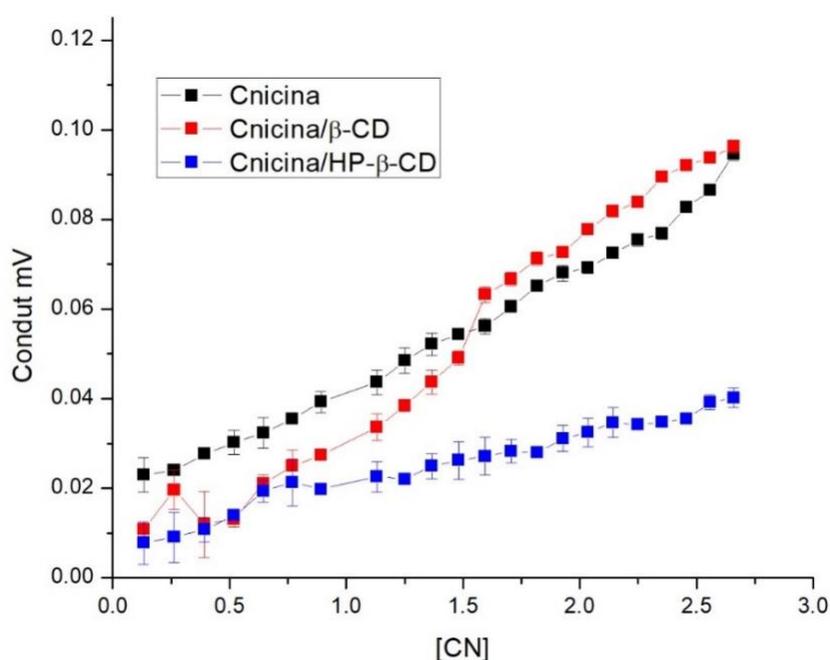
A variação positiva do valor de entropia ($\Delta S^\circ > 0$) indica que as interações moleculares durante a formação do complexo de inclusão são características do conhecido “efeito hidrofóbico”. O efeito hidrofóbico é caracterizado pela dessolvatação das moléculas de cnicina através da liberação de moléculas de água que ganham graus de liberdade rotacionais e translacionais, culminando com a elevação da entropia do sistema. Esse efeito é classificado termodinamicamente como endotérmico, devido à grande quebra de ligações de hidrogênio. O mais negativo valor de entalpia para o sistema Cn/HP β CD se deve à maior capacidade da HP β CD formar ligações de hidrogênio através dos grupos hidroxipropil. Essas ligações de hidrogênio, por sua vez, causam uma menor contribuição entrópica, devido à formação de uma arquitetura supramolecular mais rígida (DENADAI, 2005; LOFTSSON; BREWSTER, 1996; SILVA, 2015).

4.5 ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP)

A Condutividade elétrica é uma propriedade que mede a capacidade de um determinado material conduzir corrente elétrica que, em meio líquido (soluções eletrolíticas), ocorre pelo movimento dos íons. A condutividade elétrica é

considerada assim um parâmetro físico-químico utilizado para identificar a presença de íons em solução, bem como para quantificação desses íons. Esse parâmetro físico-químico se fundamenta na medida de corrente elétrica de uma solução, quando se aplicam uma diferença de potencial alternado entre duas placas condutoras (LANNA et al., 2016). Na figura 38 temos os valores da condutividade em relação a soluções de Cn e Cn em complexo com β CD e HP β CD.

Figura 38 - Dados da condutividade frente a cnicina livre, cnicina/ β CD e cnicina/HP β CD em meio aquoso em função da concentração



Fonte: Autor, 2018.

Ao analisarmos o gráfico da figura 38 é possível observar uma elevação dos valores de condutividade no ponto 1.5 M, em que ocorre uma leve superação dos valores de condutividade do meio da solução aquosa contendo Cn/ β CD em relação ao meio com somente partículas da cnicina. Esse fato demonstra que ambas as moléculas são ionizadas no meio, provavelmente, devido às hidroxilas presentes em suas estruturas, e seguem um padrão de condutividade crescente proporcional à concentração. O meio com Cn/HP β CD apresenta uma condutividade inferior em todas as concentrações testadas, provavelmente pela estrutura mais rígida decorrente do comprometimento dos hidrogênios ionizáveis nas ligações de

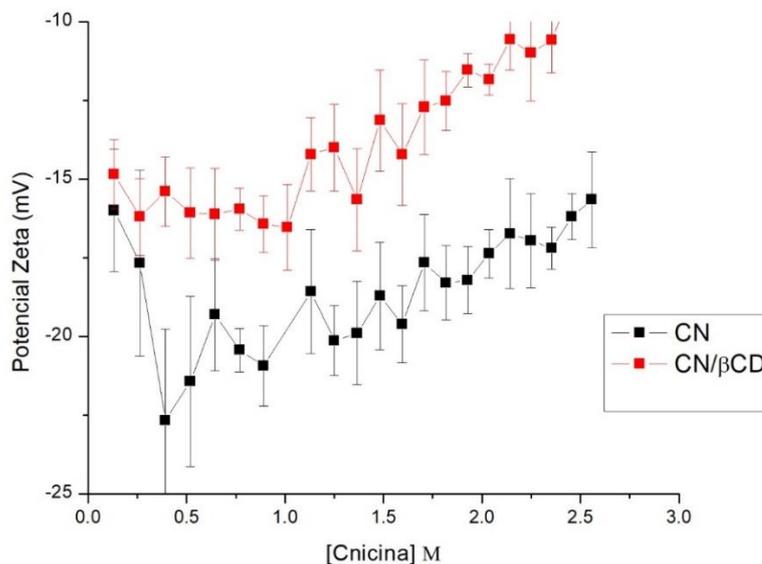
hidrogênio. Porém, mesmo no sistema Cn/ β CD, deve haver um certo comprometimento dos hidrogênios ionizáveis nas ligações de hidrogênio, explicando os menores valores de condutividade no início das curvas.

O Potencial Zeta (PZ) está relacionado à estabilidade da dispersão do sistema por medir a carga superficial das partículas no meio. Em resumo, os íons e partículas mais fortemente ligados à superfície da partícula se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circulante é conhecido como Potencial Zeta (ζ) (LANNA et al., 2016).

Quando o PZ é baixo (mais próximo de zero), tem-se dispersões mais instáveis, já valores elevados de PZ podem indicar maior estabilidade, visto que as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera as forças de Van Der Waals, as quais são sempre de natureza atrativa e promovem à agregação. Do ponto de vista prático, tem sido observado que suspensões com valores de PZ superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, enquanto aquelas cujo valor se situa entre -30 mV e +30 mV são mais instáveis e podem flocular (INSTRUTECNICA, 2016; MALVEN, 2005). A análise das propriedades Dh e PZ nos permite entender o comportamento coloidal e a estabilidade de sistemas dispersos em suspensões ou emulsões líquidas (MURDOCK et al., 2008).

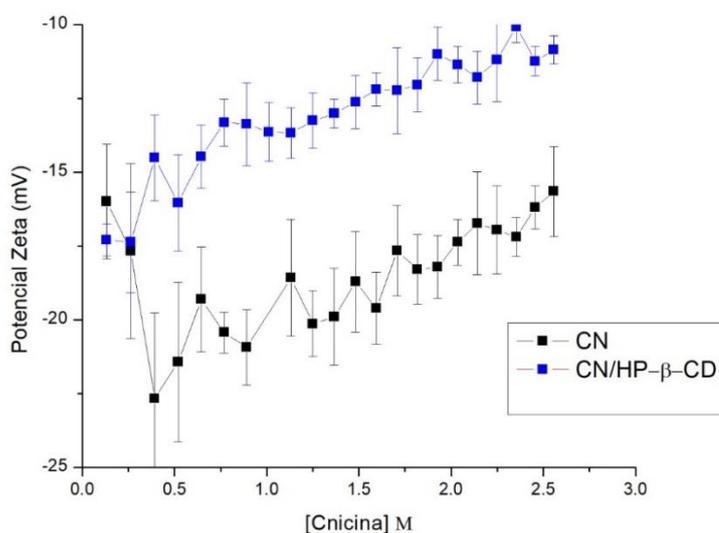
Mesmo na presença das ciclodextrinas, o composto em questão, cnicina, não apresenta completa solubilidade em meio aquoso, dessa forma, uma estratégia de aplicação desses complexos seria através de suspensões formadas por nanoprecipitados hidrofóbicos. As etapas de formação desses nanoprecipitados é relativamente simples, em que a metodologia consiste em primeiro solubilizar a amostra em um solvente menos polar que a água que tenha capacidade de solubilizar completamente o complexo, como, por exemplo, DMSO. Em seguida essa solução é vertida em outro recipiente contendo água e sob agitação, o que irá promover a formação imediata do nanoprecipitados hidrofóbico. Esse processo é reconhecido por sua preparação simples e sem adição de surfactantes ou outros aditivos e foi descrito, pela primeira vez, por Fessi (1989). Dessa forma, o efeito das ciclodextrinas na formação desse nanoprecipitado foi avaliado pelas técnicas de Dh e PZ. As figuras 39 e 40 representam os gráficos dos valores do potencial zeta em função da concentração.

Figura 39 - Distribuição dos valores de PZ de cnicina (Cn) e cnicina/ β CD em função da concentração



Fonte: Autor, 2018.

Figura 40- Distribuição dos valores de PZ de cnicina (Cn) e cnicina/HP β CD em função da concentração



Fonte: Autor, 2018.

Para os valores de PZ, observa-se que tanto a molécula hospede quanto os complexos de inclusão apresentam valores de PZ na faixa de 0 a -30 mV, estando

na região de instabilidade, podendo formar agregados ou precipitados. Os valores de PZ para os complexos formados tanto com β CD quanto com HP β CD foram menores do que os apresentados pela molécula hospede sozinha, esse fato pode indicar uma redução da estabilidade do sistema após a formação do complexo, reforçando a hipótese do comprometimento dos hidrogênios ionizáveis devido à formação de ligações de hidrogênio.

A técnica de espalhamento de luz DLS é utilizada para determinar o tamanho médio de nanopartículas em meio líquido. Esse método baseia-se na dispersão do feixe de laser monocromático quando a partícula é iluminada por ele, considerando o movimento browniano das partículas e o fato de que pequenas partículas se deslocam mais rapidamente do que partículas maiores. Em sistemas formados apenas por partículas pequenas, a variação da intensidade de luz espalhada é maior, pois, como se movimentam mais rapidamente, essas partículas cruzam a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo. As flutuações de intensidade resultantes são utilizadas para calcular o diâmetro hidrodinâmico (D_h) das partículas, utilizando a equação de Stokes-Einstein (Figura 41) (DENADAI, 2005; KANTER, 2015).

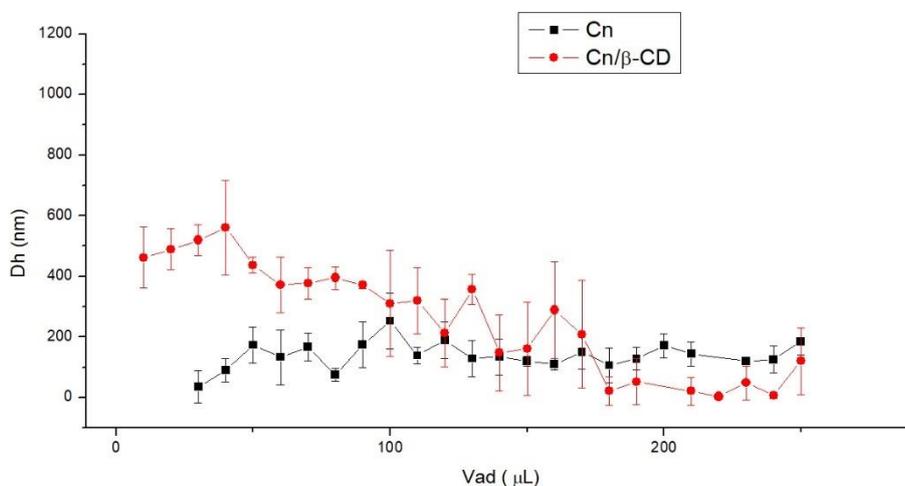
Figura 41 - Modelo da equação de Stokes-Einstein

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

D = coeficiente de difusão
 K_B = constante de Boltzmann
T = temperatura
 η = viscosidade dinâmica
 R_h = raio hidrodinâmico

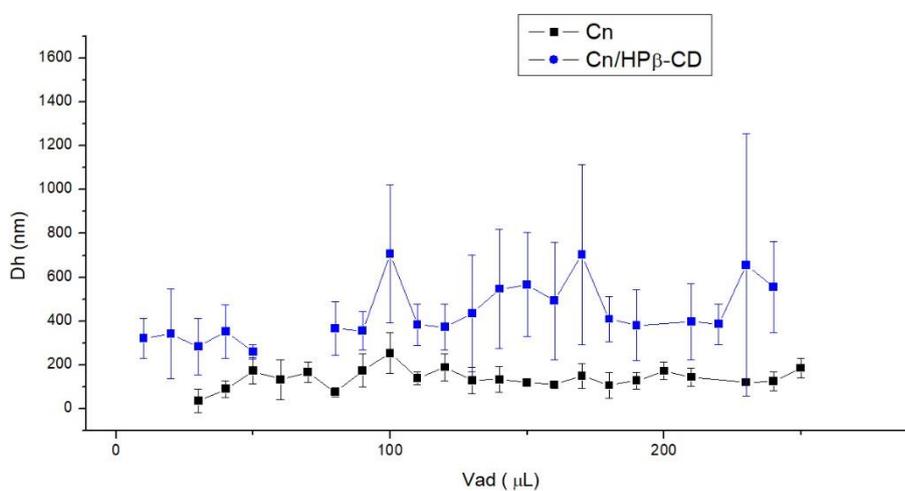
Fonte: Autor, 2018.

Figura 42 - Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de cnicina (Cn) e Cn/ β CD em função da concentração.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 43 - Distribuição de tamanho de partículas em suspensão de cnicina (Cn) e Cn/HP β CD em função da concentração.



Fonte: Autor, 2019.

No primeiro caso (Figura 42), nota-se uma redução gradativa do tamanho das partículas formadas pelo complexo cnicina/ β CD com o aumento da concentração. Em primeiro momento, esse pode parecer um dado contrário ao esperado, já que o potencial zeta dessas partículas tendem a reduzir com o aumento da concentração. No entanto, o fator condutividade do meio está se elevando à medida que se

aumenta a concentração de partículas, o que pode contrabalancear e equilibrar a redução do potencial zeta, favorecendo a estabilidade coloidal do sistema. O aumento da condutividade pode fazer com que a repulsão das partículas seja intensificada e, devido à subsequente redução da colisão efetiva das partículas, a coalescência e o aumento de tamanho podem ser evitados.

No sistema Cn/HP β CD (Figura 43), foi possível observar um aumento gradativo do tamanho das partículas em função do volume adicionado, o que é de fato comum para a maioria dos sistemas, já que a elevação do volume adicionado na solução possibilita maior contato entre as partículas em suspensão e formação de nanoprecipitados de maior diâmetro. Isso acontece em virtude da redução gradativa da solubilidade dos compostos com o aumento da concentração e pode ser evidenciado pela baixa condutividade do meio e baixos valores de potencial zeta.

No geral, o aumento do tamanho de partículas na presença das ciclodextrinas também reforça a hipótese sobre o comprometimento das ligações de hidrogênio, já que, com menores valores de potencial zeta, a coalescência e o crescimento são favorecidos.

4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO

Para avaliar a toxicidade das amostras, foram obtidos macrófagos da região peritoneal de camundongos tratados com concentrações diferentes variando de 9,37 a 150 μ M, durante 72 horas. Todo o processo foi fundamentado em resultados previamente descritos na literatura (ANTINARELLI et al., 2016). Os resultados foram determinados por ensaios de MTT e obtidos por meio do software GraFit Version 5. Todo o procedimento foi previamente aprovado pelo comitê de ética animal da UFJF (\neq CEUA 013/2015).

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

As ciclodextrinas, β CD e HP β CD, não apresentaram citotoxicidade diante das células de macrófagos, apresentado $CC_{50} > 150.00 \mu$ M, enquanto a cnicina apresentou citotoxicidade moderada ($CC_{50} = 21.83 \mu$ M) (Tabela 12). Por outro lado,

a complexação da cnicina com a β -ciclodextrina (cn/ β CD) não foi capaz de diminuir a citotoxicidade *in vitro* mediante macrófagos, uma vez que o complexo cn/ β CD apresentou $CC_{50} = 19.55 \mu\text{M}$. No entanto, o complexo formado entre a cnicina e a HP-ciclodextrina (cn/HP β CD) foi capaz de reduzir significativamente a citotoxicidade da substância frente a macrófagos peritoneais ($CC_{50} 29.28 \mu\text{M}$).

Ensaio de citotoxicidade por MTT realizados anteriormente por Bach (2010), já demonstravam que a cnicina é capaz de causar danos a macrófagos semelhantes aos causados por peróxido de hidrogênio frente a essa mesma linhagem celular. Estudos prévios evidenciaram que a cnicina também apresenta citotoxicidade moderada ($23 \mu\text{M}$) frente a células LLC-PK (células epiteliais de rins de porco) e valores mais expressivos de citotoxicidade ($IC_{50} = 7.9 \mu\text{M}$) frente a macrófagos da linhagem RAW 264.7 (EREL et al., 2011).

Os resultados demonstram que a associação da cnicina com HP β CD pode ser uma alternativa interessante em ensaios *in vivo*, já que é capaz de reduzir a possível toxicidade frente aos macrófagos de mamíferos.

Tabela 12 - Ensaio de citotoxicidade *in vitro* da cnicina e dos respectivos complexos de inclusão cn/ β CD e cn/HP β CD frente a macrófagos murinos.

Amostras	Macrófagos murinos $CC_{50} (\mu\text{M})$
Cn	21.83 ± 0.34
Cn/ β CD	19.55 ± 0.03
Cn/HP β CD	29.28 ± 0.89
β CD	>150.0
HP β CD	>150.0

Fonte: Autor, 2019.

4.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

Extratos vegetais e substâncias naturais têm sido avaliadas quanto ao potencial efeito contra o parasito *S. mansoni* (CARVALHO et al., DE CASTRO et al., 2015; LAGO et al., 2018). Entre as amostras naturais, podemos citar flavonoides,

terpenos, chalconas, as quais se mostraram com grande potencial antiparasitário (LAGO et al., 2018; SILVA, 2018). Contudo, considerando seu potencial antiparasitário, não há relatos prévios na literatura demonstrando a atividade esquistossomicida de *C. benedicta* ou da cnicina. Nesse sentido, no intuito de se identificar estas amostras como potencialmente antiparasitárias, o extrato bruto e a cnicina foram avaliados *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni* (Tabela 13).

Ao analisarmos os resultados antiparasitários frente aos vermes adultos do parasito *S. mansoni*, foi possível observar que o extrato causou mortalidade e redução da atividade motora em 100 % dos parasitos, após 24 h de incubação, em todas as concentrações testadas (200 a 25 µg/mL). Esse resultado sugere o potencial do extrato de *C. benedicta* como fonte de metabólitos com atividade esquistossomicida.

Tabela 13 - Resultados da atividade contra *S. mansoni* do extrato de Cardo Santo (*C. benedicta*)

GRUPOS	TEMPO DE INCUBAÇÃO (h)	MORTALIDADE (%)	REDUÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA (%)	
		M/F	LEVE	SIGNIFICATIVO
Controle	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
Praziquantel 2 µM	24	100	0	100
	48	100	0	100
	72	100	0	100
200 µg/mL	24	100	0	100
	48	100	0	100
	72	100	0	100
100 µg/mL	24	100	0	100
	48	100	0	100
	72	100	0	100
50 µg/mL	24	100	0	100
	48	100	0	100
	72	100	0	100
25 µg/mL	24	100	0	100
	48	100	0	100
	72	100	0	100

Fonte: Autor, 2019.

Considerando a atividade esquistossomicida promissora do extrato de *C. benedicta*, a substância majoritária do mesmo foi isolada, identificada e também avaliada quanto ao potencial antiparasitário frente ao verme *S. mansoni* (Tabela 14).

Assim, a cnicina quando avaliada na concentração de 50 μM foi capaz de causar mortalidade em 100 % dos vermes, após 24 h. Na concentração de 25 μM , a cnicina foi capaz de causar mortalidade em 100 % das fêmeas, com significativa redução da atividade motora, enquanto em machos adultos essa mortalidade foi de 60 % em 24 h e de 100 % após 48 h. Em menores concentrações, foi observada maior atividade da cnicina diante dos parasitos fêmeas, sendo a cnicina (12,5 μM) capaz de causar 100 % de mortalidade nestes vermes após 72 h. Ao atingir a concentração de 6,25 μM , a cnicina não apresentou atividade frente aos vermes machos, mas demonstrou redução de 100 % na atividade motora e 60 % de mortalidade diante das fêmeas adultas, após 72 h. Considerando os ensaios *in vitro*, os parâmetros avaliados buscaram verificar a viabilidade dos vermes em relação às alterações da motilidade do mesmo (DE MORAES, 2012; NDJONKA et al., 2013).

O uso de extratos e substâncias isoladas frente à capacidade de redução da atividade motora e viabilidade dos vermes *in vitro* tem sido amplamente relatado na literatura. O acetato de carvacrol, por exemplo, na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de provocar alterações na motilidade, no tegumento do parasito e na oviposição (DE MORAES, 2013). Com potencial esquistossomicida similar quanto à capacidade de redução da atividade motora, estão os derivados do floroglucinol, como a aspidina, ácido flavaspídico, metileno-bis-aspidinol e desaspidina (MAGALHÃES et al., 2010). Além disso, ensaios prévios com os óleos essenciais de *Piper cubeba* e de *Tagetes erecta* também demonstraram atividade esquistossomicida frente a vermes adultos de *Schistosoma* (MAGALHÃES et al., 2012; TONUCCI et al., 2012). Além destes, o sesquiterpeno (+) - Epóxi-Limoneno (MORAES et al., 2013) e o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* também mostraram grande potencial diante dessa parasitose (FABRI et al., 2014; SAÇO, 2015).

Já no estudo realizado com a espécie *Arctium lappa* e a substância arctiina foi verificada mortalidade de 50 % dos vermes e a redução de 60 % da atividade motora, após 48 horas de exposição com as amostras, tendo a substância

apresentado atividade esquistossomicida numa concentração de 100 μM (DIAS et al., 2013; SAÇO, 2015).

Tabela 14 - Atividade esquistossomicida *in vitro* da cnicina

Grupo	Período de incubação (h)	Vermes mortos (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
		M	F	Leve		Significativo	
		M	F	M	F	M	F
Controle	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel 2 μM	Imediato	100	100	0	0	100	100
	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Cnicina 50 μM	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
25 μM	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	60	100	0	0	60	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
12,5 μM	Imediato	0	0	0	30	0	0
	24	0	30	30	60	0	30
	48	30	60	60	30	30	60
	72	60	100	30	0	60	100
6,25 μM	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	20	0	80	0	20
	72	0	60	0	0	0	100

Fonte: Autor, 2018.

Considerando os efeitos sobre a motilidade do parasito, alguns neurotransmissores como serotonina, dopamina, noradrenalina e adrenalina apresentam-se como possíveis alvos de moléculas frente a atividade esquistossomicida, principalmente depois de ter sido comprovado que agonistas/antagonistas desse sistema promovem uma alteração na atividade motora dos vermes (NOËL et al., 2008). Como exemplo, algumas moléculas esquistossomicidas como oxamniquina, metrifonato, hicantona, lucantona e imidazolidinas podem apresentar atividade sobre motilidade por atuarem em receptores de acetilcolina (DUBOIS, 2009; NEVES, 2010; DE MORAES, 2011). Neste sentido, o extrato etanólico de *C. benedicta* foi avaliado anteriormente por Paun (2015) demonstrando alta atividade neuroprotetora, sendo capaz de inibir a enzima acetil colinesterase (AchE) em 88,76 % e a enzima tirosinase (TYR) em 55,5 %. Assim, a redução da motilidade dos vermes pode estar relacionada, entre outras razões, a um efeito das substâncias presentes no extrato (como a cnicina), o qual pode atuar frente a alguns neurotransmissores/ neuromoduladores.

Uma análise comparativa mais detalhada entre os grupos permite observar que a cnicina foi capaz de apresentar seletividade entre machos e fêmeas, especialmente em concentrações menores que 25 μ M. Com relação à esta seletividade, alguns trabalhos anteriores envolvendo ácidos *N*-alquilamino-alcano-tiosulfúricos reportaram essa maior susceptibilidade das fêmeas em relação aos machos (DE ARAUJO et al., 2007; DE OLIVEIRA PENIDO et al., 2009). Mitsui et al. (2009), avaliando a substância artenusato, também demonstraram que as fêmeas foram mais responsivas ao tratamento.

Essa seletividade apresentada pela cnicina pode estar relacionada, entre outras razões, à interação com o tegumento dos vermes, o qual é morfológicamente distinto entre os sexos, bem como à possibilidade de maior ingestão do meio de cultura durante a alimentação da fêmea. Neste sentido, apesar de a boca das fêmeas ter apenas 1/5 do tamanho das do macho, elas se alimentam 8,5 vezes mais de sangue que eles e por isso, trabalham cerca de 40 vezes mais. Sendo assim, a possibilidade de ingestão das amostras colocados no meio de cultura, por parte das

fêmeas, acaba sendo maior que dos machos o que pode ser uma hipótese plausível para a atividade mais expressiva sobre as fêmeas (SKELLY, 2014).

4.8 ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

Com os resultados promissores obtidos *in vitro*, estudos em modelo murino foram realizados, no sentido de verificar a atividade esquistossomicida *in vivo* da cnicina quando administrada por diferentes vias de administração. Além disso, considerando a possível toxicidade da cnicina e as vantagens dos complexos de inclusão quanto a farmacocinética, solubilidade, estabilidade e quanto à redução de possível toxicidade, os complexos de inclusão da cnicina em ciclodextrinas também foram avaliados *in vivo*.

Importante destacar que durante o experimento não ocorreu perda de nenhum animal e não foi registrado nenhum sofrimento aparente do mesmo ou resposta anormal após cada dose.

A tabela 15 abaixo mostra a média do número de vermes recuperados e o desvio padrão referente a cada grupo que recebeu o tratamento por via intraperitoneal.

Tabela 15 - Recuperação de vermes após tratamento via intraperitoneal

Grupo	Tratamento	Número de doses	Média de vermes ± desvio padrão	% de redução Vermes
Sem tratamento	-	3	20.25 ± 3.34	-
Cn	10 mg/kg	3	11.75 ± 4.26	41.9
Cn/βCD	10 mg/kg	3	10.50 ± 8.20	48.1
Cn/HPβCD	10 mg/kg	3	6.75 ± 7.66	66.7

Fonte: Autor, 2019.

A infecção dos camundongos está sujeita a alguns fatores que podem gerar uma infecção mais ou menos expressiva no hospedeiro tendo sua eficiência revelada após eutanásia dos mesmos e contagem do número de vermes. Essa

variação possível da carga parasitária é conhecida como heterogeneidade da doença e pode ser um problema frente a análise dos dados, devido ao aumento do desvio padrão de cada grupo. A heterogeneidade da infecção está também relacionada a uma resposta inata do organismo do hospedeiro diante de um primeiro contato através da forma infectante do parasito (FELICISSIMO, 2014).

Em ensaios anteriores, buscando melhorias na atividade esquistossomicida, a β CD foi complexada com PZQ e os complexos formados avaliados, por via oral, frente a atividade esquistossomicida (DE JESUS et al., 2010). Os resultados mostraram que o carreador β CD, sem a presença do PZQ, obteve resultado comparável a solução de PBS e etanol, a qual foi usada como controle negativo (DE JESUS et al., 2010). Este fato indica que a β CD não apresenta atividade esquistossomicida quando administrada isoladamente por via oral.

Considerando os resultados obtidos em nossos experimentos esquistossomicidas *in vivo* com as amostras administradas por via intraperitoneal, o grupo sem tratamento (controle negativo) apresentou um número de vermes de $20,25 \pm 3,34$, enquanto o número de vermes recuperados dos animais que receberam o tratamento com cnicina na dose de 10 mg/kg foi de $11,75 \pm 4,26$, tendo este grupo uma redução de 41,9 % dos vermes. Já no grupo de animais tratados com Cn/ β CD a média do número de vermes foi de $10,50 \pm 8,20$, com uma redução de 48,1 % em relação ao grupo não tratado. O grupo Cn/HP β CD apresentou uma média de vermes de $6,75 \pm 7,66$ e apresentou uma redução do número de vermes ainda mais expressiva 66,66 %. Todos os grupos foram testados para uma mesma concentração final de Cn de 10 mg/kg o que indica uma melhora da resposta esquistossomicida com maior redução do número de vermes para os grupos onde o complexo com ciclodextrina foi utilizado em associação a Cn.

A dose proposta e utilizado no presente trabalho, bem como a ideia do ensaio ser realizado em doses múltiplas, foram estabelecidos tendo-se como base, modelos de ensaios *in vivo* para atividade esquistossomicida previamente realizados. Neste sentido, um derivado oxadiazol foi avaliado por via intraperitoneal na concentração de 10 mg/kg em doses múltiplas, promovendo a redução de 25 a 75 % da carga parasitária (SAYED et al., 2008). Da mesma forma, alguns análogos de ácido nucleicos foram testados na referida concentração, em múltiplas doses, por via I.P, mostrando redução de 30 a 40% da carga de vermes no hospedeiro (LALO, 2017).

Por essa mesma via, outros valores superiores de concentração também já foram avaliados anteriormente, como é o caso da β -lapachona, a qual foi avaliada na concentração de 50 mg/kg, em doses múltiplas, por I.P. Além destas, a curcumina (avaliada por via I.P em dose superior a 400 mg/kg), em modelo de doses múltiplas, também apresentou atividade *in vivo*. Todos os modelos citados anteriormente encontram-se na revisão sobre agentes esquistossomicidas realizado por Lago et al (2017).

Por outro lado, as ciclodextrinas naturais já foram utilizadas anteriormente, com inúmeros fármacos e formulações, para melhorar a solubilidade, como é o caso do PZQ que teve sua solubilidade melhorada 5 vezes após formação do complexo PZQ/ β CD (BECKET, 1998; MARAGOS, 2009). Além disso, a associação PZQ/HP β CD, demonstrada por CHAVES (2010), permite que este complexo altere as propriedades químicas do PZQ melhorando sua solubilidade e consequente biodisponibilidade *in vivo*.

Dessa forma, tendo em vista que a cnicina apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, a β CD pode estar atuando sobre a solubilidade e, consequente biodisponibilidade da cnicina, permitindo melhor interação desta com o parasito, o qual está localizado nas veias mesentéricas do hospedeiro. Já a HP β CD apresenta uma substituição de suas hidroxilas por grupos hidroxipropil, o que eleva sua solubilidade em cerca de 30 vezes quando comparados com a β CD (MALANGA, 2016). Este fato pode ser o responsável pela expressiva melhora da resposta antiparasitária do complexo Cn/HP β CD, o qual apresentou uma redução de 66,66% dos vermes quando comparados ao grupo controle negativo.

Adicionalmente, foram também realizados ensaios *in vivo* da Cn e seus respectivos complexos com ciclodextrinas por via oral (Tabela 16).

Tabela 16 - Recuperação de vermes após tratamento via oral

Grupo	Tratamento	Número de doses	Média de vermes \pm desvio padrão	% de redução Vermes
Sem tratamento	-	3	20,25 \pm 3,344	-
Cn	100 mg/kg	3	16,75 \pm 11,69	17,28
Cn/βCD	100 mg/kg	3	18 \pm 5,33	11,11

Cn/ HPβCD	100 mg/kg	3	11,5 \pm 4,55	43,20
-----------------------------------	-----------	---	-----------------	-------

Fonte: Autor, 2019.

Considerando o tratamento por via oral, importante destacar que a concentração de 100 mg/kg de Cn manteve-se a mesma em todos os grupos tratados. A concentração e o número de doses, apesar de serem relativamente baixos se comparados a outros da literatura, foram delineados com base em experimentos previamente realizados e publicados. Assim, por exemplo, trabalhos anteriores demonstraram que o composto trioxaquina, na concentração de 100 mg/kg, foi capaz de reduzir a carga parasitária em 42%, após 5 doses (PORTELA, 2012). Outros exemplos são a niclosamida e o consantel, os quais também reduziram a carga parasitária após administração oral de doses múltiplas de 100 mg/kg (ABDULLA, 2009; LAGO, 2017).

Com relação aos experimentos realizados no presente trabalho, é possível perceber que o grupo tratado somente com Cn apresentou 17,28 % de redução da carga parasitária (Tabela 16), a qual não foi tão expressiva se comparada à redução ocorrida quando a cnicina foi avaliada por via I.P (Tabela 15). O mesmo pode ser observado para o grupo tratado com o complexo Cn/ β CD, o qual apresentou redução de 11,11 % da carga parasitária após tratamento por via I.P. Já o tratamento com Cn/HP β CD foi capaz de reduzir a carga de vermes em 43,20 % (Tabela 16).

Assim, em comparação ao tratamento por via I.P, o experimento por via oral se mostrou menos eficaz se avaliado o parâmetro de redução do número de vermes. Essa diferença pode estar relacionada à baixa disponibilidade de cnicina por via oral ou mesmo à possibilidade da cnicina ser metabolizada quando administrada por via oral, não chegando a atingir o parasito na sua forma ativa. No entanto, uma outra hipótese pode ser sugerida pelo local de liberação da cnicina presente nos complexos com ciclodextrinas. De acordo com a literatura, quando administradas por via oral, tanto as CDs naturais quanto a HP β CD não são bem absorvidas e são metabolizadas ao nível do cólon e do ceco, por bactérias da própria microbiota natural (SALTÃO & VEIGA, 2001). Dessa forma, uma liberação concentrada de Cn poderia estar ocorrendo ao nível do cólon e do ceco, sendo possível esta molécula chegar à circulação sanguínea mais facilmente. Assim, o que de fato chega em

contato com o parasito, em quantidade significativa, por administração por via oral, poderia ser a Cn livre. Essa hipótese poderia justificar também o fato de a porcentagem de redução de vermes pelo complexo Cn/HP β CD por via oral, ser semelhante a Cn quando administrada por via I.P, uma vez que HP β CD deva estar entregando quantidades maiores de Cn na região do intestino em relação a β CD.

De forma geral, é possível perceber uma interação positiva entre HP β CD e Cn, tanto nos grupos por via I.P quanto por via oral, sendo que neste último, mesmo devido à baixa absorção do complexo com HP β CD, para este foi possível observar redução considerável da carga parasitária o que torna o complexo HP β CD, portanto, uma formulação mais vantajosa para esse fim.

Contudo, para uma análise mais completa, outras variáveis devem ser levadas em consideração, como o número de doses que pode ter sido baixo para esse sistema e a concentração da cnicina que, apesar de estar de acordo com outros testes para outras substâncias *in vivo* da literatura, pode ainda ser avaliada em maiores concentrações.

Além disso, é importante destacar que há raros trabalhos envolvendo a cnicina em modelos de ensaios *in vivo* e nenhum trabalho prévio com esta molécula associada a um complexo de inclusão, como a β CD ou HP β CD. Assim, estudos mais detalhados e amplos de farmacocinética devem ser realizados para melhor conhecermos seus mecanismos e interações em modelos *in vivo*.

4.8.1 Análise de Oograma

Outro parâmetro importante diretamente relacionados à carga parasitária que deve ser levado em consideração na avaliação esquistossomicida *in vivo* é a contagem e o desenvolvimento dos ovos, os quais são encontrados tanto no intestino quanto nas fezes de animais infectados. Dessa forma, na busca por novas opções terapêuticas no combate à esquistossomose, deve-se considerar também moléculas com potencial em diminuir a oviposição das fêmeas e, assim, pode dificultar a propagação da helmintose e diminuir o principal agente patogênico da doença, o ovo (KATZ, 2008).

Neste sentido, uma análise quantitativa dos ovos foi realizada (Figuras 44 e 45). O estudo levou em consideração o número de ovos por grama (OPG) e

presença de ovos maduros e imaturos. Esse último parâmetro é de grande interesse, pois a redução de ovos imaturos significa que não há oviposição recente por parte dos parasitos (DE MORAES, 2011).

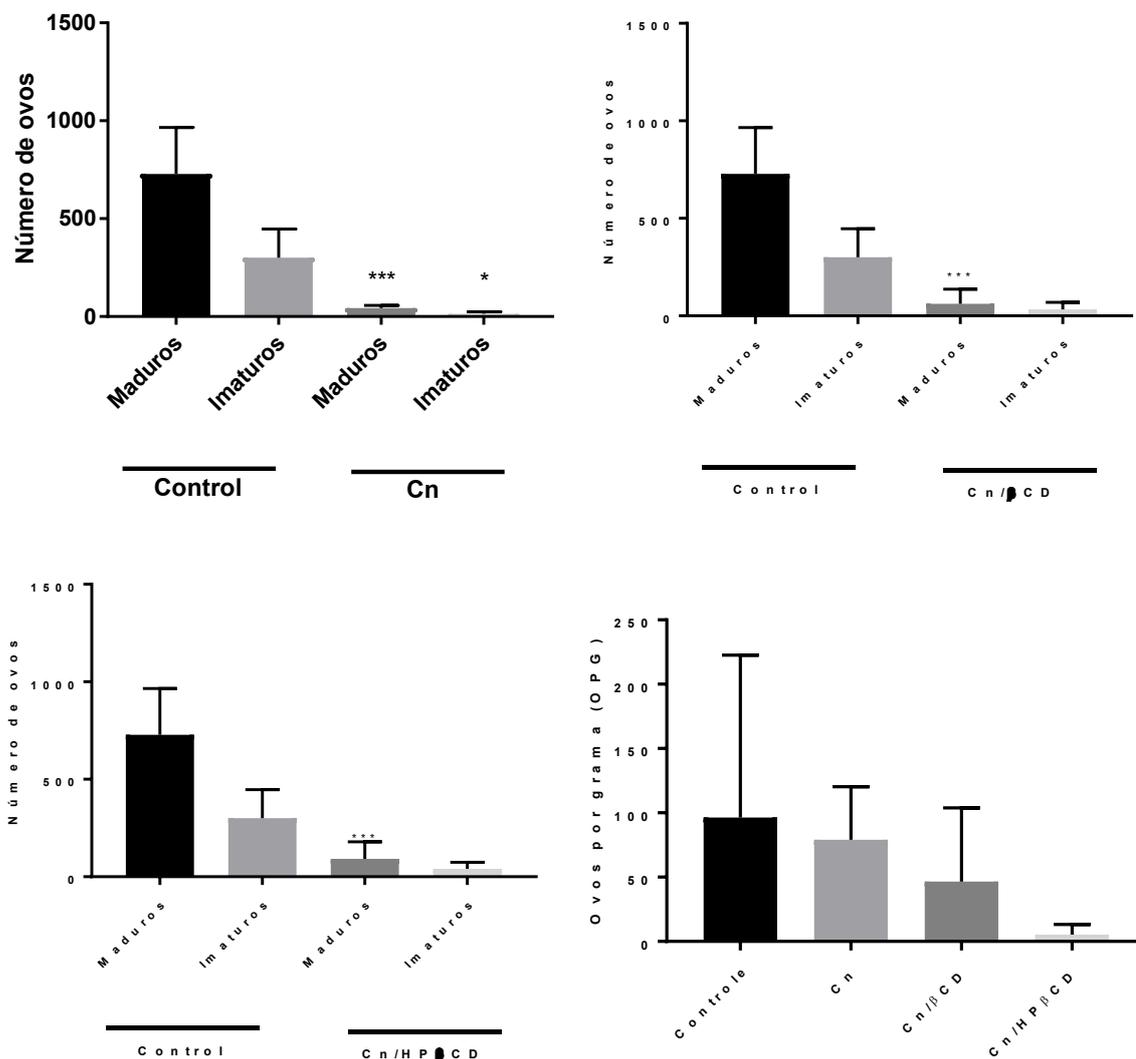
A oviposição está diretamente relacionada com o acasalamento dos parasitos ou com a incapacidade da fêmea em realizá-la. Há relatos de algumas substâncias que impedem ou diminuem a oviposição devido à inibição da enzima 3-hidroxi, 3-metilglutaril, coenzimaA e a nicarbazina, como o Mevinolin, fármaco pertencente a classe das histatinas. (CHEN; FOSTER; BENNETT, 1990).

Da mesma forma, as análises quantitativas de ovos são padrões de referência em testes esquistossomicidas, como o realizado com a epiisopilosina, a qual foi administrada por via oral, em dose única, na concentração de 100 mg/kg e apresentou uma redução de ovos imaturos de 45,84 % e, para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), uma redução de 58 % em relação ao grupo não tratado (GUIMARAES et al., 2017).

No presente trabalho, a análise quantitativa dos ovos, para tratamento por via oral, revelou valores interessantes, quando comparados ao grupo controle e, ainda superiores, a alguns dados de substâncias presentes na literatura, evidenciando uma redução significativa do número de ovos imaturos e do OPG.

De acordo com a Tabela 17, a porcentagem de redução OPG foi mais expressiva no grupo Cn/HP β CD para tratamento via oral, o que corrobora com os resultados elucidados anteriormente, diante da redução da porcentagem de vermes. Esses dados mostram que a formação dos complexos de inclusão em ciclodextrinas, tanto em β CD quanto em HP β CD, de fato, conseguem melhorar o desempenho da ação da Cn na resolução da esquistossomose. Uma comparação mais detalhada foi expressa em gráficos, evidenciando estatisticamente essa redução do número de ovos tanto maduros quanto imaturos em relação ao grupo controle para cada forma de tratamento (Figura 44).

Figura 44 - Análise quantitativa do número de ovos para os diferentes tratamentos por via oral



* Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$).
 *** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,001$).

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 17 - Quantificação de ovos após tratamento via oral

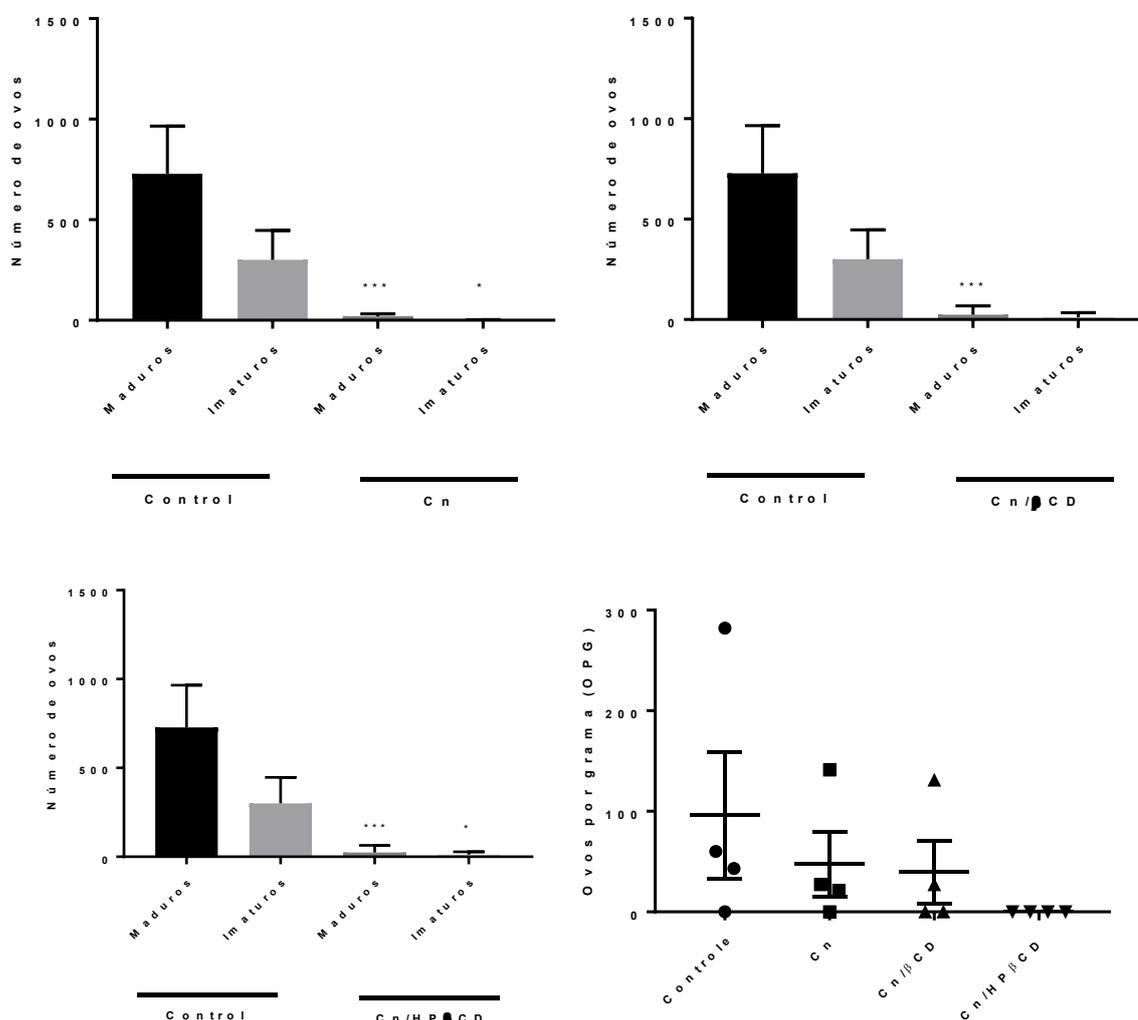
Grupo	Tratamento	Número de doses	% de redução Ovos Imaturos	% de redução OPG
Cn	100 mg/Kg	3	95,09	17,92
Cn/βCD	100 mg/Kg	3	89,01	51,68
Cn/ HPβCD	100 mg/Kg	3	86,60	94,54

Fonte: Autor, 2019.

O número de ovos maduros apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$), para todos os modelos de tratamento por via oral e o número de ovos imaturos, tratados somente com Cn, apresentou uma diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). No entanto, é possível observar uma redução de ovos imaturos relevante em todos os grupos tratados. Este fato, revela que não ocorreu oviposição recente no hospedeiro, provavelmente, devido ao início do tratamento com as amostras. A redução do número de ovos maduros pode estar relacionada com uma possível atividade da amostra diretamente nos ovos, no caso da via oral, justamente devido à metabolização das ciclodextrinas na região do intestino (SALTÃO & VEIGA, 2001), onde os ovos podem ser encontrados, permitindo uma ação direta da Cn liberada.

No tratamento por via intraperitoneal, também foi possível observar uma redução da contagem de ovos maduros que se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,001$) para todos os modelos de tratamento avaliados, bem como uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de ovos imaturos nos grupos tratados com Cn e Cn/HP β CD. As porcentagens de redução e os valores comparativos do número de ovos podem ser observados na figura 45 e tabela 18, respectivamente.

Figura 45 - Análise quantitativa do número de ovos para os diferentes tratamentos por via intraperitoneal



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

*** Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,001$).

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 18 - Quantificação de ovos após tratamento via intraperitoneal

Grupo	Tratamento	Número de doses	% de redução ovos Imaturos	% de redução OPG
Cn	100 mg/Kg	3	99,33	50,90
Cn/βCD	100 mg/Kg	3	96,17	58,96
Cn/ HPβCD	100 mg/Kg	3	96,17	100

Fonte: Autor, 2019.

Quando comparamos a porcentagem de redução de OPG e ovos imaturos entre os grupos tratados, percebe-se que a contagem de ovos imaturos não sofre grandes alterações entre eles, mas apresentam clara redução com um valor mínimo de 96,17 %. No entanto, a redução de OPG se mostrou mais expressiva no grupo Cn/HP β CD, seguido do Cn/ β CD e, depois, da Cn, mostrando novamente que os dados vão de encontro aos resultados previamente apresentados em relação à carga parasitária na qual o tratamento com o Cn/HP β CD apresentou melhor potencial esquistossomicida. O fato de que o tratamento com cn promoveu maior redução de OPG por via intraperitoneal pode estar relacionado justamente à via de administração e à facilidade em atingir o alvo, já que esta leva a substância do tratamento diretamente ao sangue do animal.

Uma redução na oviposição pode ser causada por alterações no sistema reprodutivo, tanto de machos quanto de fêmeas. Como exemplo, temos o fármaco levostatina, inibidor da síntese de colesterol, que causa redução na oviposição de *S. mansoni* através de alterações morfológicas degenerativas no aparelho reprodutor, alteração dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas, além de modificações nos testículos dos machos (ARAÚJO et al. 2002). A estreptozotocina também é outro fármaco que pode ser mencionado por afetar tanto a oogênese quanto espermatogênese dos vermes, causando até esterilização dos parasitos (HULSTIJN et al., 2003). Existem várias alterações morfológicas que podem levar a inviabilidade reprodutiva dos vermes e conseqüente redução da cinética de oviposição.

No presente trabalho as alterações morfológicas nos órgãos reprodutivos não foram analisadas. No entanto, devido a expressiva redução do número de ovos presentes no oograma e nas fezes, é possível que os órgãos reprodutores dos parasitos, tanto fêmeas quanto machos, tenha sofrido alterações.

4.8.2 Avaliação do peso médio dos fígados e baços dos animais após tratamento

Um dos grandes problemas da esquistossomose é o aumento do tamanho do fígado (formação granulomatosa) e baço (formação granulomatosa e intensa atividade imunológica) do indivíduo infectado, fato conhecido como hepatoesplenomegalia. Os granulomas apresentam papel fundamental na proteção

do hospedeiro, principalmente contra antígenos potencialmente tóxicos liberados pelos ovos aprisionados no tecido (LINS et al., 2008). Tanto a hipertensão portal quanto a fibrose tecidual são danos característicos causados pelos granulomas, sendo assim, substâncias com potencial resolutivo desses processos, podem auxiliar na redução da morbidade da doença (PYRRHO et al., 2004). Essa alteração histológica gera a inviabilização do tecido e comprometimento do mesmo devido a formações granulomatosas, que vão ocorrendo com avanço da doença através de um processo inflamatório acometido principalmente pela deposição de ovos no tecido (GRYSEEL, 1995; FELICISSIMO, 2014).

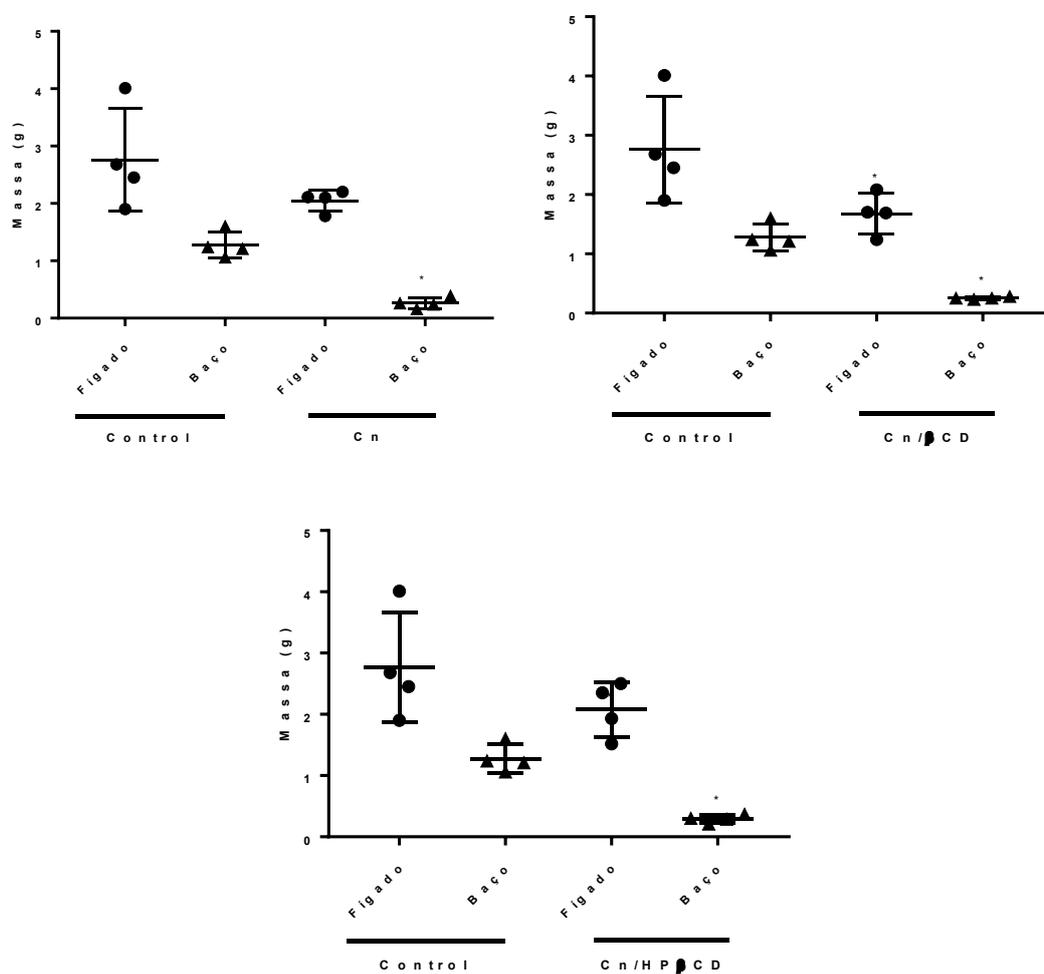
Após eutanásia, os fígados e baços dos animais tratados e não tratados foram retirados e pesados imediatamente. A média dos pesos foi então avaliada para um estudo comparativo entres as diferentes formas de tratamentos.

Dessa forma, no presente estudo foi avaliado o potencial de redução deste quadro frente a uma comparação dos pesos dos órgãos de grupos tratados e o controle negativo. Na figura 46 observa-se que ocorreu uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos de tratamento para o peso médio dos baços e uma redução significativa para o peso médio do fígado no animal tratado com Cn/ β CD.

Baseando-se em dados da literatura, substâncias com capacidade de interferir na viabilidade dos ovos ou na fecundidade de fêmeas, são capazes de evitar o aumento expressivo do peso médio dos órgãos (ABDUL-GHANI et al., 2011).

Como exemplo, animais tratados com mevinolin, um fármaco que tem capacidade de interromper temporariamente a oviposição, apresentaram uma redução das massas relativas desses órgãos (FOSTER & BENNETT, 1990). O mesmo foi observado em alguns esquemas de tratamento com a substância artemeter (LESCANO et al., 2004).

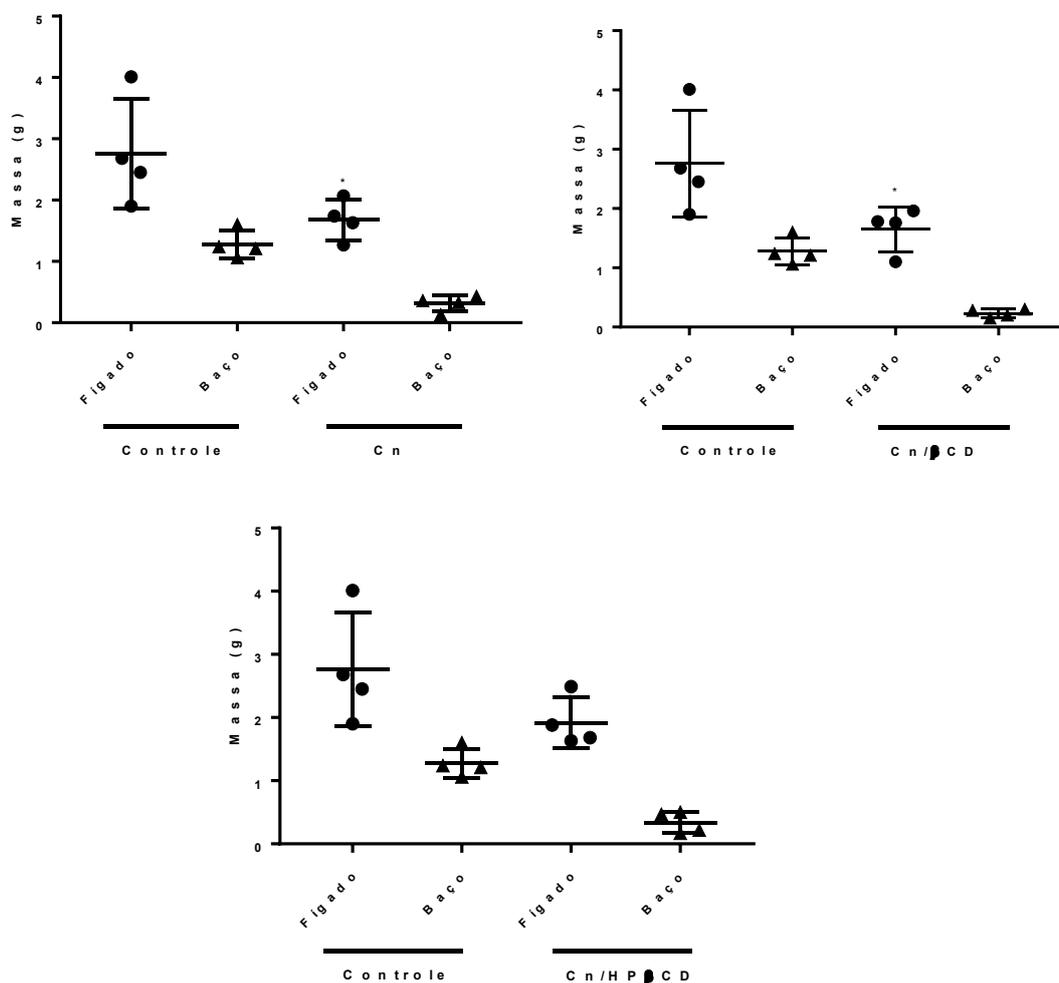
Figura 46- Efeito do tratamento por via I.P com Cn, Cn/ β CD e Cn/HP β CD sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose



Os pontos e triângulos representam os dados de animais individuais, barras na horizontal representam a média de cada grupo; * Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2019.

Figura 47 - Efeito do tratamento por via oral com Cn, Cn/ β CD e Cn/HP β CD sobre o peso relativo de fígados e baços dos animais com esquistossomose



Os pontos e triângulos representam os dados de animais individuais, barras na horizontal representam a média de cada grupo; * Diferença significativa quando comparado com grupo controle sem tratamento ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 19 - Porcentagem de redução do peso de fígado e baço por via IP e oral de administração

Grupo	Número de doses	% de redução Via I. P		% de redução Via Oral	
		Fígado	Baço	Fígado	Baço
Cn	3	25	79	39	75
Cn/ β CD	3	39	80	40	82
Cn/ HP β CD	3	25	77	30	73

Fonte: Autor, 2019.

Tanto no esquema terapêutico por via I.P (Figura 46) quanto por via oral (Figura 47), foi possível observar um resultado estatisticamente semelhante na porcentagem de redução do peso médio dos órgãos para todos os grupos de tratamento (Tabela 19).

Os resultados sugerem que a Cn apresenta potencial na resolução dos granulomas localizados tanto no fígado quanto no baço dos animais infectados. Essa redução segue de acordo com os dados do número de ovos maduros e imaturos reportados anteriormente que foram muito semelhantes em todos os grupos de tratamento. Como descrito anteriormente por Hams, Aviello e Fallon (2013), a patogenia durante a esquistossomose ocorre principalmente devido a uma resposta inflamatória granulomatosa excessiva devido a presença de ovos aprisionados no tecido. Desse modo, o efeito anti-inflamatório pode estar associado a uma melhora da resolução dos granulomas assim como já foi descrito anteriormente na literatura para a arctiina e outras substâncias (SAÇO, 2015).

Nesta mesma linha de raciocínio, o fato de que a cnicina já teve seu potencial anti-inflamatório reportado na literatura anteriormente (EREL et al., 2011) revela um indicativo de como essa molécula possa atuar, desta maneira, na redução do peso dos órgãos. No entanto, análises histológicas mais detalhadas devem ser realizadas, evidenciando o infiltrado celular, por exemplo de eosinófilos e neutrófilos na região dos granulomas, bem como a área de extensão e resolução dos mesmos. Em análise comparativa entre os grupos de tratamento, não foi observado diferença significativa para Cn, Cn/ β CD e Cn/HP β CD.

5. CONCLUSÕES

- Com relação ao caráter inovador, é o primeiro registro de avaliação da esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* para essa molécula, bem para seus complexos supramoleculares com β CD e HP β CD, os quais são também relatados pela primeira vez.
- Considerando o grau de toxicidade, a cnicina apresentou citotoxicidade moderada diante de macrófagos murinos de lavado intraperitoneal. No entanto, a associação desta com a HP β CD foi capaz de reduzir a toxicidade.
- A atividade esquistossomicida *in vivo*, verificada tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, demonstrou que a cnicina e seus complexos de inclusão são capazes de reduzir a carga parasitária e de reduzir o número de ovos e o OPG nos animais tratados.
- A cnicina bem como os complexos supramoleculares β CD e HP β CD, promoveram uma redução estatisticamente significativa do peso médio dos fígados e baços dos animais tratados.
- O estudo demonstra a atividade esquistossomicida *in vivo* da cnicina e a melhora desta ação, com diminuição da citotoxicidade, por meio da associação desta entre estruturas supramoleculares com ciclodextrinas.
- A análise geral dos resultados sugere que a atividade esquistossomicida *in vivo* do complexo cn/HP β CD tenha sido a mais eficaz, tanto por via intraperitoneal quanto por via oral.
- O presente trabalho conseguiu envolver, diversas áreas do conhecimento e tecnologia, visando contribuições na pesquisa sobre a ciência dos arranjos supramoleculares, bem como suas aplicações no tratamento de doenças.

REFERÊNCIAS

ABDUL-GHANI, R.; LOUTFY, N.; SHETA, M.; HASSAN, A. Artemether shows promising female schistosomicidal and ovicidal effects on the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* after maturity of infection. **Parasitology Research** [Heidelberg], v.108, n.9, p. 1199–1205, 2011.

ABDULLA, M-H.; RUELAS, D.S.; WOLFF, B.; SNEDECOR, J.; LIM, K-C.; XU, F.; RENSLO, A.R.; WILLIAMS, J.; MC-KERRO, J.H.; CAFFREY, C.R. Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 7, e478, 2009.

AL-SNAFI, A.E. The Constituents and Pharmacology of *Cnicus Benedictus* - A Review. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 3, p. 129-135, 2016.

ALVES, J.C.F. A review on the chemistry of eremanthine: a sesquiterpene lactone with relevant biological activity. **Organic Chemistry International**, v. 2011, p. 1-35, 2011.

AMBRÓSIO, S.R.; OKI, Y.; HELENO, V.C.G.; CHAVES, J.S.; NASCIMENTO, P.G. B.D.; LICHSTON, J.E.; CONSTANTINO, M.G.; VARANDA, E.M.; DA COSTA, F.B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2052-2060, 2008.

ARAÚJO, N.; KOHN, A.; OLIVEIRA, Á. A.; KATZ, N. Schistosoma mansoni: ação da lovastatina no modelo murino. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 35-38, 2002.

Arctium lappa L. (Asteraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas)

ASTRAY, G.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; MEJUTO, J.C.; RIAL-OTERO, R.; SIMAL-GÁNDARA, J. A review on the cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 7, n. 33, p. 1631-1640, 2009.

BACH, S.M.; FORTUNAC, M.A.; ATTARIANA, R.; DE TRIMARCOC, J.T.; CATALÁN, C.A.N.; AV-GAYA, Y.; BACHA, H. Antibacterial and Cytotoxic Activities

of the Sesquiterpene Lactones Cnicin and Onopordopicrin. **Natural Product Communications**, vol. 6, n. 2, 2011.

BACHELIER, A.; MAYER, R.; KLEIN, C.D. Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, n. 21, p. 5605-5609, 2006.

BALAJI, A.; PANDEY, V.P.; SRINATH, M.S.; MANAVALAN, R. Synthesis and characterization studies of cisplatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex, **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 1135– 1143, 2009.

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

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

BERGER, S.; SICKER, D. Classics in Spectroscopy, Isolation and Structure Elucidation of Natural Products, **Wiley-VCH**, 2009, ISBN: 978-3-527-32516-0.

BITTENCOURT, Vanessa Cristina Estevam. **COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE INSETICIDAS EM CICLODEXTRINAS: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE INSETICIDA FRENTE A LARVAS DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

BLOKZIJL, W.; ENGBERTS, J.B.F.N. Hydrophobic Effects - Opinions and Facts. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 32, n. 11, p. 1545-1579, 1993.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645–666, 2007.

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

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 467-478, 2008.

CAN, Z.; BALTAS, N.; KESKIN, S.; YILDIZ, O.; KOLAYH, S. Properties of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity and Phenolic Profiles of Şevketi Bostan (*Cnicus benedictus* L.) Cultivated in Aegean Region from Turkey. **Turkish Journal of Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 308-314, 2017.

CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 31, n. 8, p. 747-756, 2005.

CARPENTER, T.O.; PETTIFOR, J.M.; RUSSELL, R.M.; PITHA, J.; MOBARHAN, S.; OSSIP, M.S. Severe hypervitaminosis A in siblings: evidence of variable tolerance to retinol intake. **Journal Pediatrics**, v. 111, p. 507-512, 1987.

CARVALHO, L. S. A. **Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato bruto e chalconas isoladas das raízes de *Glycyrrhiza inflata* (Fabaceae) frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni***. 2013.82f. Trabalho de Conclusão de curso – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora.

CARVALHO, O.S.; DUTRA, L.V.; MOURA, A.C. M.; FREITAS, C.C.; AMARAL, R.S.; DRUMMOND, S.C.; FREITAS, C.R.; SCHOLTE, R.G.C.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; MELO, G.R.; CORREIA, V.R.M.; GUERRA, M. **Desenvolvimento de um sistema de informações para o estudo, planejamento e controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais**. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, n. XII, 2005, Goiânia. Anais. São José dos Campos: INPE, 2005. p. 2083-2086. ISBN 85-17-00018-8. CD-ROM.

CARVALHO, O.S.; ROCHA, R.S.; MASSARA, C.L.; KATZ, N. Expansão da esquistossomose mansoni em Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 295-298, 1987.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar: dados estatísticos. São Paulo: CVE, 2005.

CHADWICK, M.; TREWIN, H.; GAWTHROP, F.; WASGSTAFF, C. Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12780-12805, 2013.

CHAIN, F.; ROMANO, E.; LEYTON, P.; PAIPA, C.; CATALAN, C.A.N.; FORTUNA, M.A.; BRANDAN, S.A. An experimental study of the structural and vibrational properties of sesquiterpene lactone cnicin using FT-IR, FT-Raman, UV-visible and NMR spectroscopies. **Journal of Molecular Structure**, p. 160-169, 2014.

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

CHAVES, I.S.; RODRIGUES, S.G.; MELO, N.F.S.; DE JESUS, M.B; FRACETO, L.F.; DE PAULA, E.; PINTO, L.M.A. Alternativas para o Tratamento da Esquistossomose: Caracterização Físico-Química do Complexo de Inclusão entre Praziquantel e Hidroxipropil- β -Ciclodextrina **Lat. Am. J. Pharm**, v. 29, n. 7, p. 1067-1074, 2010.

CHEN, Guo-Zhong; FOSTER, Lewys; BENNETT, James L. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme a reductase activity in *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. [Berlim], v. 342, n.4, p. 477 – 482, out. 1990. Disponível em: < doi: 10.1007/BF00169467 >. Acesso em: 09 mar. 2014.

CHEVILLON, C.; DE MEEÛS, T.; MCCOY, K.D. Population genetics and molecular epidemiology of infectious diseases. In: **New Frontiers of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases**. Springer, Dordrecht, p. 45-76, 2012.

CHOWDARY, K.P.R.; SHANKAR, K.R.; TANNIRU, A. Recent research on cyclodextrin complexation in formulation development – A review. **Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 1576-1583, 2014.

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

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

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

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

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

DE COURTADE, S.B.; FORTUNA, M.A.; ATTARIAN, R.; DE TRIMARCO, J.T.; CATALAN, C.; AV-GAY, Y. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin. **Natural Product Communications**, v. 6, p. 163-166, 2009.

DE JESUS, M.B.; PINTO, L.M.A.; FRACETO, L.F.; MAGALHÃES, L.A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; DE PAULA, E. Improvement of the oral praziquantel anthelmintic effect by cyclodextrin complexation. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 1, p. 21–26, 2010.

DE MORAES, J. Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni* 2011. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT.

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

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

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

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

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

DE MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the *in vitro* activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide,

against *Schistosoma mansoni*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 3, p. 548-558, 2011a.

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

DE MORAES, J.; SILVA, M.P.N.; OHLWEILER, F. P.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in Biomphalaria tenagophila (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 77-82, 2009.

DE OLIVEIRA PENIDO, M.L., ZECH COELHO, P.M., DE MELLO, R.T., Pilo-Veloso, D., DE OLIVEIRA, M.C., KUSEL, J.R., NELSON, D.L. Antischistosoma activity of aminoalkanethiols, alkylaminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Tropica** 108, 249–255.2008.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DENADAI, Â.M.L. **Caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares formados por β -ciclodextrina e fármacos**. Tese (Doutorado em química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

DENADAI, Â.M.L., SANTORO, M.M.; LOPES, M.M; LOPES, T.P; CHENNA, A.; DE SOUSA, F.B.; GOMES, M.T.R.; GUZMÁN, F.P. A Supramolecular Complex between Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006.

DENADAI, Â.M.L.; SANTORO, M.M.; DA SILVA, L.H; VIANA, A.T.; SANTOS, R.A.S.; SINISTERRA, R.D. Self-assembly characterization of the β -cyclodextrin and

hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 55, n. 1-2, p. 41-49, 2006b.

DENADAI, Â.M.L.; TEIXEIRA, K.I.; SANTORO, M.M.; PIMENTA, A.M.; CORTÉS, M.E.; SINISTERRA, R.D. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 15, p. 2286-2296, 2007.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3° ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltda, p. 539, 2009.

DIAS, Mirna Meana. **Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto e metabólitos secundários dos frutos da**

DJAMILA, C.; AKYM, A.; FAIZA, M.; CHAHINEZ, B.; NACER-BEY, N.; Anatomical, phytochemical and pharmacological studies of roots of *Cnicus benedictus* L. **International Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, p. 204-208, 2013.

DUBOIS, F.; CABY, S.; OGER, F.; COSSEAU, C.; CAPRON, M.; GRUNAU, C.; DISSOUS, C.; PIERCE, R. J. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 168, p. 7-15, 2009.

EGYED, O. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 1, n. 2, p. 225–227, 1990.

EREL, S.B.; KARAALP, C.; BEDIR, E.; KAEHLIG, H.; GLASL, S.; KHAN, S.; KRENN, L. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. **Pharm Biol**, v. 49, n. 8, p. 840-849, 2011.

EVANS, D. F.; WENNERSTROM, H. **The Colloidal Domain**. Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet. 2nd ed.; WILEY-VCH: New York, 1999.

Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

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

FREYER, M.W; LEWIS, E.A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions **Methods in Cell Biology**, v. 84, 2008.

GHIASY-OSKOEI, M.; AGHAALIKHANIA, M.; SEFIDKONB, F.; MOKHTASSI-BIDGOLIA, A.; AYYARIC, M. Blessed thistle agronomic and phytochemical response to nitrogen and plant density. **Industrial Crops & Products**, v. 122, p. 566-573, 2018.

GHOSH, S.; CHATTORAJ, S.; CHATTOPADHYAY, N. Interaction of β -cyclodextrin with Nile red in a single live CHO cell: an initiative towards developing a prospective strategy for the excretion of adsorbed drugs from the cell membrane. *The Royal Society of Chemistry*, v. 139, p. 5664–5668, 2014.

GIDWANI, B.; VYAS, A. A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **BioMed Research International**. 2015.

GRYSEELS, B.; STELMA, F.; TALLA, I.; POLMAN, K.; VAN DAM, G.; SOW, S., DIAW, M.; STURROCK, R.F., DECAM, C.; NIANG, M., DEELDER, A.M. Immune-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in recently exposed community in Senegal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 271-276, 1995.

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

GUIMARÃES, M.A.; DE OLIVEIRA, R.N.; DE ALMEIDA, R.L.; MAFUD, A.C.; SARKIS, A.L.V.; GANASSIN, R.; DA SILVA, M.P.; ROQUINI, D.B.; VERAS, L.M.; SAWADA, T.C.H.; ROPKE, C.D.; MUEHLMANN, L.A.; JOANITTI, G.A.; KUCKELHAUS, S.A.S.; ALLEGRETTI, S.M.; MASCARENHAS, Y.P.; DE MORAES, J.; LEITE, J.R.S.A. Epiisopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without acute toxicity. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, e0196667.

HALL, N. **Neoquímica, A química moderna e suas aplicações**. Bookman, Porto Alegre, 2004.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P.G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe?. **Frontiers in immunology**, v. 4, Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596444>>. Acesso em: 20 Jun de 2013.

HIEMENZ, P.C. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 2th ed.; Marcel Dekker, Inc. New York, 1986.

HO, W.E.; PEH, H.Y.; CHAN, T.K.; WONG, W.S. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 1, p. 126–139, 2014.

HORN, G.; KUPFER, A.; RADEMACHER, A.; KLUGE, H.; KALBITZ, J.; EIBNER, H.; DRÄGER, B. *Cnicus benedictus* as a potential low input oil crop. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 117, p. 561-566, 2015.

HULSTIJN, M.; BARROS, L. A.; NEVES, R. H.; MOURA, E. G.; MACHADO-SILVA, J. R. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. **Parasitology**, v. 126, p. 53-61, 2003.

ILDIKO, S.; PALLAG, A.; BIDAR C.F. The antimicrobial activity of the *Cnicus benedictus* L. extracts. **Analele Universitatii din Oradea Fascicula Biologie**, v. 1, p. 126-128, 2009.

INSTRUTECNICA (2011). **Potencial Zeta e estabilidade coloidal**. Disponível em: <<http://www.instrutecnica.com/represen/bic/teoriazeta.html>> Acesso: 26 JULHO 2018.

IRIE, T.; UEKAMA K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, 1997.

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

ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular & Surface Forces**. 2nd ed.; Academic Press: London, 1991.

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

JAMBHEKAR, S.S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 356- 362, 2006.

JANA, B.; GHOSH, S.; CHATTOPADHYAY, N. Competitive binding of Nile red between lipids and β -cyclodextrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 126, n. 5, p. 1-10, 2013.

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

JERBA, V.F.; FERNANDES, C.D. Caracterização dos tipos de tricomas do sistema caulinar do estílo-santes mineirão. **Publication UEPG-Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e-Engenharias**, v. 10, p. 7-12, 2004.

JIANG, Y.; JIANG, X.; LAW, K. Enhanced anti-tumor effect of 9-nitro-camptothecin complexed by hydroxypropyl- β -cyclodextrin and safety evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 415, n. 1-2, p. 252–258, 2011.

JÖHRER, K.; OBKIRCHER, M.; NEUREITER, D.; PARTELI, J.; ZELLE-RIESER, C.; MAIZNER, E.; KERN, J.; HERMANN, M.; HAMACHER, F.; MERKEL, O.; WACHT, N.; ZIDORN, C.; SCHEIDELER, M.; GREIL, R. Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 6, p. 681-693, 2012.

KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, p. 823-847, 2008.

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

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

KEISER, J.; INGRAM, K.; VARGAS, M.; CHOLLET, J., WANG, X., DONG, Y., VENNERTSTROM, J.L. *In vivo* activity of aryl ozonides against *Schistosoma* species. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 1090–1092, 2012.

KEISER, J.; UTZINGER, J.; Antimalarials in the treatment of schistosomiasis. **Curr. Pharm. Des.** v. 18, n.24, p. 3531–3528, 2012.

KELSEY, R.G.; LOCKEN, L.J. Phytotoxic properties of cnicin, a sesquiterpene lactone from *Centaurea maculosa* (spotted knapweed). **J Chem Ecol**, v. 13, n.1, p. 19-33, 1987.

KIM, S.H.; SONG, J.H.; CHOI, B.G.; KIM, H.J.; KIM, T.S. Chemical modification of santonin into a diacetoxy acetal form confers the ability to induce differentiation of

human promyelocytic leukemia cells via the down-regulation of NF- κ B DNA binding activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 13117-13125, 2006.

KRZYSZTOF, C.; KATARZYNA, C. Use of cyclodextrins in topical formulations. Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 467-478, 2008.

KURITA, M.; TANIGAWA, M.; NARITA, S.; USUKI, T. Synthetic study of cnicin: Synthesis of the side chain and its esterification. **Tetrahedron Letters**, v. 57, 2016.

LAGO, E.M.; XAVIER, R.P.; TEIXEIRA, T.R.; SILVA, L.M.; DA SILVA-FILHO, A.A.; DE MORAES, J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 89-120, 2017.

LANNA, E.G.; BITTENCOURT, V.C.E.; MOREIRA, A.M.S.; DA SILVA, J.G.; SOUSA, O.V.; DENADAI, A.M.L. Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin. **J Incl Phenom Macrocycl Chem**, v. 85, p. 247-259, 2016.

LEE, S. Artemisinin, promising lead natural product for various drug developments. **Rev. Med. Chem.**, v. 7, n. 4, p. 411-422, 2007.

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

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

LEVCHENKO, S.; XU, G.; TEEL, D.; MARIOTTI, M.L.R.; WALKER, M.K. Recent progress and perspectives of space electric propulsion systems based on smart nanomaterials. **Nature Communication**, v. 8, 2018.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 329, n. 1, p. 1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; MASSON, M.; BREWSTER, M.E. Self-Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 93, n. 5, 2004.

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

MALANGA, M.; SZEMAN, J.; FENYVESI, E.; PUSK, I.; CSABAI, K.; GYÉMÁNT, G.; FENYVESI, F.; SZENTE, L. "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 105, p. 2921-2931, 2016.

MALVERN INSTRUMENTS (2005). **Pharmaceutical Formulations and The Importance of Zeta Potential to Pharmaceutical Formulations**. Disponível em: <<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1234>>.

MANUAL MSD. Versão para profissionais de saúde. **Ciclo de vida simplificado do Schistosoma**. Disponível em <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/multimedia/figure/inf_schistosoma_life_cycle_pt> última atualização: 2019. Acesso em 24, junho, 2019.

MARAGOS, S.; ARCHONTAKI, H.; MACHERAS, P.; VALSAMI, G. Effect of Cyclodextrin Complexation on the Aqueous Solubility and Solubility/Dose Ratio of Praziquantel. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 10, n. 4, 2009.

MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 1, 2002.

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

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

MEJIA-ARIZA, R.; GRAÑA-SUÁREZ, L; VERBOOM, W.; HUSKENS, J. Cyclodextrin-based supramolecular nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 00, n. 1, p. 1-3, 2013.

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

MERFORT, I. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 115-130, 2002.

MITSUMI, Y., MIURA, M., AOKI, Y. **J. Helminthol.** 83, 7.2009.

MORAES, J. **Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. Tese de doutorado. Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia/UPS – Instituto Butantan, São Paulo, p. 1-268, 2011.

MOREIRA, Ana Maria dos Santos. **COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE AVERMECTINAS COM B-CICLODEXTRINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA LARVAS DO *Aedes aegypti***. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação multicêntrico em química de Minas Gerais – Universidade Federal de São João Del-Rei) Universidade Federal de São João Del-Rei, São João Del-Rei, 2016.

MULLER, N. Search for a Realistic View of Hydrophobic Effects. **Accounts of Chemical Research**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 1990.

MURDOCK, R.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A.M.; SCHLAGER, J.J.; HUSSAIN, S.M. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. Toxicological Sciences, v. 101, n. 2, p. 239-253, 2008.

NDJONKA, D.; RAPADO, L.N.; SILBER, A.M.; LIEBAU, E.; WRENGER, C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 3395-3439, 2013.

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

NEVES, J. K.; BOTELHO, S.P.; DE MELO, C.M.; PEREIRA, V.R.; DE LIMA, M.D.C.; PITTA IDA, R.; ALBUQUERQUE, M. C.; GALDINO, S. L. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.**, v. 107, p. 531-538, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: WERMUTH, C.; ALDOUS, D.; NOËL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, p. 2, 2008.

PATIL, J.S.; KADAM, D.V; MARAPUR; S.C; KAMALAPUR, M.V. Inclusion complex system; a novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 29-34, 2010.

PAUN, G.; NEAGU, E.; ALBU, C.; LUCIANRADU, G. Inhibitory potential of some Romanian medicinal plants against enzymes linked to neurodegenerative diseases and their antioxidant activity. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 42, 2015.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 223-290, 1968.

PELLON, A.B.; TEIXEIRA, I. Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIÊNE**, Recife. Anais Recife: [s.n.], v. 8, p. 117, 1950.

PENG, Y.; JIAN, Y.; ZULFIQAR, A.; LI, B.; ZHANG, K.; LONG, F.; PENG, C.; CAI, XIONG; KHAN, I.A.; WANG, W. Two new sesquiterpene lactone glycosides from *Cnicus benedictus*. **Natural Product Research** v. 2, 2017.

PERASSOLO, M.; CARDILLO, A.B.; BUSTO, V.D.; GIULIETTI, A.M.; TALOU, J.R. Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Plants and Metabolic Engineering for Their Biotechnological Production. In: SULSEN, V.P.; MARTINO, V.S. **Sesquiterpene Lactones**. Springer, p. 47-91, 2018.

PITHA, J.; MILECKI, J.; FALES, H.; PANNELL, L.; UEKAMA, K. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. **International Journal Pharmaceutics**, v. 29, n. 1, p. 73-82, 1986.

PITHA, J.; SZENTE, L. Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners. **Controlled Drug Delivery**, v. 1, p. 125-14, 1983.

PIZZOL, C.D.; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B.; RESTREPO, J.A.S.; PITTELLA, F.; SILVA, A.H.; SOUZA, P.A.; CAMPOS, A.M.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 8, p. 8581-8596, 2014.

PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L.R.; QUININO, L.R.M.; BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163-75, 2008.

PORTELA, J.; BOISSIER, J.; GOURBAL, B.; PRADINES, V.; COLLIE, V.; COSLEDAN, F.; MEUNIER, B.; ROBERT, A. Antischistosomal Activity of Trioxaquines: In Vivo Efficacy and Mechanism of Action on *Schistosoma mansoni* **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, e1474, 2012.

RABOISSON, P.; ROGNAN, D. **The Practice of Medicinal Chemistry. 4^a Ed., Elsevier**, p.101-139, 2015.

RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 11, p. 1142, 1996.

REKHARSKY, M.V.; INOUE, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1875-1918, 1998.

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

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1573-1580, 1976.

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

ROY, N.; GHOSH, R.; DAS, K.; ROY, D.; GHOSH, T.; ROY, M.N. Study to synthesize and characterize host-guest encapsulation of antidiabetic drug (TgC) and hydroxy propyl- β -cyclodextrin augmenting the antidiabetic applicability in biological system. **Journal of Molecular Structure**, 2018.

SAÇO, L.C. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA ARCTIINA, EXTRAÍDA DE *Arctium lappa* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, 2015.

SAENGER, W. Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry. **Angewandte Chemie - International Edition in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.

SALTÃO, R., VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 37, n. 1, jan./abr., 2001

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

SAYED, A.A, SIMEONOV, A., THOMAS, C.J., INGLESE, J., AUSTIN, C.P., WILLIAMS, D.L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nat. Med.** 14(4), 407–412 (2008).

SEN, A.; TURAN, S.O.; BITIS, L. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 541-546, 2017.

SILVA, K.E.R.; SILVA, R.M.F; COSTA, S.P.M.; ROLIM, L.A.; LIMA, M.C.A.; ROLIM-NETO, P.J. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2012.

SILVA, Livia Mara. **ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

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

SKELLY, P.J.; DA`DARA, A.A.; LI, X.H.; BORGES, W.C.; WILSON, R.A; SOLDATI, P.P. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando manteiga**

natural para aplicação tópica. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 99f, 2015.

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

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The infection of Laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, v. 55, n. 4, p. 695-700, 1965.

SÓLYOMVÁRY, A.; TÓTH, G.; KRASZNI, M.; NOSZÁL, B.; MOLNÁR-PERL, I.; BOLDIZSÁR, I. Identification and quantification of lignans and sesquilignans in the fruits of *Cnicus benedictus* L.: quantitative chromatographic and spectroscopic approaches. **Microchem. J.**, v. 114, p. 238–246, 2014.

SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; JÚNIOR, F.C.F; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural*. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

SPITELLER, P. Classics in spectroscopy. Isolation and structure elucidation of natural products. Von Stefan Berger und Dieter Sicker. **Angew. Chem.**, v. 121, n. 42, p. 7869–7870, 2009.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin Technology. **Springer Science & Business Media**, 1988.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1743-1753, 1998.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 17–28, 1999.

TEŠEVIĆ, V.; MILOSAVLJEVIĆ, S.; VAJS, V.; JANAČKOVIĆ, P.; ĐORĐEVIĆ, I.; JADRANIN, M.; VUČKOVIĆ, I. Quantitative analysis of sesquiterpene lactone cnicin

in seven *Centaurea* species wild-growing in Serbia and Montenegro using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. **J. Serbian Chem. Soc.**, v. 72, n. 12, p. 1275–1280, 2007.

THOMPSON, D.O. Cyclodextrins - Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 1, p. 101-104, 1997.

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

TURNBULL, W.B.; DARANAS, A.H. On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc.*, v. 125, n. 48, p. 14859-14866, 2003.

UCHIDA, I.; KURIYAMA, K. The π - π^* Circular Dichroism of α,β -unsaturated γ -lactones. **Tetrahedron Letters**, n. 43, p. 3761 - 3764, 1974.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 2045-2076, 1998.

ULBRICHT, C.; BASCH, E.; DACEY, C.; DITH, S.; HAMMEMESS, P.; HASHMI, S.; SEAMON, E.; VORA, M.; WEISSNER, W. An Evidence-Based Systematic Review of Blessed Thistle (*Cnicus benedictus*) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 5, n. 4, 2008.

UTZINGER, J.; XIAO, S.; N'GORAN, E.K.; BERGQUIST, R.; TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **Int. J. Parasitol**, v. 31, n. 14, p. 1549–1562, 2001.

VALENTIM, C.L.; CIOLI, D.; CHEVALIER, F.D.; CAO, X.; TAYLOR, A.B.; HOLLOWAY, S.P.; PICA-MATTOCCIA, L.; GUIDI, A.; BASSO, A.; TSAI, I.J.; BERRIMAN, M.; CARVALHO-QUEIROZ, C.; ALMEIDA, M.; AGUILAR, H.; FRANTZ,

D.E.; HART, P. J.; LOVERDE, P. T.; ANDERSON, T. J. Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in Schistosome parasites. **Science**, v. 342, n. 6164, p. 1385-1389, 2013.

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

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

WHO. Schistosomiasis. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>> Última atualização: janeiro/2017. Acesso em: 17, maio, 2017b.

WHO. Schistosomiasis. **Geneva (Switzerland): World Health Organization**. Disponível em <<https://www.who.int/en/news-room/factsheets/detail/schistosomiasis>> Última atualização: abril/ 2019. Acesso em 24, junho, 2019.