



Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Dissertação de Mestrado

ENCAPSULAMENTO DE COMPLEXOS DE Au^{III} DERIVADOS DE
TIOSEMICARBAZONAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA NO TRATAMENTO
DA DOENÇA DE CHAGAS

Autor: Raphael Tristão Cruvinel Silva

Orientadora: Prof. Dr. Pedro Ivo da Silva Maia

UBERABA

2019

RAPHAEL TRISTÃO CRUVINEL SILVA

ENCAPSULAMENTO DE COMPLEXOS DE Au^{III} DERIVADOS DE
TIOSEMICARBAZONAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA NO TRATAMENTO
DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química, área de concentração Química, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ivo da Silva Maia

Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Aparecido Moreto

UBERABA

2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S583e	<p>Silva, Raphael Tristão Cruvinel Encapsulamento de complexos de Au^{III} derivados de tiossemicarbazonas para liberação controlada no tratamento da doença de chagas / Raphael Tristão Cruvinel Silva. -- 2019. 109 f. : il., fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019 Orientador: Prof. Dr. Pedro Ivo da Silva Maia Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Aparecido Moreto</p> <p>1. Química farmacêutica. 2. Compostos de ouro. 3. Nanopartículas. 4. Tripanossomicidas. 5. Doença de Chagas - Tratamento farmacológico. I. Maia, Pedro Ivo da Silva. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 615.015.11</p>
-------	---

RAPHAEL TRISTÃO CRUVINEL SILVA

Encapsulamento de complexos de Au^{III} derivados de tiossemicarbazonas para liberação controlada no tratamento da doença de Chagas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, área de concentração Química Inorgânica Medicinal, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Uberaba, 15 de Março de 2019.

Banca examinadora:

Pedro Ivo da Silva Maia

Prof. Dr. Pedro Ivo da Silva Maia

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Renata Galvão de Lima

Profa. Dra. Renata Galvão de Lima

Universidade Federal de Uberlândia

Natália Bueno Leite Slade

Profa. Dra. Natália Bueno Leite Slade

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho ao meu pai, José Henrique
Cruvinel da Silva (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me colocar nesta caminhada, por ser uma fonte de força e sabedoria nos momentos difíceis que passei.

Agradeço aos meus pais José Henrique (*in memorian*) e Delma, por me apoiarem nas inúmeras decisões que acarretaram na minha presença no programa de pós-graduação em química da UFTM. Por estarem ao meu lado em todo momento, não só para educar, mas em momentos tristes e felizes que fizeram e irão fazer parte da minha vida, o mais meu sincero obrigado.

Agradeço ao meu irmão Frederico, assim como meus pais, por me apoiar totalmente a chegar até aqui. Apesar de algumas brigas e discussões no passado, tenho certeza que isto só fortaleceu a relação que temos hoje.

Agradeço à minha namorada, companheira, amiga Leticia por ser esta pessoa incrível, que em nenhum momento destes sete anos juntos faltou com carinho, entendimento, conselhos, responsabilidade. Sempre está presente com uma palavra que conforta a minha pessoa. Assim como meus pais e meu irmão, ela é uma grande responsável por estar aqui.

Aos meus orientadores Pedro Ivo e Jeferson Moreto pela orientação, pela confiança na realização deste trabalho, pelos ensinamentos científicos adquiridos nesta jornada e principalmente pela enorme compreensão e paciência que tiveram comigo neste tempo.

À professora Dra. Carolina Gonçalves Oliveira, por contribuir e me auxiliar neste trabalho.

À professora Dra. Zumira Aparecida Carneiro, à Dra. Carla Duque Lopes e ao professor Dr. Sérgio de Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pelos testes biológicos.

À professora Renata Fonseca Vianna Lopez por sua enorme receptividade, por me fazer sentir em casa no Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e de Administração Tópica (NanoTop) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, não somente pela estrutura oferecida, mas também pelas dicas, conselhos e ensinamentos para que este trabalho ocorresse da melhor forma, assim como as suas alunas Gabriela, Danielle, Camila, Talita e a técnica do laboratório Patrícia.

Agradeço, em especial, à Luciana Facco Dalmolin por desde o início do trabalho em Ribeirão Preto estar presente na realização do mesmo. Nunca faltou com sua inteligência, sabedoria e experiência para guiar a realização deste trabalho. A sua enorme paciência e generosidade pôr em grande parte deixar de fazer suas coisas para me auxiliar.

A todos os meus colegas do laboratório 7, pela amizade dentro e fora do ambiente de trabalho.

A todos meus amigos, em especial Pedro e Silvana, por me receberem de braços abertos durante o tempo que estive em Ribeirão Preto.

Ao técnico do Instituto de Química da UFU, Flaysner Magayver pelas análises de RMN.

Ao aluno de doutorado Sival pelas análises de infravermelho realizadas na UFU.

Ao Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação da UFTM, pelo apoio institucional.

Ao Grupo de Pesquisa em Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), por disponibilizar o equipamento de infravermelho.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos os professores que participaram da minha formação.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência”

Henry Ford

RESUMO

O desenvolvimento de compostos de coordenação contendo o centro metálico Au^{III} vem ganhando destaque na área da Química Medicinal. Recentemente, o grupo de pesquisa NDCBio relatou dois complexos de Au^{III} contendo ligantes da classe das tiossemicarbazonas como novos agentes promissores para o tratamento da doença de Chagas, o [AuCl(L₁)] e o [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O. No presente trabalho, foram preparadas nanopartículas (NPs) do poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) como sistemas de liberação para ambos os complexos através da técnica de emulsificação e evaporação de solvente. Os resultados obtidos revelaram eficiências de encapsulamento (EE%) determinadas por método indireto próximas a 90 % para o [AuCl(L₁)] e 99,7 % para o [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O, com tamanho das NPs/[AuCl(L₁)] na faixa de 270-280 nm e índice de polidispersividade (PDI) próximos a 0,150, enquanto as NPs/[Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O ficaram compreendidas na faixa de 298,3-300,5 nm com PDI próximo a 0,400. Após o processo de encapsulamento, o Potencial Zeta das nanopartículas de ambos os complexos aumentou em relação às NPs contendo apenas o PLGA (de -20 mV para a faixa de -6 a 3 mV). Além disso, a curva de liberação do [AuCl(L₁)] foi determinada e estudada por modelos matemáticos, sendo o modelo de Korsmeyer-Peppas o que mais se ajustou aos dados experimentais, com R² = 0,96219 para a formulação liofilizada e R² = 0,97864 para a formulação em suspensão. Deste modo, foi possível identificar o mecanismo de liberação do complexo da matriz polimérica como sendo por meio de difusão e relaxamento da cadeia polimérica. Já para o complexo [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O não foi possível encontrar um meio receptor adequado para realização da curva de liberação. Adicionalmente, por meio das imagens de alta resolução obtidas via MEV, foi possível observar que os sistemas nanoparticulados de ambos os complexos produziram partículas esféricas com tamanhos médios próximos aos analisados via técnica de DLS. Através de ensaios biológicos *in vivo* com camundongos Balb/C infectados com parasitas do *T. cruzi*, foi constatado que o [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O não foi liberado da matriz polimérica, não havendo o efeito desejado durante o tratamento. Por outro lado, os testes *in vivo* utilizando as NPs/[AuCl(L₁)] mostraram que o complexo encapsulado é mais eficiente que o complexo livre, obtendo-se uma redução de 55 % da parasitemia com relação ao controle no sétimo dia de tratamento, além de uma maior sobrevida dos camundongos.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas, sistemas de liberação nanoparticulados, compostos de coordenação, atividade tripanocida, complexos de ouro

ABSTRACT

The development of coordination compounds containing the Au^{III} metal center has been gaining prominence in the area of Medicinal Chemistry. Recently, the NDCBio research group reported two Au^{III} complexes containing the thiosemicarbazone ligand class as new promising agents for the treatment of Chagas' disease, [AuCl(L₁)] and [Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O. In the present work, nanoparticles (NPs) of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have been prepared as delivery systems for both complexes through the emulsification and solvent evaporation technique. The obtained results revealed encapsulation efficiencies (EE%) determined by indirect method close to 90 % for [AuCl(L₁)] and 99.7% for [Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O, with NPs/[AuCl(L₁)] size in the 270-280 nm range and polydispersity index (PDI) close to 0.150, while the NPs/[Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O were in the 298.3 – 300.5 nm range with PDI close to 0.400. After the encapsulation process, the Zeta potential of the nanoparticles of both complexes increased in relation to NPs containing only PLGA (from -20 mV to the range of -6 to 3 mV). In addition, the [AuCl(L₁)] release curve was determined and studied by mathematical models, being the Korsmeyer-Peppas model the one that best fitted to the experimental data, with R² = 0.9199 for the lyophilized formulation and R² = 0.97864 for the suspension formulation. Thus, it was possible to identify the release mechanism of the complex from the polymeric matrix as being through diffusion and relaxation of the polymeric chain. For the [Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O complex it was not possible to get a suitable receptor medium to perform the release curve. Additionally, by means of the high resolution images obtained by SEM, it could be observed that the nanoparticulate systems of both complexes produced spherical particles with average sizes close to those analyzed by the DLS technique. By means of *in vivo* biological assays with Balb/C mice infected with *T. cruzi* parasites, it was pointed out that [Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O was not released from the polymer matrix, since there was no desired effect during the treatment. On the other hand, the *in vivo* tests using the NPs/[AuCl(L₁)] showed that the encapsulated complex is more efficient than the free complex, obtaining a parasitemia reduction of 55 % in relation to the control on the seventh day of treatment, in addition to a longer mice survival.

Keywords: Neglected diseases, nanoparticulate delivery systems, coordination compounds, trypanocidal activity, gold complexes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da Auranofina.....	23
Figura 2 - Estrutura química dos compostos $[\text{AuCl}_2(\text{damp})]$ (1) e $[\text{Au}(\text{OAc})_2(\text{damp})]$ (2)	23
Figura 3 - Estrutura química do complexo de Au^{III} derivado do ligante tioéster de bis(imidazol) tripodal.....	24
Figura 4 - Estrutura química do complexo de Au^{III} derivado do bis(tiossemicarbazonato)....	24
Figura 5 - Estrutura química do complexo $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$	25
Figura 6 - Estrutura química das tiossemicarbazonas (TSCs).....	26
Figura 7 - Estrutura química do complexo de Au^{III} obtido com o ligante N(4)-tolil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona.....	27
Figura 8 - Inseto transmissor da doença de Chagas, espécie <i>Triatoma tibiamaculata</i>	28
Figura 9 - Estrutura química do Benzonidazol (Bz) e Nifurtimox (Nfx).....	29
Figura 10 - Estrutura química do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}^{\text{Me}})]$	30
Figura 11 - Estrutura química ligantes híbridos obtidos pela combinação de uma tiossemicarbazida com uma tiouréia obtidas (A) e seus derivados organometálicos de Au^{III} (B)	31
Figura 12 - Estrutura química do ligante H_2L_1 (A) e do seu complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (B)	32
Figura 13 - Estrutura química da molécula H_2bdtc	35
Figura 14 - Estrutura química do PLGA	36
Figura 15 - Estrutura química dos complexos $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	37
Figura 16 - Estrutura química do agente complexante (H_2L_1)	43
Figura 17 - Estrutura química do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$	44
Figura 18 - Estrutura química do ligante H_2L_1^4	45
Figura 19 - Estrutura química do complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	46
Figura 20 – Esquema da síntese para obtenção do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$	51
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em solução de DMSO (δ em ppm).....	52
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm).....	54
Figura 23 - Esquema da técnica de emulsificação e evaporação de solvente para obtenção de NPs de PLGA com complexos de $\text{Au}(\text{III})$	56
Figura 24 - Esquema representativo de nanocápsulas e nanoesferas: a) princípio ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) princípio ativo adsorvido a parede do	

polímero nas nanocápsulas; c) princípio ativo retido na na matriz polimérica das nanoesfera; d) princípio ativo adsorvido ou disperso no polímero das nanoesferas	56
Figura 25 - Espectro eletrônico do $[AuCl(L_1)]$ em CH_2Cl_2 em concentração de 3×10^{-5} mol/L	62
Figura 26 - Espectro eletrônico do $[AuCl(L_1)]$ em DMSO em concentração de 3×10^{-5} mol/L	63
Figura 27 - Curva de calibração e equação gerada de $[AuCl(L_1)]$ em diclorometano	63
Figura 28 - Curva de calibração e equação gerada de $[AuCl(L_1)]$ em dimetilsulfóxido	64
Figura 29 - Espectro eletrônico de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ em diclorometano com concentração de $5,55 \times 10^{-5}$ mol/L	65
Figura 30 - Espectro eletrônico de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ em dimetilsulfóxido com concentração de $4,5 \times 10^{-5}$ mol/L	65
Figura 31 - Curva de calibração e equação gerada de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ em diclorometano	66
Figura 32 - Curva de calibração e equação gerada de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ em dimetilsulfóxido.....	66
Figura 33 - Estabilidade das nanopartículas de PLGA contendo $[AuCl(L_1)]$ quanto ao tamanho e índice de polidispersividade	70
Figura 34 - Estabilidade das nanopartículas de PLGA contendo $[AuCl(L_1)]$ em relação ao potencial Zeta (mV).....	71
Figura 35 - Espectro vibracional na região do infravermelho do PLGA e das NPs/branca....	74
Figura 36 - Espectro vibracional na região do infravermelho das NPs/branca e NPs/ $[AuCl(L_1)]$	75
Figura 37 - Espectro vibracional na região do infravermelho das NPs/branca e NPs/ $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$	76
Figura 38 - Esquema representativo do sistema de liberação in vitro	77
Figura 39 - Curva de liberação do complexo $[AuCl(L_1)]$ (M_t / M_∞ versus tempo (t)) encapsulado em matriz polimérica de PLGA	78
Figura 40 - Ajuste dos modelos matemáticos utilizados para a liberação das NPs/ $[AuCl(L_1)]$ liofilizadas	79
Figura 41 - Ajuste dos modelos matemáticos utilizados para a liberação das NPs/ $[AuCl(L_1)]$ em suspensão	79
Figura 42 - Micrografia das NPs/ $[AuCl(L_1)]$ (Formulação IX), aumento: 50 kx.	81
Figura 43 - Curva de polidispersão das NPs/ $[AuCl(L_1)]$ (Formulação IX)	81

Figura 44 - Micrografia das NPs de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação IV), aumento: 50 kx.....	82
Figura 45 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação IV)....	82
Figura 46 - Gráfico da quantidade de parasitas em microlitro de sangue versus dias após a infecção.....	83
Figura 47 - Gráfico da quantidade de parasitas por microlitro de sangue em função do tempo	84
Figura 48 - Gráfico do percentual de sobrevivência em função do tempo	84
Figura 49 - Espectro de absorção na região do infravermelho de H_2L_1 em ATR (cm^{-1})	95
Figura 50 - Espectro de absorção na região do infravermelho de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em ATR (cm^{-1})	95
Figura 51 - Espectro de absorção na região do infravermelho de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em ATR (cm^{-1})	96
Figura 52 - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação I).....	97
Figura 53 - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação II)	97
Figura 54 - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação III).....	97
Figura 55 - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação IV).....	98
Figura 56 - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação V)	98
Figura 57 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação I)	98
Figura 58 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação II).....	99
Figura 59 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação III).....	99
Figura 60 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação IV)	99
Figura 61 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação V).....	100
Figura 62 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação VI)	100
Figura 63 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ (Formulação VII)	100
Figura 64 - Curva de polidispersão das NPs/ de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação I).....	101
Figura 65 - Curva de polidispersão das NPs/ de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação II)	101
Figura 66 - Curva de polidispersão NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ da formulação III (estabilidade inicial)	101
Figura 67 - Curva de polidispersão NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ da formulação III (estabilidade após 15 dias)	102
Figura 68 - Curva de polidispersão NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ da formulação III (estabilidade após 38 dias)	102

Figura 69 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação III (estabilidade após 59 dias)	102
Figura 70 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação II liofilizada sem crioprotetor	103
Figura 71 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação V liofilizada com crioprotetor	103
Figura 72 - Curva de polidispersão NPs/[Au(Hdamp)(L ₁ ⁴)]Cl·H ₂ O da formulação I liofilizada com crioprotetor	103
Figura 73 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação I)	104
Figura 74 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação II).....	104
Figura 75 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação III)	104
Figura 76 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação IV)	105
Figura 77 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação V)	105
Figura 78 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação I).....	105
Figura 79 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação II).....	106
Figura 80 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação III)	106
Figura 81 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação IV)	106
Figura 82 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação V)	107
Figura 83 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação VI)	107
Figura 84 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] (Formulação VII).....	107
Figura 85 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[Au(Hdamp)(L ₁ ⁴)]Cl·H ₂ O (Formulação I)	108
Figura 86 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[Au(Hdamp)(L ₁ ⁴)]Cl·H ₂ O (Formulação II)	108
Figura 87 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação III (estabilidade inicial).....	108
Figura 88 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação III (estabilidade após 15 dias).....	109
Figura 89 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação III (estabilidade após 38 dias).....	109
Figura 90 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação III (estabilidade após 59 dias).....	109
Figura 91 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação II liofilizada sem crioprotetor.....	110

Figura 92 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L ₁)] da formulação V liofilizada com crioprotetor	110
Figura 93 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[Au(Hdamp)(L ¹⁴)]Cl·H ₂ O da formulação I liofilizada com crioprotetor	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos contendo metais do bloco d.....	22
Tabela 2 - Valores de concentração inibitória dos compostos contra a forma amastigota do <i>T. cruzi</i>	31
Tabela 3 - Valores de atividade tripanocida ($IC_{50tripomastigota}$ e $IC_{50amastigota}$) em micromolar...32	
Tabela 4 - Valores obtidos em cm^{-1} dos estiramentos e dobramentos das ligações presentes no H_2L1	50
Tabela 5 - Valores obtidos em cm^{-1} dos estiramentos das ligações presentes no complexo de $[AuCl(L_1)]$	51
Tabela 6 - Valores de deslocamento químico (ppm), multiplicidade e integração dos sinais dos hidrogênios presentes no complexo $[AuCl(L_1)]$	53
Tabela 7 - Valores obtidos para as principais bandas de estiramento das ligações presentes no complexo de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ (cm^{-1}).....	53
Tabela 8 - Valores de deslocamento químico (ppm), multiplicidade e integração dos sinais dos hidrogênios presentes no complexo $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$	54
Tabela 9 - Tamanho médio \pm desvio padrão e índice de polidispersividade das NPs/brancas dispersas em água	57
Tabela 10 - Tamanho médio \pm desvio padrão e índice de polidispersividade das nanopartículas de PLGA contendo o complexo $[AuCl(L_1)]$, dispersas em água.....	58
Tabela 11 - Tamanho médio \pm desvio padrão e índice de polidispersividade das nanopartículas de PLGA contendo $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ dispersas em água.	59
Tabela 12 - Valores de potencial Zeta em mV \pm desvio padrão das formulações Nps/brancas	60
Tabela 13 - Quantidade de $[AuCl(L_1)]$ e valores de potencial Zeta \pm desvio padrão para suas respectivas formulações.....	61
Tabela 14 - Quantidade de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ e valores de potencial Zeta \pm desvio padrão para suas respectivas formulações	61
Tabela 15 - Quantidade em mg de $[AuCl(L_1)]$ e EE(%) de suas respectivas formulações	68
Tabela 16 - Quantidade em mg de $[Au(Hdamp)(L_1^4)]Cl \cdot H_2O$ e EE(%) de suas respectivas formulações	68
Tabela 17 - Quantidade em mg e EE(%) estabelecidas por diferentes métodos de ambos os complexos de ouro.....	69

Tabela 18 – Valores de tamanho, PDI e potencial Zeta de formulações contendo [AuCl(L ₁)] sem e com a presença de crioprotetor após o processo de liofilização.....	72
Tabela 19 - Valores de tamanho, PDI e potencial Zeta de formulações contendo [Au(Hdamp)(L ⁴)]Cl·H ₂ O com a presença de crioprotetor após o processo de liofilização ...	73
Tabela 20 – Valores de coeficientes de correlação e constantes cinéticas dos modelos matemáticos aplicados para liberação das NPs/[AuCl(L ₁)] liofilizadas/solução	78

LISTA DE ABREVIATURAS

Bz - Benzonidazol

DMSO - dimetilsulfóxido

EtOH - etanol

FDA - do inglês *Food and Drug Administration*

IC₅₀ - concentração inibitória

IUPAC - do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

NDCBio - Núcleo de Desenvolvimento de Compostos Bioativos

Me - metil

MeCN - acetonitrila

MetOH - metanol

mmol - milimol

Nfx - Nifurtimox

NPs - nanopartículas

Ph - fenil

PLA – do inglês *polylactic acid*

PLGA – do inglês *poly(lactic-co-glycolic acid)*

PVA – do inglês *polyvinyl alcohol*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 QUÍMICA INORGÂNICA MEDICINAL	21
1.2 COMPLEXOS DE OURO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA	22
1.3 COMPLEXOS DE OURO COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA	27
1.4 NANOTECNOLOGIA.....	33
1.5 JUSTIFICATIVA	37
2 OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3 PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1 REAGENTES E SOLVENTES.....	40
3.2 INSTRUMENTOS	40
3.2.1 Ponto de fusão	40
3.2.2 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	40
3.2.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	41
3.2.4 Ressonância magnética nuclear de ¹H	41
3.2.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta	41
3.2.6 Ultrassom.....	42
3.2.7 Rotaevaporador	42
3.2.8 Centrífuga	42
3.2.9 Bomba de vácuo	42
3.2.10 Liofilizador	42
3.2.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
3.3 SÍNTESE DOS COMPOSTOS	43
3.3.1 Preparação do agente complexante (H₂L₁)	43
3.3.2 Preparação do complexo [AuCl(L₁)].....	44

3.3.3	Preparação do complexo [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O	45
3.4	OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO OS COMPLEXOS [AuCl(L ₁)] E [Au(Hdamp)(L1 ⁴)]Cl·H ₂ O.....	46
3.4.1	[AuCl(L₁)].....	46
3.4.2	[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O.....	47
3.5	LIOFILIZAÇÃO	47
3.6	CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO	47
3.6.1	Curvas de calibração de [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O	48
3.6.2	Ensaio de liberação do complexo [AuCl(L₁)] <i>in vitro</i>	48
3.7	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O MEV	48
3.8	ENSAIOS BIOLÓGICOS	49
3.8.1	Ensaio de atividade tripanocida <i>in vivo</i>	49
3.8.2	Parasitemia e Mortalidade.....	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE COMPLEXANTE (H ₂ L ₁)	50
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO [AuCl(L ₁)]	50
4.3	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO [Au(Hdamp)(L1 ⁴)]Cl·H ₂ O.....	53
4.4	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	55
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	57
4.4.1	Tamanho Médio e Índice de Polidispersividade (PDI)	57
4.4.2	Potencial Zeta.....	59
4.4.3	Construção das curvas de calibração	62
4.4.4	Determinação EE% (método indireto).....	67
4.4.5	Determinação EE% (método direto)	68
4.4.6	Estabilidade.....	69
4.4.7	Liofilização	71
4.4.8	Espectroscopia na região do infravermelho.....	73

4.4.9 Liberação <i>in vitro</i> e aplicação de modelos matemáticos.....	76
4.4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
4.5 ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VIVO</i>	83
5 CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS	87
APÊNDICE A – ESPECTROS DE IV.....	95
APÊNDICE B - CURVAS DE POLIDISPERSÃO	97
APÊNDICE C – MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUÍMICA INORGÂNICA MEDICINAL

A química inorgânica medicinal pode ser definida como o campo de conhecimento que se preocupa com íons metálicos no corpo humano. Inclui a farmacopéia de agentes terapêuticos e de diagnósticos baseados em metais e também na compreensão do metabolismo e modos de ação destes (BARRIOS; COHEN; LIM, 2013; MJOS; ORVIG, 2014). Os desafios encontrados por cientistas atuantes nesta área do conhecimento envolvem tanto o desenvolvimento de agentes terapêuticos quanto avaliar o papel dos metais no(s) alvo(s) biológico(s) (BARRIOS; COHEN; LIM, 2013).

Metais e/ou íons metálicos do bloco *d* desempenham funções biológicas de extrema importância, destacando-se na composição estrutural das metaloproteínas. As metaloproteínas são proteínas que contêm em sua estrutura química um ou mais íons metálicos, as quais são responsáveis por atuarem em processos biológicos ocorrentes no organismo como transferência de elétrons e transporte de oxigênio. A metaloproteína mais conhecida é a hemoglobina, sendo esta composta pelo íon metálico Fe^{3+} . Esta é responsável pela realização do transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos (LIPPARD, 1994; MARENGO-ROWE, 2006). Alguns metais são essenciais para a vida humana, dentre eles estão o ferro, zinco e o cobre, sendo que a falta dos mesmos no organismo acarreta em doenças como anemia, retardo de crescimento e doenças ligadas ao coração (LIPPARD, 1994).

No decorrer dos anos, vários fármacos foram aprovados e disponibilizados no mercado com a função de serem agentes terapêuticos para diversos tipos de doenças. Vale ressaltar que muitos deles apresentam metais do bloco *d* em suas composições. A Tabela 1 exemplifica alguns desses fármacos, assim como os metais presentes em suas composições e a finalidade dos mesmos.

Os compostos de coordenação podem ser definidos como a combinação de centros metálicos com moléculas orgânicas denominadas ligantes. Seu desenvolvimento é uma estratégia interessante na busca de novos fármacos, pois há a possibilidade de um efeito sinérgico, ou seja, uma ação cooperativa entre os componentes do complexo (metal e ligante(s)) sobre o(s) alvo(s) biológico(s) de interesse (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007; DIAS et al., 2009). Uma classe de compostos de coordenação que merece destaque no desenvolvimento de agentes terapêuticos são os complexos contendo os centros metálicos Au^{I} e Au^{III} como destacado a seguir.

Tabela 1 - Fármacos contendo metais do bloco *d*

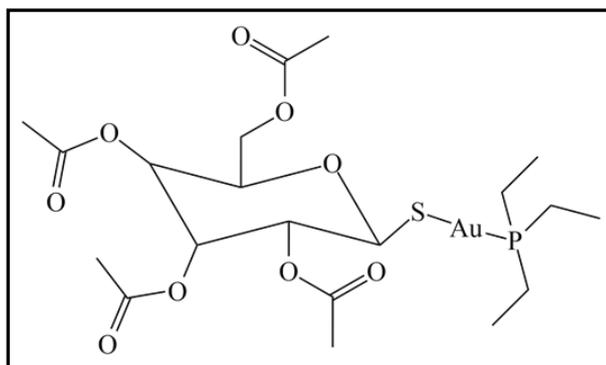
Fármacos disponíveis no mercado		
Nome comercial	Metais em sua composição	Utilizado como
Auranofina	Au	anti-inflamatório
Aziprata	Ag	Antibacteriano
Caltrate	Zn, Cu, Mn	Antiosteoporótico
Cisplatina	Pt	Antitumoral
Fauldcarbo	Pt	Antitumoral
Fersil	Fe	Antianêmico
Nitroprus	Fe	anti-hipertensivo
Unizinco	Zn	suplemento alimentar
Vitafer	Fe	suplemento alimentar
Vitergan	Fe, Cu, Mn, Zn	Estimulante
Zineryt	Zn	anti-acne

Fonte: Anvisa, 2018

1.2 COMPLEXOS DE OURO COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

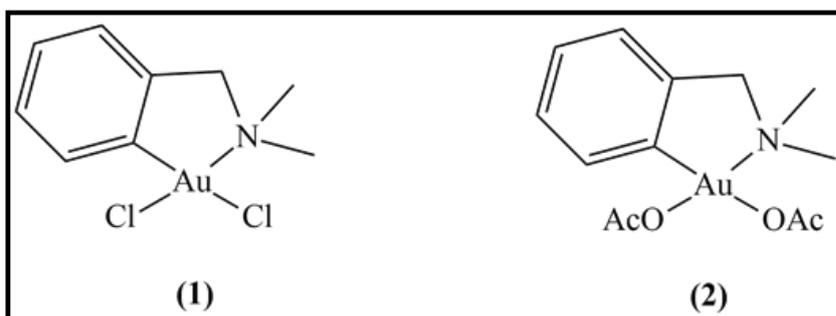
A utilização do ouro na medicina ganhou notoriedade no ano de 1890 devido a descoberta feita pelo cientista alemão Robert Koch da atividade antibacteriana do complexo diacianoaurato(I), $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, contra a bactéria causadora da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*. Com isso, compostos de ouro foram utilizados no tratamento da tuberculose até meados de 1920 (NAVARRO, 2009; MAIA; DEFLON; ABRAM, 2014).

Outro marco importante da terapia do ouro ocorreu com a introdução da Auranofina na década de 1980. O (2,3,4,6, tetra-O-acetil-1-tiol- β -D-glucopiranosato)(trietilfosfina)ouro(I) (Figura 1) é uma molécula com atividade anti-inflamatória relevante e atua como o princípio ativo utilizado no tratamento da artrite reumatoide (NAVARRO, 2009; BERNERS-PRICE; FILIPOVSKA, 2011; MAIA; DEFLON; ABRAM, 2014).

Figura 1 - Estrutura química da Auranofina

Fonte: Illari et al., 2011

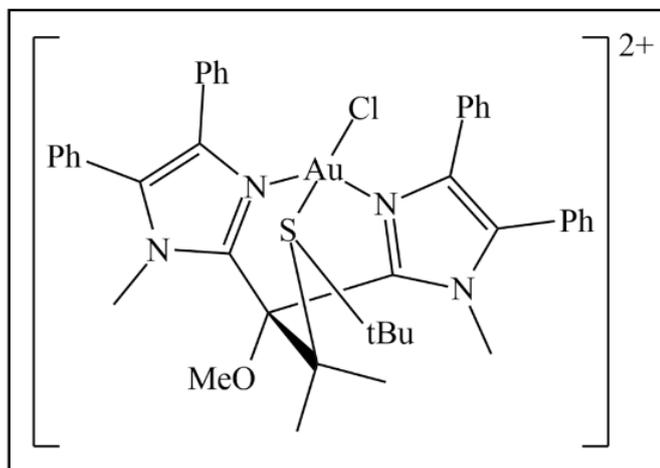
A maioria dos complexos de ouro sintetizados apresentam o ouro no estado de oxidação 1+, como os apresentados anteriormente. Entretanto, alguns complexos de Au^{III} já foram desenvolvidos visando atividade antibacteriana. Os compostos apresentados na Figura 2, [AuCl₂(damp)] (1) e [Au(OAc)₂(damp)] (2), por exemplo, foram ativos contra as bactérias das espécies *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* com concentração de inibição de crescimento para ambas as bactérias de 2,5 µg / mL para (1) e 1,0 µg / mL para (2) (FRICKER, 1996).

Figura 2 - Estrutura química dos compostos [AuCl₂(damp)] (1) e [Au(OAc)₂(damp)] (2)

Adaptado de: Fricker, 1996

Outro complexo de Au^{III} que apresentou um perfil de atividade antibacteriana relevante foi o derivado do ligante tripodal tioéster de bis(imidazol), sendo sua estrutura química representada na Figura 3. Este complexo foi ativo contra as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* sendo estas responsáveis por intoxicação alimentar, infecções simples como furúnculos e infecções mais graves como a pneumonia, respectivamente (NAKAJIMA, 2003).

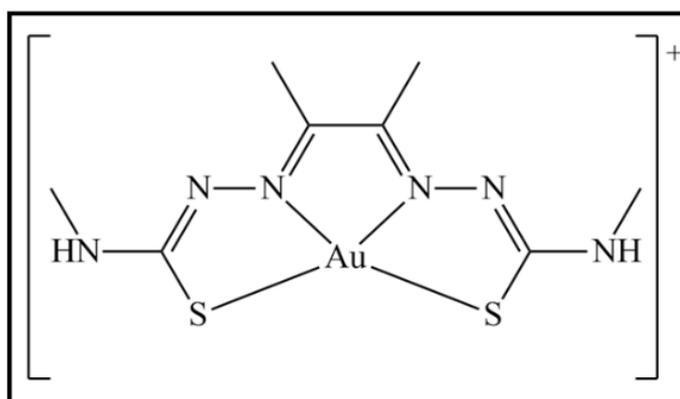
Figura 3 - Estrutura química do complexo de Au^{III} derivado do ligante tioéster de bis(imidazol) tripodal



Adaptado de: Nakajima, 2003

Complexos de Au^{III} vêm sendo estudados também como antivirais, mais especificamente como anti-HIV. Um destes compostos que merece destaque é o representado na Figura 4, o qual é obtido a partir de uma bis(tiossemicarbazona). A atividade do complexo em questão é promissora devido à alta inibição (98 %) da infecção viral em células contaminadas, com concentração inibitória (IC₅₀) de $6,8 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Vale salientar que os autores do trabalho comprovaram a inatividade do ligante, reforçando assim a importância da coordenação com Au^{III} (FONTEH; KETER; MEYER, 2011).

Figura 4 - Estrutura química do complexo de Au^{III} derivado do bis(tiossemicarbazonato)



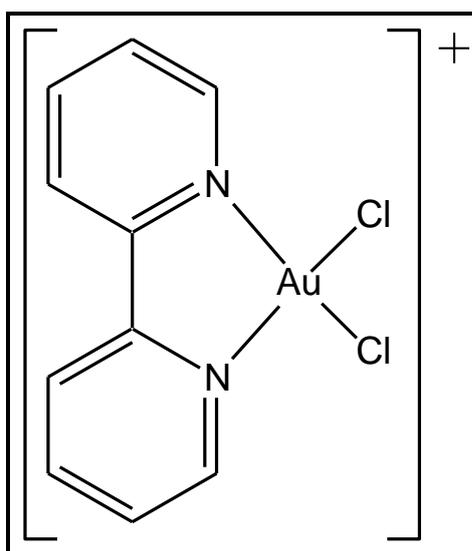
Adaptado de: Fonteh; Keter; Meyer, 2011

Um perfil de atividade biológica comum para os complexos de Au^{III} é a antitumoral (MAIA; DEFLON; ABRAM, 2014). Vários complexos contendo este centro metálico foram

desenvolvidos visando alguma alternativa no combate ao câncer. O ouro no estado de oxidação 3+ é um íon interessante a ser utilizado no desenvolvimento de complexos como agentes antitumorais, pois o mesmo é isoeletrônico à Pt^{II} , centro presente na cisplatina (*cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), fármaco amplamente utilizado no tratamento do câncer), além de formar complexos isoestruturais (geometria quadrado planar) (MAIA; DEFLON; ABRAM, 2014; BERTRAND; CASINI, 2014). Porém, é de conhecimento geral que os complexos de Au^{III} possuem mecanismo de ação diferente da cisplatina, ou seja, compostos de coordenação contendo este centro metálico possuem alvo diferente do DNA, tornando-os assim promissores na utilização em tumores resistentes à cisplatina (NOBILI et al., 2009).

Uma vantagem apresentada pelo Au^{III} na formação de complexos é a sua versatilidade em se ligar tanto com bases duras quanto com macias (RETTONDIN et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017). O uso de ligantes quelantes para realização da complexação com este íon é importante para estabilização do estado de oxidação, sendo esta estratégia utilizada para obtenção de compostos de Au^{III} promissores para o tratamento do câncer. O complexo de Au^{III} apresentado na Figura 5 mostrou ser mais eficaz que a cisplatina, ocasionando em 61 % de inibição das células cancerígenas por apoptose contra 55 % da cisplatina (ARSENIJEVIC et al., 2012).

Figura 5 - Estrutura química do complexo $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]$

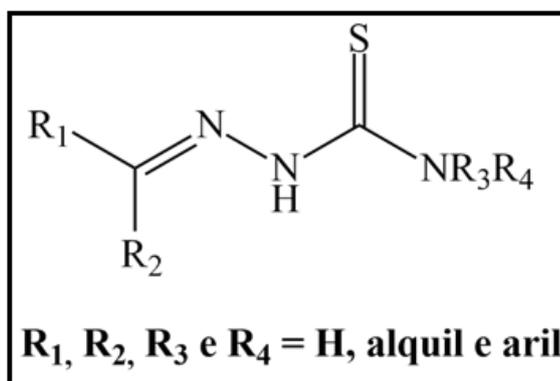


Adaptado de: Arsenijevic et al., 2012

Uma classe de ligantes que merece destaque no desenvolvimento de compostos de coordenação bioativos são as tiossemicarbazonas (TSCs). As TSCs (Figura 6) representam uma

classe de moléculas que são obtidas, geralmente, através da reação de condensação entre tiossemicarbazidas com aldeídos e ou cetonas (TENÓRIO et al., 2005). São moléculas de grande interesse por apresentar uma síntese de fácil acesso e, principalmente, por apresentar diversas aplicações biológicas, como antivirais, antibacterianas, antitumorais e antiparasitárias (TENÓRIO et al., 2005; FONTEH; KETER; MEYER, 2011; MAIA et al., 2013; OLVEIRA et al., 2014). Outra característica relevante das TSCs é de atuar como agentes coordenantes quelantes, através das ligações do metal com os átomos de enxofre e nitrogênio, bem como com outros átomos a depender dos substituintes da molécula, formando complexos estáveis (FONTEH; KETER; MEYER, 2011; MAIA et al., 2013; OLVEIRA et al., 2014).

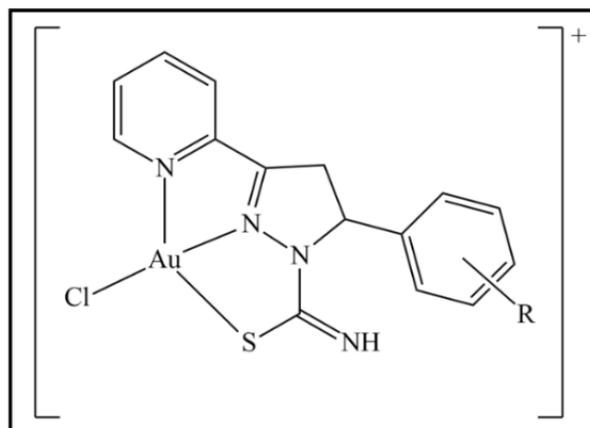
Figura 6 - Estrutura química das tiossemicarbazonas (TSCs)



Adaptado de: Tenório et al., 2005

O composto apresentado na Figura 7 é um exemplo de complexo de Au^{III} obtido com uma tiossemicarbazona. Este complexo se mostrou eficaz contra o tumor glioma, presente em células do sistema nervoso em linhagens de células U-87 e T-98, sendo mais ativo do que a cisplatina e outros complexos com centros de Pt^{II} e Pt^{IV} obtidos com o mesmo ligante, a N(4)-toluil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona (FERRAZ et al., 2013)

Figura 7 - Estrutura química do complexo de Au^{III} obtido com o ligante N(4)-tolil-2-acetilpiridina tiossemicarbazona



Adaptado de: Ferraz et al., 2013

Vale salientar que o metabolismo de células tumorais e dos parasitas das classes *Leishmania* e *Trypanosoma* são semelhantes principalmente devido ao alto consumo de glicose, portanto, complexos que apresentam um perfil de atividade antitumoral são recomendados a serem testados contra doenças parasitárias (NAVARRO et al., 2010; TAHGHIGHI, 2014; SIMONE, 2017). Baseado neste fato, no próximo tópico são apresentados alguns complexos de ouro com atividade antiparasitária.

1.3 COMPLEXOS DE OURO COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Enfermidades parasitárias como a leishmaniose, malária, doença do sono, dengue, esquistossomose, doença de Chagas são consideradas como doenças negligenciadas e são responsáveis por milhões de mortes todos os anos (WHO, 2018). Doenças negligenciadas são aquelas causadas em sua grande maioria por parasitas e encontradas de forma endêmica em países de em desenvolvimento (VALVERDE, 2013; WHO, 2018).

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, conhecida também como Tripanossomíase americana. É uma patologia parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Os dados mais recentes mostram que há 10000 mortes em decorrência de complicações relacionadas a doença de Chagas, sendo que 7000 dos casos ocorrem apenas na região latino-americana. Os números são alarmantes pois estima-se que 70 milhões de pessoas estão em condição de risco e podem contrair a doença (WHO, 2018; DNDI, 2018).

Dentre as formas de se contrair o *T. cruzi* destacam-se a ingestão de alimentos contaminados com o protozoário, o transplante de órgãos infectados, a transfusão de sangue de mãe portadora do *T. cruzi* para o filho, e por meio de fezes de insetos vetores contendo o parasita, sendo esta a principal forma de transmissão (DNDI, 2018).

Os insetos vetores, conhecidos como barbeiros no Brasil (Figura 8), são classificados como hematófagos, por se alimentarem de sangue, e pertencentes a subfamília Triatominae. Em estudos realizados no ano de 2014, cientistas brasileiros catalogaram mais de 60 espécies de triatomíneos existentes no país. O barbeiro pode ser encontrado em regiões rurais, embaixo de cascas de árvores e, principalmente, em regiões onde existem casas feitas de madeira e barro (pau a pique) (PETHERICK, 2010; JURBERG et al., 2014).

Figura 8 - Inseto transmissor da doença de Chagas, espécie *Triatoma tibiamaculata*



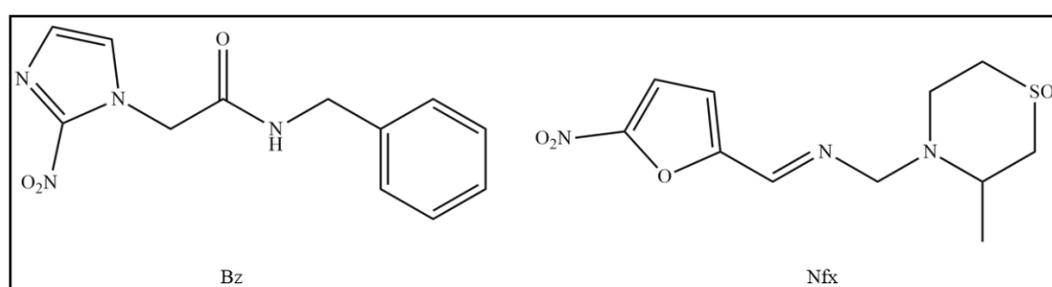
Fonte: Jurberg et al., 2014

Após a contaminação com o *T. cruzi* a doença de Chagas apresenta basicamente duas fases, a aguda e a crônica. A fase aguda está relacionada a forma tripomastigota do parasita, ou seja, onde há locomoção do mesmo na corrente sanguínea do hospedeiro (CHAPADEIRO, 1999; PETHERICK, 2010; CLAYTON, 2010). Esta fase da doença é considerada assintomática dificultando assim o diagnóstico. Apesar de não ser comum, há relatos em pequena escala do surgimento de alguns sintomas como dor abdominal, dificuldade de respiração, febre, dor de cabeça, inchaço do tórax, etc. Transcorrida a fase aguda da doença o indivíduo evolui para a fase crônica, sendo esta relacionada a forma amastigota do parasita, isto é, a forma intracelular (CHAPADEIRO, 1999; PETHERICK, 2010; CLAYTON, 2010; DNDI, 2018). Em muitos casos os pacientes manifestam sintomas anos após a infecção, dentre eles danos relacionados

ao coração, esôfago, intestino e sistema nervoso, muitas das vezes tendo como consequência o óbito (CHAPADEIRO, 1999; PETHERICK, 2010; CLAYTON, 2010).

Atualmente a quimioterapia da doença de Chagas se restringe a dois fármacos disponíveis no mercado, o Benzonidazol (Bz) e o Nifurtimox (Nfx), cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 9. Os dois princípios ativos mencionados são derivados nitroheterocíclicos, sendo estes considerados antigos e pouco eficazes no combate ao *T. cruzi* (WHO, 2018; DNDI, 2018).

Figura 9 - Estrutura química do Benzonidazol (Bz) e Nifurtimox (Nfx)



Fonte: Castro et al., 2017

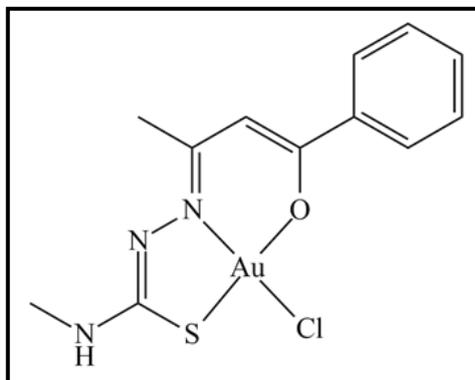
Os dois fármacos mencionados possuem uma eficácia de aproximadamente 80 % para a fase aguda e são ineficazes frente a fase crônica da doença de Chagas. Tanto o Nfx quanto o Bz apresentam alta toxicidade e baixa seletividade, gerando assim efeitos colaterais para os pacientes, como vômitos, náuseas, perda de peso, febre, alergias na pele, dores de cabeça, dores abdominais e fadiga (COURA; CASTRO, 2002; BUCKNER; URBINA, 2012; CASTRO; SOEIRO, 2017; WHO, 2018; DNDI, 2018). No Brasil somente o Bz é utilizado nos tratamentos. Em casos mais específicos como de ineficácia ou intolerância com o tratamento utilizando-se o Bz, o Nfx passar a ser uma alternativa de medicação (BRASIL, 2017). Outra problemática relacionada a quimioterapia da doença de Chagas é o longo tempo de duração do tratamento, podendo durar de 60 a 90 dias. Devido aos efeitos colaterais, ou por uma melhora parcial dos sintomas da doença, uma grande quantidade de pacientes abandona o tratamento podendo assim gerar a resistência dos parasitas frente a estes dois fármacos (DNDI, 2018).

O desenvolvimento de novos fármacos eficazes e não tóxicos nos dois estágios da doença é uma ação necessária. Este desafio se torna ainda maior devido ao desinteresse de financiamento de novas pesquisas por parte das empresas farmacêuticas visto que se trata de uma doença negligenciada, mesmo frente ao grande esforço de instituições públicas e não governamentais para reverter tal quadro (DNDI, 2018). Diante do exposto acima, os complexos

de Au^{III} derivados de tiossemicarbazonas surgem como uma classe de compostos alternativa no tratamento da doença de Chagas.

Compostos ativos contra o *Trypanosoma cruzi* geralmente possuem mecanismos de inibição enzimática, sendo o principal alvo a cruzaina. A cruzaina é uma cisteína protease que é essencial para o ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo ela responsável pelo crescimento, desenvolvimento, nutrição e pela sobrevivência do parasita no hospedeiro (DIAS et al., 2009). Visando obter compostos de coordenação com atividade tripanocida, Rettondin e colaboradores (2016) sintetizaram complexos de Au^{III} derivados de tiossemicarbazonas NOS-tridentadas, destacando-se [AuCl(L^{Me})] apresentado na Figura 10. Em testes realizados *in vitro* frente a forma amastigota do parasita o complexo em questão apresentou valor de IC₅₀ de 11,61 µM, enquanto que o fármaco padrão utilizado no tratamento da doença de Chagas (Benzonidazol) apresentou uma concentração inibitória de 17,00 µM. Diante destes resultados, foi possível observar que este complexo é um candidato para o tratamento da doença na fase crônica (RETTONDIN et al., 2016).

Figura 10 - Estrutura química do complexo [AuCl(L^{Me})]

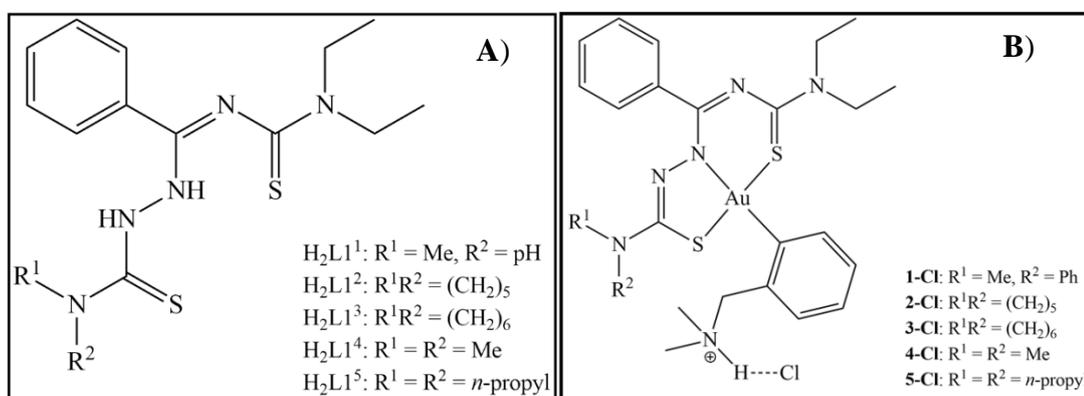


Fonte: adaptado Rettondin et al., 2016

Uma estratégia relevante utilizada no desenvolvimento de compostos antiparasitários é a hibridação molecular. A hibridação molecular consiste em combinar estruturas parciais de compostos bioativos diferentes em uma única molécula, originando-se uma estrutura que pode atuar no mesmo ou em diferentes alvos biológicos (BARREIRO; FRAGA, 2008). Seguindo esta estratégia, Maia e colaboradores (MAIA et al., 2017) combinaram unidades farmacofóricas de tiossemicarbazidas com uma tiouréia, resultando em uma série de tiossemicarbazonas (Figura 11A). A partir desta série de ligantes, foram realizadas reações de complexação com o centro metálico Au^{III} (Figura 11B) visando obter complexos com atividade tripanocida, mais

especificamente contra o *Trypanosoma cruzi*. Esta série de complexos foi avaliada contra a forma amastigota do *T. cruzi*, obtendo-se para alguns dos compostos valores de IC₅₀ melhores que o do Bz, destacando-se o complexo **4-Cl**, [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O. É possível observar pelos valores de concentração inibitória apresentados na Tabela 2 a importância da coordenação com Au^{III}, verificando-se um aumento da atividade comparada com a apresentada pelo ligante livre (MAIA et al., 2017). Vale salientar que os complexos de Au^{III} obtidos pelos autores são organometálicos, ou seja, os compostos de coordenação possuem ligação metal-carbono.

Figura 11 - Estrutura química ligantes híbridos obtidos pela combinação de uma tiossemicarbazida com uma tiouréia obtidas (A) e seus derivados organometálicos de Au^{III} (B)



Adaptado de: Maia et al., 2017

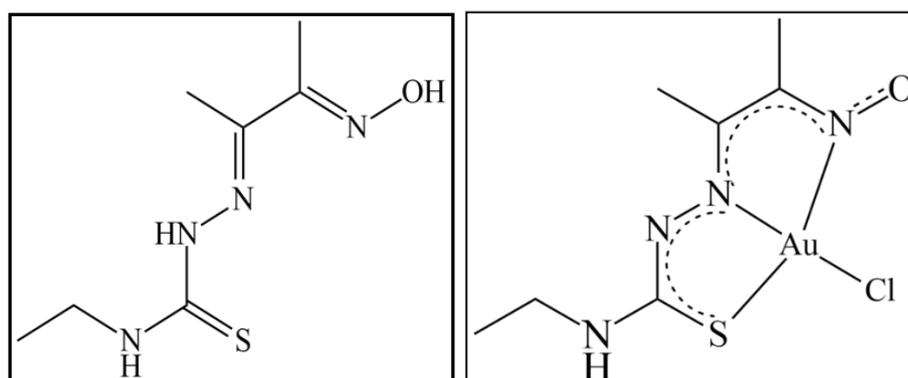
Tabela 2 - Valores de concentração inibitória dos compostos contra a forma amastigota do *T. cruzi*.

Composto	IC ₅₀ (μM)
H_2L1^1	9,93 ± 0,50
H_2L1^3	22,57 ± 1,10
H_2L1^4	42,89 ± 2,27
H_2L1^5	13,81 ± 1,97
1-Cl	5,02 ± 0,61
2-Cl	12,61 ± 2,11
3-Cl	22,92 ± 2,02
4-Cl	3,68 ± 0,09
5-Cl	17,00 ± 0,77
Benzonidazol	4,50 ± 0,42

Adaptado de: Maia et al., 2017

A hibridização molecular também foi adotada por Gonçalves e colaboradores (2017) de modo a combinar unidades farmacofóricas da 4-etil-3-tiossemicarbazida com a diacetilmonoxima obtendo-se o ligante H₂L₁ (Figura 12A). Após a obtenção do ligante foi realizado uma reação de complexação com Au^{III}, gerando o [AuCl(L₁)] (Figura 12B). Diante dos resultados obtidos em ensaios de avaliação tripanocida *in vitro* apresentados na Tabela 3, pode-se afirmar que [AuCl(L₁)] é mais ativo que o Bz nas formas extra e intracelular do parasita. Vale ressaltar novamente a importância da coordenação do ligante com o centro metálico Au^{III}, resultando em complexo mais ativo que o ligante livre e o seu precursor metálico (Na[AuCl₄]-2H₂O) (GONÇALVES et al., 2017). Além disso, em estudos realizados visando a elucidação do mecanismo de ação do [AuCl(L₁)], foi verificado através de ensaios com a enzima Old Yellow do *T. cruzi* (TcOYE), uma afinidade de média à alta do complexo com a enzima em questão, atuando como substrato para TcOYE (GONÇALVES et al., 2017).

Figura 12 - Estrutura química do ligante H₂L₁ (A) e do seu complexo [AuCl(L₁)] (B)



Adaptado de: Gonçalves et al., 2017

Tabela 3 - Valores de atividade tripanocida (IC₅₀tripomastigota e IC₅₀amastigota) em micromolar.

Composto	IC ₅₀ tripomastigota (μM)	IC ₅₀ amastigota (μM)
Na[AuCl ₄]-2H ₂ O	169,1 ± 11,3	-
H ₂ L ₁	69,8 ± 11,2	176,8 ± 15,1
[AuCl(L ₁)]	5,7 ± 2,1	8,3 ± 3,7
Benzonidazol	7,3 ± 2,8	13,0 ± 2,0

Adaptado de: Gonçalves et al., 2017

Diante de uma quimioterapia antiga e ineficaz nos dois estágios da doença de Chagas, cada vez mais se faz necessário o seu desenvolvimento de novos compostos ativos contra o *T.*

cruzi. Complexos de Au^{III} surgem como alternativa para o tratamento, sendo alguns mais ativos que o fármaco padrão utilizado. Porém, para que um composto esteja disponível para a população há muito a ser feito. Nesse cenário a nanotecnologia aparece como forma de aprimoramento dos compostos bioativos.

1.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área da ciência que envolve o trabalho da matéria em uma escala referente a um bilionésimo do metro (ordem de grandeza de aproximadamente 10^{-9} m). É uma ciência considerada multidisciplinar por englobar diferentes áreas do conhecimento tais como: a informática, eletrônica, química, física, biologia, farmácia, dentre outras. A nanotecnologia atua diretamente no desenvolvimento de sistemas e dispositivos, destacando-se as nanopartículas, onde o aumento da área superficial devido a escala de trabalho modifica de modo a melhorar as propriedades dos materiais envolvidos (POOLE; OWENS, 2003).

O termo nanotecnologia foi criado pelo professor japonês Norio Taniguchi no ano de 1974, porém, considera-se como marco inicial desta área o ano de 1959, onde o físico e ganhador do prêmio Nobel Richard Feynman proferiu um discurso na Sociedade Americana de Física abordando sobre as possibilidades e vantagens de materiais em nanoescala. Dentre vários sistemas em escala nanométrica obtidos, um que merece destaque são as nanopartículas.

As nanopartículas aplicadas na área farmacêutica visam aprimorar a ação farmacológica da molécula ou do composto bioativo, de modo a atingir a redução de dosagem, proteção do princípio ativo, diminuição de toxicidade, prolongação de liberação no organismo e aumento da seletividade dos fármacos (FARAJI; WIPF, 2009). A nanotecnologia é utilizada para o encapsulamento de compostos bioativos sendo que este processo pode ser feito em matrizes como lipossomas, lipídeos, ciclodextrinas, polímeros naturais como a quitosana e polímeros sintéticos (PLA, alginato de sódio, PLGA, entre outros) (GUPTA; KOMPELLA, 2006; CRUZ et al., 2007).

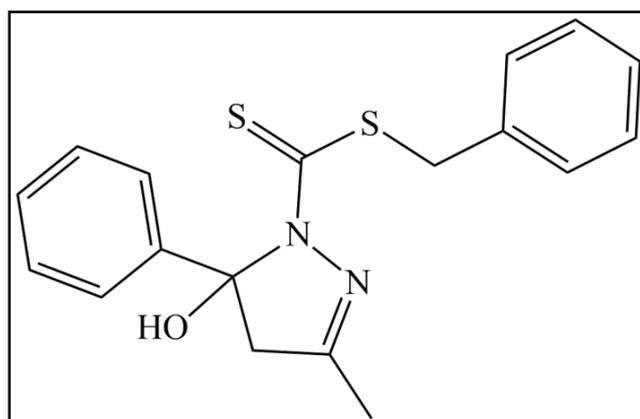
Seguindo a estratégia de encapsulamento de moléculas bioativas, Dhule e colaboradores (2011) produziram um sistema nanoparticulado utilizando as matrizes de γ -ciclodextrina e lipossoma contendo curcumina como princípio ativo. A curcumina é uma molécula utilizada como pigmento sendo ela extraída da planta popularmente conhecida como açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*), e que apresenta atividades biológicas relevantes, dentre elas a anticancerígena, mais específica para o osteossarcoma, um raro tipo de câncer que afeta ossos longos do corpo humano. No trabalho realizado por Duhle e colaboradores (2011), os autores

desenvolveram um sistema onde “aprisionaram” em uma proporção de 1:2 curcumina / γ -ciclodextrina para posteriormente encapsular este “complexo” em uma matriz de lipossoma, sendo posteriormente feito um comparativo de atividade da curcumina livre, da curcumina encapsulada em lipossoma (CL) e do sistema mencionado (γ CD-curcumina). Os resultados obtidos mostraram que as formulações de CL obtiveram um tamanho médio de aproximadamente de 104,7 nm, onde apresentaram um IC₅₀ de $5,4 \pm 0,9$, $10,2 \pm 0,8$, $20 \pm 3,5$ $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens de células KHOS (osteossarcoma), MCF-7 (câncer de mama) e fibroblasto de pele (câncer de pele), respectivamente. Já para γ CD-curcumina as formulações apresentaram um tamanho médio próximo a 98,2 nm com IC₅₀ de $6,4 \pm 0,7$, $11,5 \pm 1,1$, $22 \pm 2,1$ $\mu\text{g/mL}$ para as mesmas linhagens de células. Vale ressaltar que os dois sistemas nanoparticulados foram mais eficazes quando se comparados ao tratamento feito por administração da curcumina livre, onde apresentou IC₅₀ maiores ($22,8 \pm 1,9$, $20 \pm 1,8$, 27 ± 5 $\mu\text{g/mL}$), ou seja, foi necessária uma maior concentração de curcumina para inibir 50% do crescimento das células (DUHLE et al., 2011).

Outra molécula interessante é a doxorrubicina, que é um fármaco utilizado na quimioterapia para tratamento de câncer. Suas características físico-químicas, como a sua hidrofiliabilidade, a coloca como um fármaco que pode ser administrado topicamente para tratamento de câncer de pele (TAVEIRA; NOMIZO; LOPEZ, 2009; TAVEIRA et al., 2012). Buscando sistemas nanoparticulados de liberação prolongada de doxorrubicina, Taveira e colaboradores (2014) desenvolveram nanopartículas lipídicas sólidas contendo o fármaco mencionado com tamanhos médios próximos a $175 \pm 25,98$ nm. Combinando este sistema nanoparticulado com a introdução de fármacos nos tecidos por meio de corrente elétrica (iontoforese), os autores observaram que com o tratamento sem aplicação de corrente elétrica liberou aproximadamente 2,85 % do fármaco em seis horas, já com a iontoforese ($0,5 \text{ mA/cm}^2$) liberou-se quase 8 % em um mesmo intervalo de tempo. Outro dado relevante foi o de penetração do fármaco na pele, para o qual os autores obtiveram uma penetração em um período de seis horas de $515,1 \pm 49,8$ e $3250,4 \pm 190,2 \text{ ng/cm}^2$ por passividade e com aplicação de iontoforese, respectivamente. Vale salientar que não somente o aumento da área superficial é relevante, pois, conforme apresentado, a combinação de outra técnica foi de extrema importância para a penetração e, por consequência, para a ação do fármaco (TAVEIRA et al., 2014). Vale destacar que há disponível no mercado uma formulação de doxorrubicina encapsulada em lipossoma denominada de Doxil, formulação esta desenvolvida pelos Laboratórios Johnson & Johnson e Ben Venue utilizada em pacientes com sarcoma de Kaposi, câncer de mama, câncer de ovário e outros tumores sólidos.

A nanotecnologia está presente no desenvolvimento de tratamento de doenças negligenciadas, e a doença de Chagas não é uma exceção. Visando aprimorar a atividade tripanocida da molécula pertencente a classe dos ditiocarbazatos (H₂bdtc) representada na Figura 13, Carneiro e colaboradores (2014) obtiveram nanopartículas lípidas sólidas com o princípio ativo mencionado através da técnica de microemulsão. O tamanho médio das partículas da formulação ficou próximo a 127,4 nm e foram administradas de forma oral em animais contaminados com o *T. cruzi* com a finalidade de avaliar a atividade tripanocida e estabelecer um comparativo com o H₂bdtc administrado de forma livre. Os resultados *in vivo* mostraram que em uma concentração de 4 µmol/Kg por dia o sistema nanoparticulado contendo o princípio ativo foi mais eficaz na redução da parasitemia, apresentando um valor de 70 % contra 48 % do Benzonidazol (controle positivo) e 15 % do H₂bdtc livre. Outro dado relevante obtido pelos autores é de que com administração das nanopartículas lipídicas sólidas contendo H₂bdtc houve uma sobrevida de 100 % dos animais, porcentagem muito próxima de quando o tratamento é feito com o Bz em doses clínicas (400 µmol/Kg por dia) (CARNEIRO et al., 2014).

Figura 13 - Estrutura química da molécula H₂bdtc.

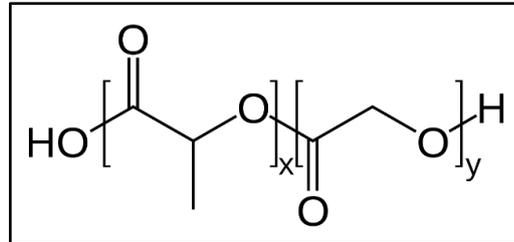


Adaptado de: Maia et al., 2010

As matrizes poliméricas sintéticas têm se destacado no processo de encapsulamento de compostos bioativos (POOLE; OWENS, 2003; GUPTA; KOMPELLA, 2006; CRUZ et al., 2007). A utilização de polímeros sintéticos para o encapsulamento de moléculas bioativas acontecem com mais frequência devido a dois aspectos relacionados aos mesmos, que são: elevado nível de pureza e elevada reprodutibilidade em relação a quitosana (ANDERSON; SHIVE, 1997). O poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), também conhecido como PLGA e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (MANCHANDA et al., 2010; SWARNAKAR et al., 2011) é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica na liberação

controlada de moléculas bioativas. O PLGA é um polímero poliéster formado por duas unidades monoméricas, o ácido lático e ácido glicólico como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Estrutura química do PLGA



Fonte: Do autor, 2019

Apesar do PLGA ser uma matriz promissora para liberação de moléculas bioativas, este polímero ainda não foi utilizado para o desenvolvimento de um tratamento alternativo para a doença de Chagas. Um dos trabalhos pioneiros de encapsulamento de moléculas antichagásicas em matriz polimérica foi reportado por Gonzalez-Martin e colaboradores (1998). Em busca de potencializar a atividade do Nifurtimox (Nfx), os autores desenvolveram nanopartículas de polialquicianoacrilato contendo deste fármaco usado no combate da doença de Chagas. Através da técnica de polimerização em emulsão foram obtidas partículas com tamanhos menores que 200 nm. Em baixas concentrações ($< 2 \mu\text{g/mL}$) as nanopartículas contendo Nfx inibiram aproximadamente 100 % das formas epimastigotas, enquanto que o Nfx administrado de forma livre inibiu cerca de 50 % (GONZALEZ-MARTIN et al., 1998).

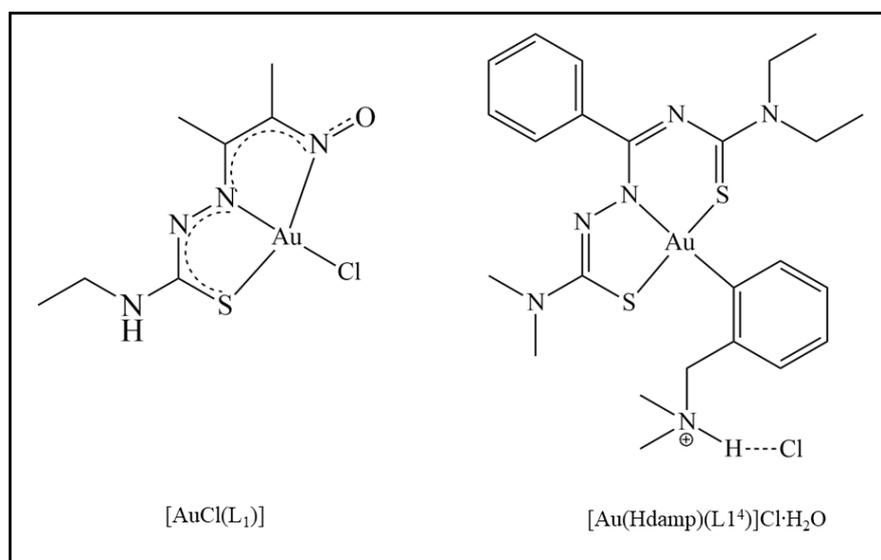
Diante do exposto, a nanotecnologia aparece nos últimos anos como uma potencial forma de aprimoramento de compostos bioativos, uma vez que pode se direcionar e controlar a liberação de fármacos sendo este o tema do presente trabalho.

1.5 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos envolvendo o potencial uso medicinal das tiossemicarbazonas vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa, NDCBio. Os complexos de Au^{III} derivados de tiossemicarbazonas merecem destaque por possuírem um perfil de atividade antiparasitária interessante, sendo alguns candidatos a fármacos no tratamento da doença de Chagas já descritos em trabalhos publicados pelo grupo (RETTONDIN et al., 2016; MAIA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2017).

Dois complexos de ouro apresentaram um potencial ainda maior, o [AuCl(L₁)] e o complexo organometálico [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O (Figura 15). Ambos foram obtidos pela complexação do centro Au^{III} com ligantes híbridos. No primeiro caso através da combinação de tiossemicarbazida com a diacetilmonoxima, e no segundo, combinando-se uma tiossemicarbazida com uma tiouréia. Ambos são ativos contra a forma intracelular amastigota do parasita, apresentando índices de seletividade melhores que a do Bz (MAIA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2017).

Figura 15 - Estrutura química dos complexos [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O



Adaptado de: Gonçalves et al., 2017 e Maia et al., 2017

Um fato que deve ser considerado é que, com a utilização de compostos bioativos livres, há a possibilidade de não se estabilizar a concentração na faixa terapêutica, ou seja, os compostos de coordenação podem atuar em concentrações inativas e/ou tóxicas. Neste contexto, a nanotecnologia aparece como uma alternativa para o aprimoramento da

biodisponibilidade de compostos bioativos e prolongamento de liberação dos mesmos (GUPTA; KOMPELLA, 2006; CRUZ et al., 2007; ROSSI-BERGMANN, 2008). Embora nanopartículas contendo compostos bioativos venham sendo desenvolvidas há anos por vários grupos de pesquisa, o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados contendo compostos de coordenação de Au^{III} é inovador.

Diante de resultados promissores para compostos de coordenação de ouro (III) como [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O, este trabalho consistiu em desenvolver sistemas de liberação controlada para estes compostos com a finalidade de serem utilizados como uma alternativa no tratamento da doença de Chagas. Assim, estudos de liberação controlada foram realizados e, posteriormente, a atividade *in vivo* contra o parasita foi avaliada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como meta o encapsulamento de complexos de Au^{III} derivados de tiossemicarbazonas para desenvolver agentes mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar a (*E*)-*N*-etil-2-((*E*)-3-(hidroxiimino)butan-2-ilideno)hidrazinocarbotioamida (agente complexante), assim como os complexos [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O;
- Encapsular os complexos [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O em uma matriz polimérica (PLGA) através da técnica de emulsificação e evaporação de solvente;
- Determinar a eficiência de encapsulamento (EE%) via espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis);
- Caracterizar as nanopartículas dos complexos com o PLGA pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (do inglês, *Dynamic Light Scattering*) e potencial Zeta;
- Realizar ensaio de liberação das nanopartículas de PLGA contendo os compostos [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O *in vitro* utilizando células de difusão vertical, bem como avaliar o perfil de liberação do complexos da matriz polimérica a partir de modelos matemáticos existentes;
- Analisar via microscopia eletrônica de varredura (MEV) as nanopartículas de PLGA contendo [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O quanto a morfologia e tamanho das partículas geradas;
- Aplicar os sistemas nanoparticulados em camundongos infectados com o parasita *Trypanosoma cruzi* visando comparar a atividade tripanocida das nanopartículas em relação aos complexos de Au^{III} livres.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REAGENTES E SOLVENTES

Para síntese dos compostos foram utilizados os solventes álcool etílico absoluto 99,5% (QHEMIS), álcool metílico 99,8% (SYNTH), o ácido acético glacial 99,7% (QHEMIS) como catalisador e os reagentes, diacetilmonoxima 99% (VETEC), 4-etil-3-tiossemicarbazida (SIGMA-ALDRICH), tetracloroaurato(III) de potássio 99,995% (SIGMA-ALDRICH).

Os materiais utilizados para obtenção das nanopartículas foram: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico RESOMER RG 752 H (4 – 15 kDa) (BOEHRINGER INGELHEIN), álcool polivinílico grau de hidrólise 98-99% (SIGMA-ALDRICH) e água ultrapura (sistema MILLI-Q gradiente millipore, resistividade de 18,2 MΩ/cm).

O solvente utilizado para dissolver a mistura física dos complexos de Au^{III}, juntamente com o PLGA, foi diclorometano 99,99% (QHEMIS / NEON).

Para o preparo da solução do meio receptor foram utilizados os reagentes cloreto de sódio 99% (SYNTH), cloreto de potássio 99-105% (SYNTH), fosfato de potássio bibásico anidro 98% (SYNTH), fosfato de sódio monobásico anidro 98 – 102% (SYNTH) e os solvente dimetilsulfóxido (SYNTH), água ultrapura (sistema MILLI-Q gradiente Millipore, resistividade de 18,2 MΩ/cm).

Para realização do ensaio de liberação foram utilizados uma membrana de celulose (FISHERBRAND, 3500 kDa) e células de difusão vertical (células de Franz).

3.2 INSTRUMENTOS

3.2.1 Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos compostos foram determinados pelo fusiômetro PF1500 FARMA-GEHAKA.

3.2.2 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos do [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl foram determinados pelo equipamento UV-1800 Shimadzu em soluções de CH₂Cl₂ e DMSO com intervalo

compreendido na faixa de 800-190 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm. Esta técnica também foi utilizada na confecção das curvas de calibração dos complexos, assim como a determinação da eficiência de encapsulamento dos mesmos.

3.2.3 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos através do espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da Perkin Elmer, na região compreendida entre 4000-220 cm^{-1} . As amostras foram analisadas no estado sólido, com auxílio do acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante. Equipamento este pertencente ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.2.4 Ressonância magnética nuclear de ^1H

A análise de RMN de ^1H foi realizada em um espectrômetro Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla) com operação de campo magnético de 400 MHz. O espectro de RMN foi referenciado em relação ao solvente utilizado, dimetilsulfóxido- d_6 . Equipamento este localizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

3.2.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

O tamanho médio das nanopartículas e o Potencial Zeta foram determinados utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series, modelo NANO-ZS90 de procedência Malvern no Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e de Administração Tópica (NanoTop) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. As leituras foram realizadas utilizando água ultrapura (sistema MILLI-Q gradiente millipore, resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$) como dispersante a uma temperatura de 25 °C, em cubetas de plástico, sendo-a da medida de Potencial Zeta a cubeta Malvern de modelo DTS-1070. Vale ressaltar que para medir os parâmetros mencionados foi realizada uma diluição das amostras, onde foram coletados 20 μL da suspensão das nanopartículas logo após o processo de ressuspensão e adicionados em 1980

μL de água ultrapura, esta solução resultante foi agitada em vortex para homogeneização da mesma para posteriormente serem inseridas nas cubetas.

3.2.6 Ultrassom

Foram utilizados dois modelos de ultrassom no processo de encapsulamento dos complexos de Au^{III} . O ultrassom modelo 03350 de procedência Quimis foi utilizado para dissolver a mistura física dos complexos com o PLGA em diclorometano, já o ultrassom vibra cell de ponteira (3 mm) de procedência Sonics foi utilizado para emulsificar as fases (oleosa e aquosa). Ambos os equipamentos se encontram no Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e de Administração Tópica (NanoTop) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.2.7 Rotaevaporador

O rotaevaporador RV 10 control de procedência Ika acoplado com um banho ultratermostático SL 152/10 de procedência Solab foram utilizados para remoção do solvente diclorometano.

3.2.8 Centrífuga

Para acelerar o processo de decantação das nanopartículas foi utilizado uma ultracentrífuga Heraeus Megafuge 16R de procedência Thermo Scientific a uma velocidade angular de 13000 rpm e temperatura de 4 °C.

3.2.9 Bomba de vácuo

No processo de liofilização foi utilizado uma bomba de vácuo XDS 10 de procedência Edwards.

3.2.10 Liofilizador

Outro equipamento utilizado no processo de liofilização foi o liofilizador K 105 de procedência Liotop.

3.2.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

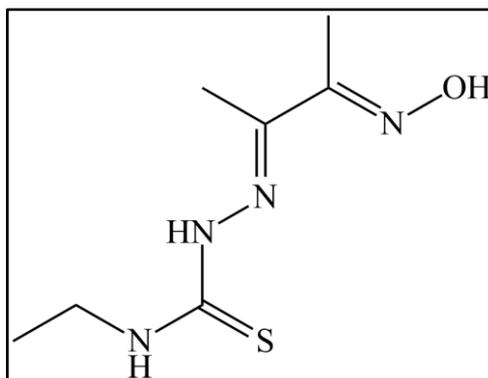
As imagens de alta resolução das nanopartículas desenvolvidas neste trabalho foram obtidas através do microscópio eletrônico de varredura e um detector de microanálise por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), modelo INCA X-ACT standard Oxford, com metalizadora para carbono e ouro de procedência Quorum, modelo QR 150ES, ambos os equipamentos localizados no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.3 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

3.3.1 Preparação do agente complexante (H_2L_1)

Foi preparada uma solução contendo 3 mmol (0,303 g) do reagente diacetilmonoxima dissolvidos em 8 mL de uma mistura de etanol/água (3:5 v/v). À solução anterior, foi adicionada uma quantidade equimolar (0,358 g) de 4-etil-3-tiossemicarbazida dissolvida em 8 mL de álcool etílico. Posteriormente, foi adicionado 3 gotas de ácido acético glacial e a mistura reacional foi mantida em refluxo e agitação constante durante 4 h. Após este tempo, a solução obtida foi mantida à $-15\text{ }^\circ\text{C}$ por 8 h. O sólido obtido foi filtrado, lavado com *n*-hexano e seco sob pressão reduzida. O composto foi recristalizado em etanol.

Figura 16 - Estrutura química do agente complexante (H_2L_1)



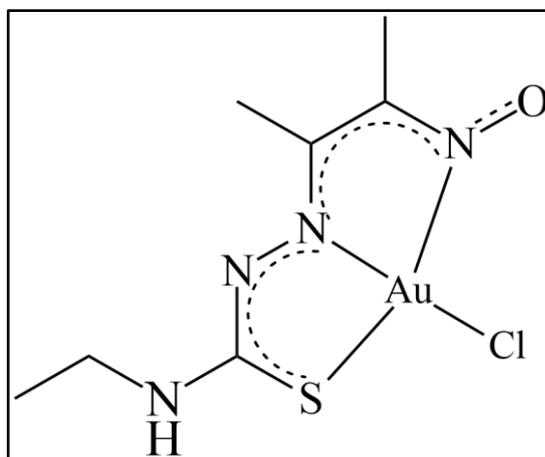
Adaptado de: Gonçalves et al., 2017

Dados para H_2L_1 . Cor: Incolor. Rendimento: 62,5% (0,5107 g). Solúvel em: MetOH, EtOH, DMSO e MeCN. Ponto de Fusão: 203-204 °C. Infravermelho (ATR, cm^{-1}) 3375 $\nu(O-H)$, 3281, 3225 $\nu(N-H)$, 1586 $\nu(C=N)_{tsc}$, 1522 $\nu(C=N)_{ox}$, 1365 $\delta(O-H)$, 1010 $\nu(N-O)$, 804 $\nu(C=S)$.

3.3.2 Preparação do complexo $[AuCl(L_1)]$

Para obtenção do complexo $[AuCl(L_1)]$, foi preparada uma solução contendo 0,304 g (0,8 mmol) do precursor metálico $K[AuCl_4]$ dissolvido em 3 mL de álcool metílico. Posteriormente, foi adicionada uma quantidade equimolar (0,172 g) do ligante (H_2L_1). A solução reacional foi mantida em agitação constante por um período de 3 h à temperatura ambiente. O sólido obtido foi filtrado, lavado com *n*-hexano e seco sob pressão reduzida. O composto foi recristalizado em uma mistura de diclorometano/metanol (3:1 v/v).

Figura 17 - Estrutura química do complexo $[AuCl(L_1)]$



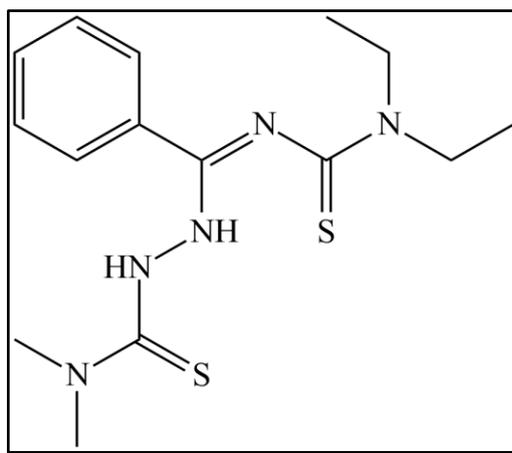
Adaptado de: Gonçalves et al., 2017

Dados para $[AuCl(L_1)]$. Cor: marrom. Rendimento: 58 % (0,202 g). Solúvel em: CH_2Cl_2 e DMSO. Ponto de Fusão: 200-202 °C. Infravermelho (ATR, cm^{-1}) 3206 $\nu(N-H)$, 1569 $\nu(C=N)_{tsc}$, 1514 $\nu(C=N)_{ox}$, 1145 $\nu(N-O)$, 617 $\nu(C-S)$. 1H RMN, 400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm : 8,48 (s, 1H, CH_3CH_2-NH), 2,37 (s, $CH_3C=N-OH$), 1,82 (s, 3H, $CH_3C=N-NH$), 1,13 (t, 3J 7,2 Hz, 3H, CH_2CH_3). UV-Vis, solução de CH_2Cl_2 concentração de 3×10^{-5} mol/L [$\lambda_{m\acute{a}x} / \log \epsilon$ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$): 315,5/4,35. Condutividade molar (1×10^{-3} mol/L, CH_2Cl_2): 0,00 $\mu S \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$.

3.3.3 Preparação do complexo [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O

O ligante H₂L1⁴ utilizado para obtenção do complexo [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O foi previamente preparado e caracterizado pelo grupo de pesquisa NDCbio, sendo sua síntese encontrada no trabalho de Maia e colaboradores (2012). A estrutura química do agente complexante é demonstrada na Figura 18.

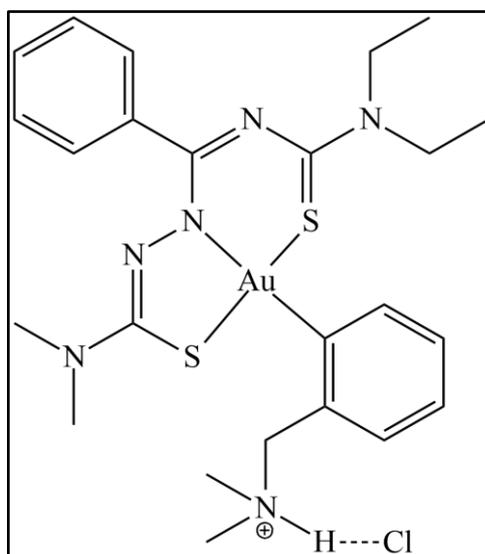
Figura 18 - Estrutura química do ligante H₂L1⁴



Adaptado de: Maia et al., 2017

Para obter o composto de coordenação foi preparada uma solução contendo 0,020 g (0,05 mmol) do precursor metálico [AuCl₂(damp)] dissolvido em 2 mL de acetonitrila (MeCN). Posteriormente, foi adicionada uma quantidade equimolar do ligante de interesse (0,017 g). A solução reacional foi mantida sob agitação por um período de uma hora à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se 2 mL de diclorometano e a solução resultante foi mantida sob evaporação lenta, sendo obtidos cristais laranjas, os quais foram devidamente separados por filtração e secos ao ar (MAIA et al., 2017).

Figura 19 - Estrutura química do complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$



Adaptado de: Maia et al., 2017

Dados para $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$. Cor: laranja. Rendimento: 80% (0,029 g). Solúvel em: CH_2Cl_2 , CHCl_3 e DMSO. Infravermelho (ATR, cm^{-1}) 2973 – 2869 $\nu(\text{C-H})$, 2654 $\nu(\text{N-H})$, 1549 $\nu(\text{C=N})$, 1489, 1445 $\nu(\text{C=C})$. ^1H RMN, 400 MHz, DMSO- d_6 , δ/ppm : 1,15 (t, $J = 8$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2,73 (d, $J = 4$ Hz, 3H, NHCH_3 , Hdamp), 2,77 (d, $J = 4$ Hz, 3H, NHCH_3 , Hdamp), 2,92 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3,56-3,65 (m, 4H, CH_2), 4,38 (dd, $^2J = 13$ Hz, $^3J = 6$ Hz, 1H, CH_2 , Hdamp), 4,40 (dd, $^2J = 13$ Hz, $^3J = 6$ Hz, 1H, CH_2 , Hdamp), 7,17-7,32 (m, 5H, Ph), 7,43 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Hdamp), 7,64-7,68 (m, 2H, Hdamp), 8,06 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Hdamp), 12,40 (s, 1H, NH, Hdamp). UV-vis, solução de CH_2Cl_2 concentração de $5,55 \times 10^{-5}$ mol/L [$\lambda_{\text{máx}} / \log \epsilon$ ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$): 387/4,25. Condutividade molar (1×10^{-3} M, MeCN): $85,0 \mu\text{S cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

3.4 OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA CONTENDO OS COMPLEXOS $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ E $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$

3.4.1 $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$

O procedimento adotado para encapsulação do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em matriz de PLGA foi o de emulsificação e evaporação do solvente, procedimento este descrito e baseado

na literatura (VANDERHOFF; AASSER; UGELSTAD, 1979; REIS et al., 2006). A proporção de princípio ativo e de matriz descrita é de 1:10 massa/massa. Foram realizados dois testes, um com a condição descrita anteriormente e outro com uma massa reduzida de princípio ativo. Foi observado com a diminuição de massa do $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ obteve-se uma melhor eficiência de encapsulamento, sendo assim em um béquer, foram adicionados 0,00450 - 0,00411 g de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e 0,050 g de PLGA. Esta mistura foi dissolvida em 2 mL de CH_2Cl_2 (diclorometano) denominada de fase oleosa e gotejada através de uma micropipeta em uma fase aquosa, composta por uma solução aquosa de 0,5% de álcool polivinílico (PVA). Após esta mistura de fases, a mesma foi sonicada por 10 min com amplitude de 20%. Posteriormente, a emulsão foi rotaevaporada com a finalidade de eliminar o solvente diclorometano.

Em seguida, a emulsão foi centrifugada com uma velocidade angular de 13000 rpm à uma temperatura de 4 °C durante 30 min. Posteriormente, foi feita a separação do sobrenadante do decantado. As nanopartículas decantadas foram ressuspensas com água ultrapura MILLI-Q.

3.4.2 $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$

O procedimento e materiais adotados para encapsulamento do complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ foram os mesmos para $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$. A única diferença entre os dois complexos, foi a utilização da proporção 1:10 massa/massa de princípio ativo e matriz polimérica, uma vez que esta condição atingiu altos valores de eficiência de encapsulamento (EE%).

3.5 LIOFILIZAÇÃO

Para liofilização das formulações desejadas, sejam elas ressuspensas somente em água ou em solução de sacarose (crioprotetor), previamente as mesmas foram congeladas por um período de 10 h à uma temperatura de -80 °C. Após o congelamento da formulação, esta foi inserida no liofilizador sob uma temperatura de -90 °C e pressão reduzida na faixa de 300 – 450 μHg durante 24 h.

3.6 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO E ENSAIO DE LIBERAÇÃO

3.6.1 Curvas de calibração de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$

As curvas de calibração de ambos os complexos foram construídas através da técnica de espectroscopia na região do ultravioleta-visível. Para realização da leitura das absorções foram utilizados os comprimentos de onda de absorção máxima de cada complexo, sendo assim foram preparadas várias soluções em diferentes concentrações utilizando dois solventes, diclorometano e dimetilsulfóxido. As leituras de absorção foram obtidas em concentrações iguais a 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40 μM para $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ sendo que para $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ iguais a 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50 μM . Sendo assim é possível obter uma equação $y = ax + b$, onde y denota a absorbância e x a concentração em μM . Através da equação gerada para cada complexo em diferentes solventes é possível determinar a eficiência de encapsulamento (EE%) pelos métodos indireto e direto.

3.6.2 Ensaio de liberação do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ *in vitro*

As curvas de liberação controladas foram obtidas em triplicata utilizando-se células de difusão vertical. Para isso, utilizou-se uma membrana de celulose para separar a emulsão das NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ do meio receptor (tampão PBS + 5% de dimetilsulfóxido). Trinta e seis alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio receptor em intervalos de tempo de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 132, 144, 156, 168, 180, 192, 216, 240, 264, 288 e 312 h e analisadas via UV-vis. Através da curva de calibração a absorbância foi transformada em porcentagem de massa liberada *versus* tempo (Figura 22).

3.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O MEV

Para obtenção das imagens de alta resolução via MEV, as formulações de ambos os complexos de ouro foram gotejadas (aproximadamente 10 μL) sob uma lamínula de vidro logo após o processo de rota-evaporação. Após as formulações secarem em temperatura ambiente cobertas com placas petri para proteção contra sujeiras, as mesmas foram metalizadas com partículas de ouro para posteriormente serem levadas ao microscópio eletrônico de varredura.

3.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.8.1 Ensaio de atividade tripanocida *in vivo*

Para determinar a atividade tripanocida dos compostos selecionados para experimentos *in vivo* na fase aguda da doença de Chagas foram utilizados camundongos, fêmeas da linhagem Balb/C, pesando aproximadamente 25 g cada. Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições, recebendo água e ração *ad libitum*. Os animais foram infectados intraperitonealmente com 10000 formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Y de *T. cruzi*. Os camundongos foram tratados por 10 dias consecutivos por via oral a partir do quinto dia após a infecção, com uma dose diária do composto a ser determinada de acordo com os ensaios *in vitro*, além de 100 mg/kg/dia do benzonidazol como controle positivo do estudo (Brener, 1962). Após 20 dias da infecção, os animais foram eutanasiados, os órgãos e o soro foram removidos e armazenados a -80 °C para posteriores análises.

3.8.2 Parasitemia e Mortalidade

A parasitemia foi observada nos 7°, 9°, 11°, 13° e 15° dias após a infecção. A contagem de 100 campos foi realizada por observação direta ao microscópio óptico, em um aumento final de 400 vezes, a partir de 5 µL de sangue fresco coletado. O sangue fresco foi coletado por um pequeno corte na ponta da cauda dos animais, colocado sobre uma lâmina e recoberto por lamínula com dimensões de 22 x 22 cm, segundo a técnica descrita por Brener (1962). A sobrevivida foi observada por 60 dias consecutivos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE COMPLEXANTE (H₂L₁)

O agente complexante foi obtido conforme descrito no item 3.3.2. Para confirmação estrutural do composto foi adotada a análise de espectroscopia na região do infravermelho, seguida de uma comparação dos valores de bandas selecionadas encontrada na Tabela 4 deste trabalho com os valores obtidos por Gonçalves e colaboradores (2017).

Tabela 4 - Valores obtidos em cm⁻¹ dos estiramentos e dobramentos das ligações presentes no H₂L₁

Banda	ATR ^a	Pastilhas de KBr ^b
v(O-H)	3375	3346
v(N-H)	3281, 3225	3286, 3196
v(C=N) _{tsc}	1586	1605
v(C=N) _{ox}	1522	1531
δ(O-H)	1365	1366
v(N-O)	1010	1013
v(C=S)	804	802

Fonte: a) Do autor, 2019 b) Gonçalves et al., 2017

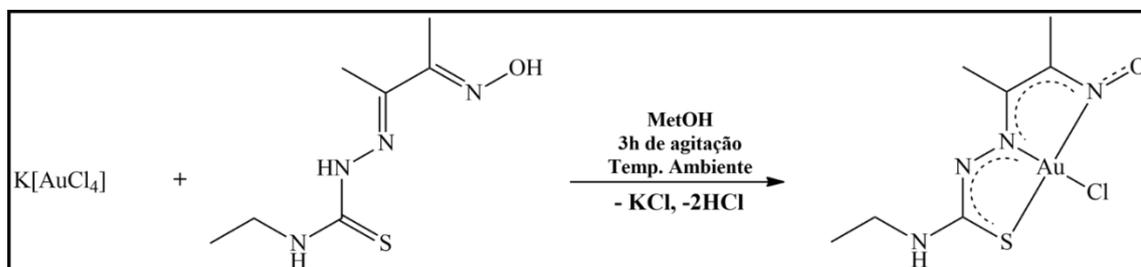
Os valores das bandas características das ligações apresentadas acima diferem muito pouco dos obtidos por Gonçalves e colaboradores (2017), isto se deve ao fato do uso de diferentes equipamentos na análise, assim como ao método de preparação das amostras, pastilhas de KBr ou com auxílio do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR). Apesar desta pequena diferença nos valores de número de onda estão coerentes com a estrutura química proposta para o agente complexante (H₂L₁).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO [AuCl(L₁)]

O complexo [AuCl(L₁)] foi obtido por um método semelhante ao obtido anteriormente por Gonçalves e colaboradores (2017), porém utilizando K[AuCl₄] como precursor metálico ao invés de Na[AuCl₄]·2H₂O. A Figura 20 esquematiza a reação de síntese do complexo. O precipitado obtido não apresenta condutividade molar em CH₂Cl₂, ou seja, é um composto de

coordenação neutro. Este complexo possui boa solubilidade em CH_2Cl_2 e DMSO e baixa solubilidade em EtOH e MetOH.

Figura 20 – Esquema da síntese para obtenção do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$



Fonte: Do autor, 2019

A espectroscopia na região do infravermelho também foi empregada para confirmar a proposta de estrutura química do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$. Da mesma forma que realizado para o ligante livre, foi feita uma comparação dos valores bandas observadas no espectro de IV com os valores obtidos por Gonçalves e colaboradores (2017). Algumas diferenças com relação aos valores de número de onda das bandas características da molécula foram observadas, fato já explicado acima para o agente complexante (H_2L_1). A Tabela 5 apresenta os valores das bandas selecionadas.

Tabela 5 - Valores obtidos em cm^{-1} dos estiramentos das ligações presentes no complexo de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$

Ligação	ATR ^a	Pastilhas de KBr^b
$\nu(\text{N-H})$	3206	3285
$\nu(\text{C=N})_{\text{tsc}}$	1569	1566
$\nu(\text{C=N})_{\text{ox}}$	1514	1516
$\nu(\text{N-O})$	1145	1146
$\nu(\text{C-S})$	617	619

Fonte: a) Do autor, 2019 b) Gonçalves et al., 2017

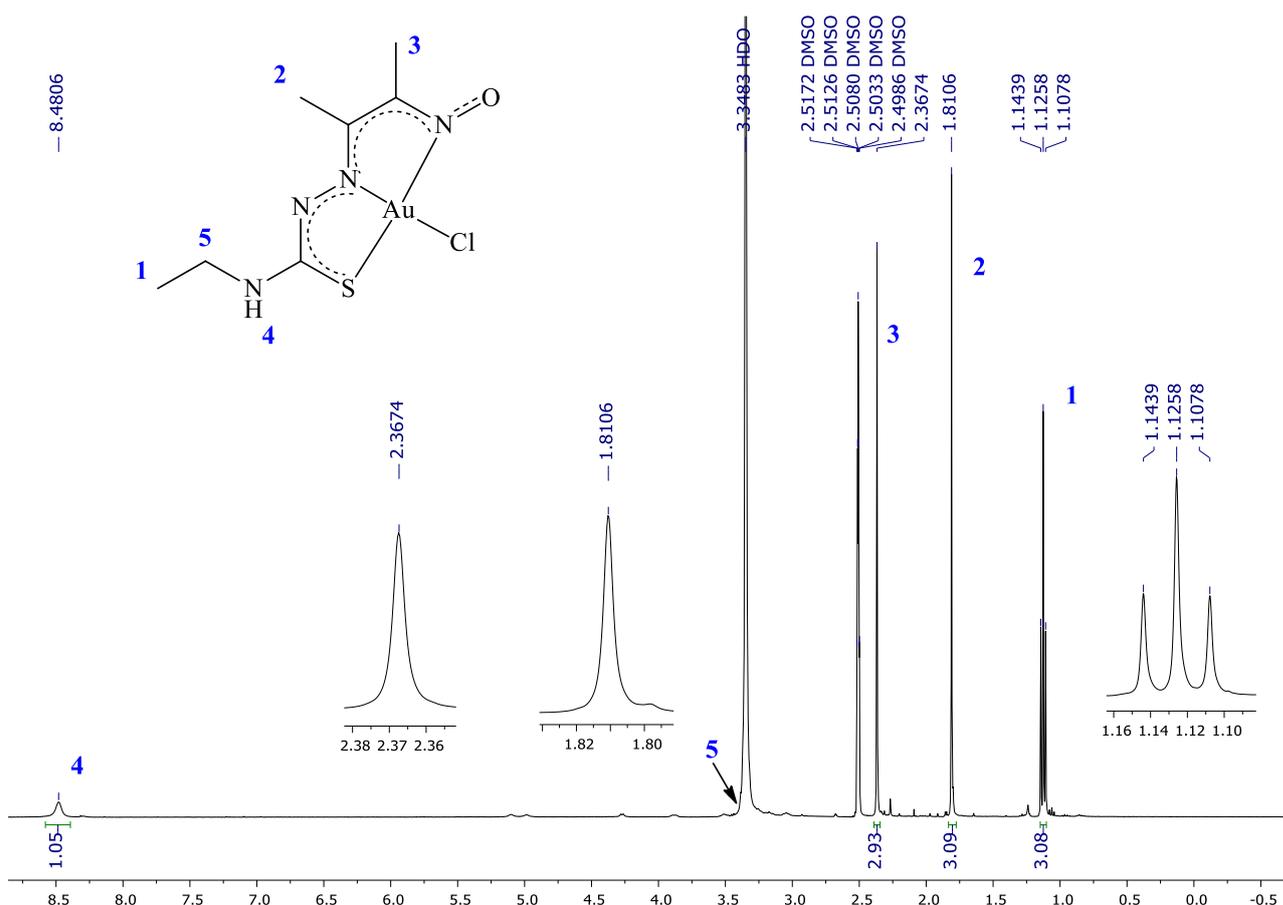
Vale ressaltar que foi observada apenas uma banda característica referente ao estiramento da ligação N-H e ausência do estiramento da ligação O-H em decorrência da dupla desprotonação do ligante após a coordenação com íon central metálico de Au^{III} .

Outra técnica aplicada para elucidação estrutural do $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ foi a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H), cujo espectro é mostrado na Figura 21. Os

sinais de hidrogênio dos grupos OH e NH (NNHC=S) não foram observados, o que corrobora com a análise de infravermelho (SILVERSTEIN et al., 2010; PAVIA et al., 2012; GONÇALVES et al., 2017). O sinal referente ao NH (NHCH₂CH₃) é observado em um valor maior de deslocamento químico em relação aos demais (8,48 ppm). Os sinais dos hidrogênios do grupo etila (CH₃CH₂NH) estão sobrepostos ao sinal da água presente no solvente (3,34 ppm) (GONÇALVES et al., 2017).

As integrais geradas no espectro de RMN de ¹H confirmam a quantidade de hidrogênios presentes. A Tabela 6 apresenta os dados obtidos através do espectro de RMN de ¹H do complexo. Logo, as análises de caracterização para [AuCl(L₁)] confirmam a estrutura proposta do composto de coordenação representado na figura 18.

Figura 21 - Espectro de RMN de ¹H do complexo [AuCl(L₁)] em solução de DMSO (δ em ppm)



Fonte: Do Autor, 2019

Tabela 6 - Valores de deslocamento químico (ppm), multiplicidade e integração dos sinais dos hidrogênios presentes no complexo [AuCl(L1)]

Sinal no espectro	Fonte ^a δ/ppm	Fonte ^b δ/ppm	Multiplicidade	Integração
CH ₃ CH ₂ -NH	8,48	8,46	Singleto	1
CH ₃ C=N-OH	2,36	2,36	Singleto	3
CH ₃ C=N-NH	1,81	1,81	Singleto	3
CH ₂ CH ₃	1,12	1,12	Tripleto	3
CH ₂ CH ₃	3,34	3,34	-	-

Fonte: a) Do autor, 2019 b) Gonçalves et al., 2017

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O

O complexo [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O foi obtido conforme item 3.3.3. Diante do valor de condutividade molar é possível afirmar que o complexo é iônico, sendo ele solúvel em CH₂Cl₂, CHCl₃ e DMSO. Para elucidação da estrutura química do complexo em questão, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e feito uma comparação com os valores obtidos por Maia e colaboradores (2017).

A partir dos valores apresentados na Tabela 7 foi constatado a presença das bandas características presentes em [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O. Novamente pode-se perceber uma pequena diferença nos valores de número de onda devido a diferença de equipamento utilizados e quanto ao preparo das amostras, sendo uma amostra feita em pastilhas de KBr e a outra com o acessório de ATR.

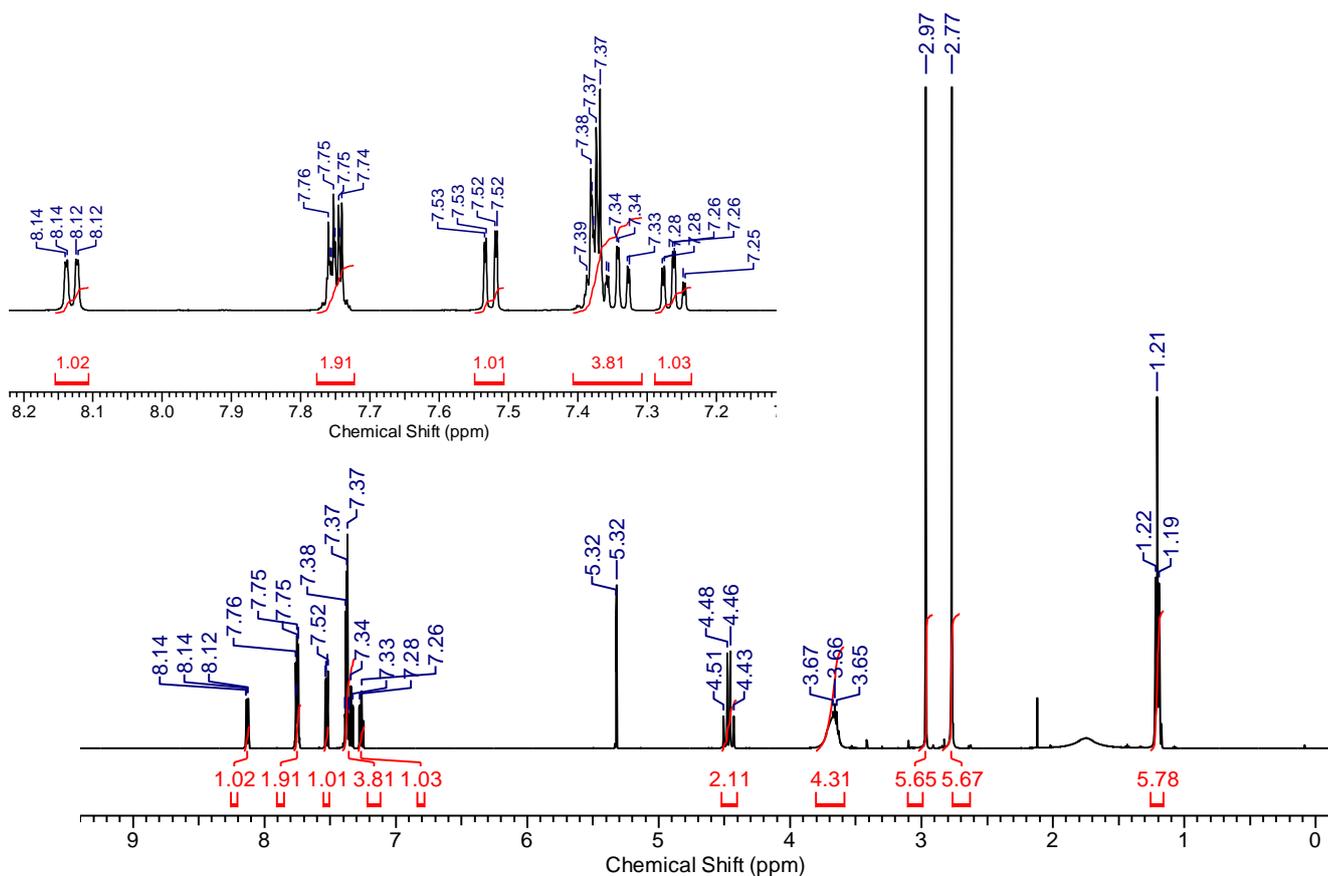
Tabela 7 - Valores obtidos para as principais bandas de estiramento das ligações presentes no complexo de [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O (cm⁻¹)

Banda	ATR ^a	Pastilhas de KBr ^b
v(N-H)	2654	2671
v(C=N)	1549	1556
v(C=C)	1489	1499
v(C=C)	1445	1492

Fonte: a) Do autor, 2019 b) Maia et al., 2017

No espectro de RMN de ^1H apresentado na Figura 22 foi possível observar os sinais referentes a todos os hidrogênios presentes no complexo. A Tabela 8 apresenta os valores de deslocamento químico (ppm) dos sinais dos hidrogênios, assim como a integração dos mesmos comprovando assim a estrutura proposta apresentada na Figura 19.

Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H do complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em solução de CD_2Cl_2 (δ em ppm)



Fonte: Do autor, 2019.

Tabela 8 - Valores de deslocamento químico (ppm), multiplicidade e integração dos sinais dos hidrogênios presentes no complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$

Sinal no espectro	Fonte ^a δ/ppm	Fonte ^b δ/ppm	Multiplicidade	Integração
CH_2CH_3	1,21	1,15	Tripleto	6 H
NHCH_3	2,77	2,73 e 2,77	Duplete	6 H
(Hdamp)				
$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	2,97	2,92	Simpleto	6 H

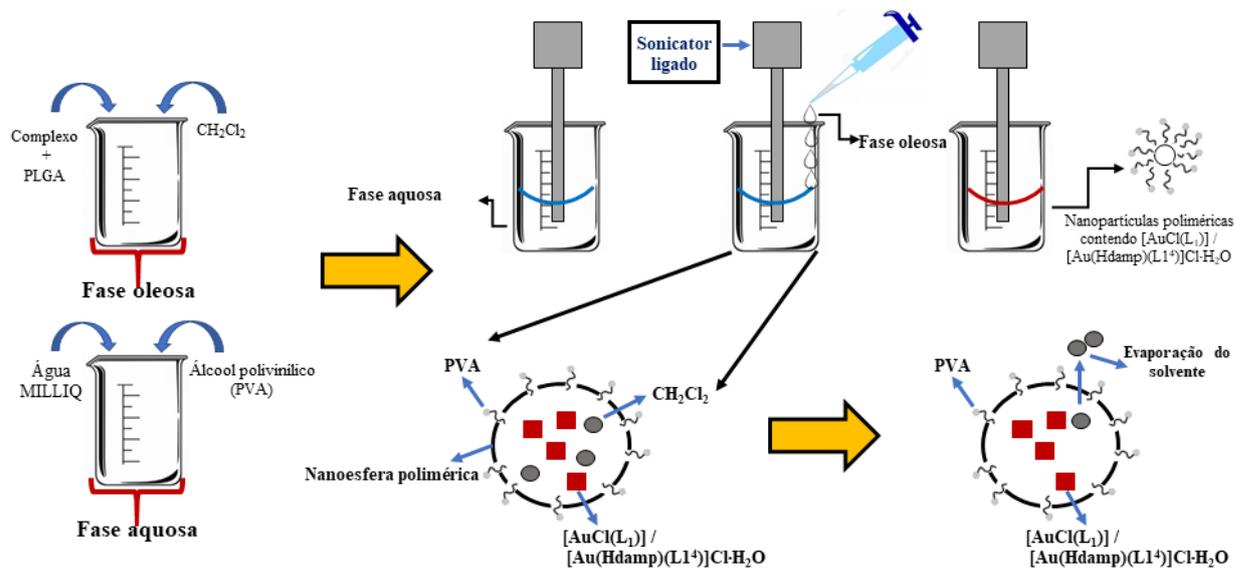
CH_2CH_3	3,58-3,80	3,56-3,65	Multiplete	2 H
CH_2 (Hdamp)	4,46 e 4,48	4,38 e 4,40	Duplo duplete	2 H
Ph	7,25-7,40	7,17-7,32	Multiplete	5 H
Hdamp	7,52	7,43	Duplete	1 H
Hdamp	7,73-7,78	7,64-7,68	Multiplete	2 H
Hdamp	8,13	8,06	Duplete	1 H
NH (Hdamp)	*	12,40	Simpleto	1 H

Fonte: a) Do autor, 2019 b) Maia, et al. (solução de CDCl_3), 2017; * Não foi observado na faixa de 0 a 9,5 ppm

4.4 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O método utilizado para encapsulamento dos complexos de Au^{III} em matriz de PLGA foi o de emulsificação e evaporação de solvente. É um método simples que pode ser aplicado de duas formas, uma com formação emulsão simples (tipo óleo e água) com fornecimento de energia para homogeneização e outra com formação de emulsões múltiplas (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010; RAO; GECKELER, 2011). O método depende basicamente da matriz polimérica e do princípio serem solúveis em solventes que possuem como característica elevada pressão de vapor, ou seja, solventes que são retirados facilmente por processo de evaporação, dentre eles estão o diclorometano, clorofórmio, acetato de etila. Após o processo de solubilização, esta fase denominada de fase oleosa é misturada com uma fase aquosa composta por um tensoativo ou também denominado de agente emulsificante, sendo assim é formada uma emulsão sob uma fonte de energia elevada. Com ação do tensoativo é formada uma emulsão, que sob pressão reduzida retira-se o solvente utilizado com a finalidade de se precipitar o polímero formando nanopartículas contendo o princípio ativo (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; CHAVES et al., 2018). Vale salientar que por este método obtêm-se nanoesferas, ou seja, o princípio ativo encontra-se no interior ou adsorvido / disperso na matriz polimérica (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). A Figura 23 apresenta um esquema do método de emulsificação e evaporação de solvente.

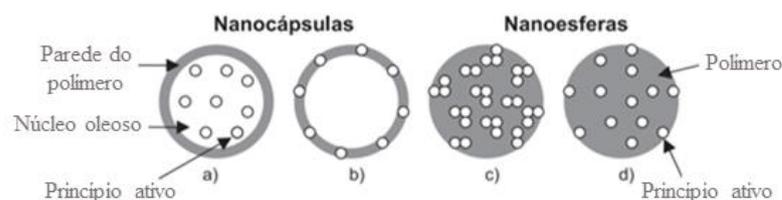
Figura 23 - Esquema da técnica de emulsificação e evaporação de solvente para obtenção de NPs de PLGA com complexos de Au(III).



Fonte: Do autor, 2019.

Um sistema nanoparticulado pode produzir nanocápsulas ou nanoesferas. A Figura 24 apresenta que as nanocápsulas compõem-se de um núcleo oleoso o qual se encontra o princípio ativo rodeado por um material sólido (polímero), é possível observar também que nas nanocápsulas moléculas do princípio ativo podem estar adsorvidas na parede da matriz polimérica. Já as nanoesferas não apresentam um núcleo oleoso, sendo que o princípio ativo se encontra distribuído de forma homogênea no centro da matriz ou adsorvido no polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 24 - Esquema representativo de nanocápsulas e nanoesferas: a) princípio ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) princípio ativo adsorvido a parede do polímero nas nanocápsulas; c) princípio ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) princípio ativo adsorvido ou disperso no polímero das nanoesferas.



Adaptado de: Schaffazick et al., 2003

Este trabalho consistiu em encapsular dois compostos bioativos tripanocidas, $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, em uma matriz de PLGA pelo método de emulsificação e evaporação de solvente do tipo óleo e água (w/o). O solvente utilizado para dissolução dos complexos e matriz polimérica foi o diclorometano, pelo fato dos compostos de coordenação serem solúveis no mesmo e por apresentar características mencionadas acima.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.4.1 Tamanho Médio e Índice de Polidispersividade (PDI)

Sistemas nanoparticulados vêm cada vez mais sendo utilizados em aplicações biológicas. Recomenda-se que para aplicação de nanopartículas por meio de administração intravenosa, os tamanhos das NPs desenvolvidas sejam menores que 300 nm com alta homogeneidade do sistema (baixo PDI) ocorrendo assim melhores interações entre as nanopartículas e alvos biológicos. Desta forma, tamanho e PDI são parâmetros essenciais no desenvolvimento de sistemas nanoparticulados, pois estão diretamente relacionados a biodisponibilidade do princípio ativo (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

Nanopartículas brancas (NPs/brancas), ou seja, partículas contendo apenas a matriz polimérica (PLGA) foram obtidas com a finalidade de se verificar as características físico-químicas quanto ao tamanho, assim como compará-lo antes e após o processo de encapsulamento. Vale salientar que para obtenção das nanopartículas brancas foi adotado o mesmo procedimento descrito no item 3.4.1, porém sem a presença do princípio ativo. A Tabela 9 apresenta as cinco formulações feitas, assim como o tamanho médio e índice de polidispersividade das mesmas.

Tabela 9 - Tamanho médio \pm desvio padrão e índice de polidispersividade das NPs/brancas dispersas em água

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI
I	261,0 \pm 16,47	0,094
II	268,5 \pm 82,22	0,080
III	253,4 \pm 66,79	0,062
IV	244,4 \pm 63,81	0,046
V	259,0 \pm 70,01	0,068

Fonte: Do autor, 2019

A Tabela 10 apresenta as formulações de PLGA contendo [AuCl(L₁)], sendo todas elas com tamanhos médios inferiores a 300 nm. Apesar do desvio padrão indicar nanopartículas com tamanhos maiores ao mencionado não é uma problemática devido a aplicação destas NPs ser por administração oral. Após o processo de encapsulamento houve um pequeno aumento de tamanho das nanopartículas, o que era esperado, uma vez que uma molécula está sendo inserida na matriz polimérica. Vale salientar que para o complexo [AuCl(L₁)] foram realizadas sete formulações, porém todas seguindo o procedimento descrito conforme item 3.4.1. Cada uma das formulações foi utilizada para uma aplicação, sendo I e II para testes de proporção de princípio ativo e matriz polimérica, sendo II utilizada no processo de liofilização sem a presença de crioprotetor e utilizada na análise de espectroscopia na região de infravermelho. A formulação III foi utilizada no teste de estabilidade, IV utilizada no primeiro ensaio tripanocida *in vivo*. A formulação V foi liofilizada com a presença de crioprotetor e utilizada no teste de liberação, assim como VI sendo esta usada em suspensão e, por fim, a formulação VII também foi utilizada no ensaio tripanocida *in vivo*.

Tabela 10 - Tamanho médio \pm desvio padrão e índice de polidispersividade das nanopartículas de PLGA contendo o complexo [AuCl(L₁)], dispersas em água

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI
I	271,7 \pm 104,8	0,099
II	274,1 \pm 87,59	0,115
III	274,1 \pm 97,24	0,129
IV	273,0 \pm 73,20	0,141
V	284,8 \pm 84,51	0,053
VI	271,2 \pm 89,67	0,191
VII	270,9 \pm 86,52	0,156

Fonte: Do autor, 2019

O índice de polidispersividade está relacionado a homogeneidade do sistema, de forma que valores em uma faixa de 0 - 1 o tamanho das nanopartículas são consideradas de alta homogeneidade, ou seja, estão muito próximas ao tamanho médio. Para valores compreendidos na faixa de 0,1 - 0,25 o sistema apresenta uma boa homogeneização do tamanho das partículas, já para valores maiores que 0,5 o sistema não é indicado para aplicação biológica por possuir uma ampla faixa de tamanho das nanopartículas. Dos valores de PDI apresentados todas as

formulações apresentam uma boa homogeneização do sistema, sendo assim são indicadas para aplicações biológicas, gerando uma interação de forma equivalente das nanopartículas com células, enzimas, membranas no meio biológico de aplicação (PATRAVALE; DATE; KULKARNI, 2004; KIM et al., 2012).

Diante dos valores obtidos de tamanho médio e PDI apresentados na Tabela 11, é observado que as nanopartículas obtidas com o princípio ativo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ são maiores quando comparadas com as obtidas com o $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$. Este aumento de tamanho se deve, provavelmente, ao fato do complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ apresentar uma estrutura com número de átomos bem maior que a do $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$. A estrutura química dos respectivos complexos já foi comprovada por Maia e colaboradores (2017) e Gonçalves e colaboradores (2017) através da técnica de difração de raios X em monocristal. Vale ressaltar que não foi possível realizar uma comparação com outros trabalhos uma vez que na literatura não há publicações de encapsulamento de complexos de Au^{III} em matriz de PLGA.

Tabela 11 - Tamanho médio \pm desvio padrão e índice de polidispersividade das nanopartículas de PLGA contendo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ dispersas em água.

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI
I	298,3 \pm 44,69	0,401
II	300,5 \pm 42,60	0,324

Fonte: Do autor, 2019

4.4.2 Potencial Zeta

O Potencial Zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, sabidamente, afetam a estabilidade das mesmas. Havendo uma maior força de repulsão entre as partículas evita-se o fenômeno de aglomeração, aglutinação e/ou floculação, gerando assim partículas mais estáveis e uniformes (MALVERN, 2018).

Como foram feitas formulações de nanopartículas brancas (NPs/brancas), também foram realizadas medidas de Potencial Zeta com a finalidade de verificar alterações após o encapsulamento dos complexos $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$. É possível observar na Tabela 12 que os valores da medida do potencial Zeta das nanopartículas contendo somente o PLGA apresenta valores negativos, o que vai de encontro com a estrutura química do polímero

pois o mesmo apresenta uma função do tipo ácido carboxílico, sendo sua desprotonação favorecida pelo carboxilato formado ser estabilizado por ressonância.

Tabela 12 - Valores de potencial Zeta em mV \pm desvio padrão das formulações Nps/brancas

Formulação (Nps/branca)	Potencial Zeta (mV)
I	-24,7 \pm 5,94
II	-24,0 \pm 5,99
III	-25,0 \pm 6,97
IV	-24,5 \pm 5,41
V	-20,9 \pm 4,72

Fonte: Do autor, 2019

Sistemas nanoparticulados em suspensão em quase sua totalidade possuem estabilidade física quando apresentam valores em módulo de potencial Zeta igual ou superior que 30 mV. Para valores em módulo próximos a 20 mV, o sistema é considerado estável a curto prazo, sendo que para valores compreendidos na faixa de -5 mV a +5 mV o sistema não possui estabilidade, favorecendo a aglomeração de partículas. No entanto, nanopartículas em suspensão podem apresentar estabilidade mesmo em valores de potencial Zeta igual ou inferior a 20 mV devido a adsorção de moléculas de princípio ativo na superfície das partículas (MISHRA et al., 2009).

Após o encapsulamento de [AuCl(L₁)] os valores de potencial Zeta aumentaram consideravelmente em relação aos valores apresentados pelas NPs/brancas, sendo estes representados na Tabela 13. Este aumento no valor do Potencial Zeta tem um forte indício de que o complexo se tornou catiônico no processo, devido a labilidade da ligação do átomo de cloro com o ouro, ou seja, diante desta possibilidade há a saída do ligante clorido da esfera de coordenação sendo substituído por uma molécula neutra como água. É possível fazer uma relação da quantidade de princípio ativo utilizada com o valor de potencial Zeta das formulações I e II com as demais, sendo observado que com uma maior quantidade de complexo obtêm-se valores de potencial mais próximos de zero ou até positivos.

Tabela 13 - Quantidade de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e valores de potencial Zeta \pm desvio padrão para suas respectivas formulações

Formulação	Quantidade em mg de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$	Potencial Zeta (mV)
I	5,00	$2,27 \pm 5,38$
II	4,50	$3,48 \pm 4,53$
III	4,03	$-3,34 \pm 6,16$
IV	4,12	$-6,52 \pm 4,24$
V	4,13	$-7,33 \pm 4,41$
VI	4,11	$-6,49 \pm 4,32$
VII	4,27	$-1,42 \pm 4,15$

Fonte: Do autor, 2019

Para o complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ também houve um aumento do potencial Zeta das suas respectivas formulações quando comparada com as NPs/brancas, o que já era esperado por se tratar de um complexo que apresenta carga oposta (positiva) à do carboxilato do polímero (negativa). Comparando-se os valores de potencial entre as formulações dos dois complexos, praticamente não houve alterações entre as mesmas, reforçando ainda mais a possibilidade de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ ter se tornado catiônico no processo. A Tabela 14 apresenta a quantidade de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ utilizada na formulação assim como os valores de potencial Zeta das mesmas.

Tabela 14 - Quantidade de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e valores de potencial Zeta \pm desvio padrão para suas respectivas formulações

Formulação	Quantidade em mg de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$	Potencial Zeta (mV)
I	4,98	$-6,71 \pm 4,25$
II	4,91	$-6,68 \pm 4,26$

Fonte: Do autor, 2019

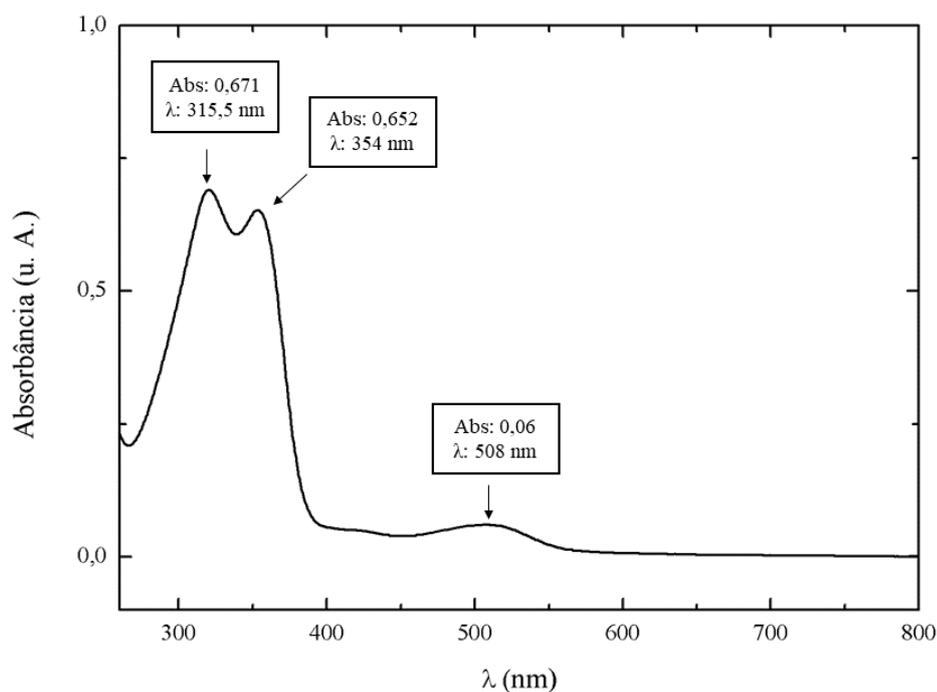
Pode-se notar que os valores do desvio padrão da medida de Potencial Zeta apresentados nas tabelas 12 a 14, compreende-se em uma faixa de ± 4 a ± 7 mV independentemente do valor da medida. Devido ao método de medida do Potencial Zeta do equipamento conforme descrito

item 3.2.5 ser no meio da célula, os desvios padrão podem apresentar valores maiores que o da própria medida (MALVERN, 2015).

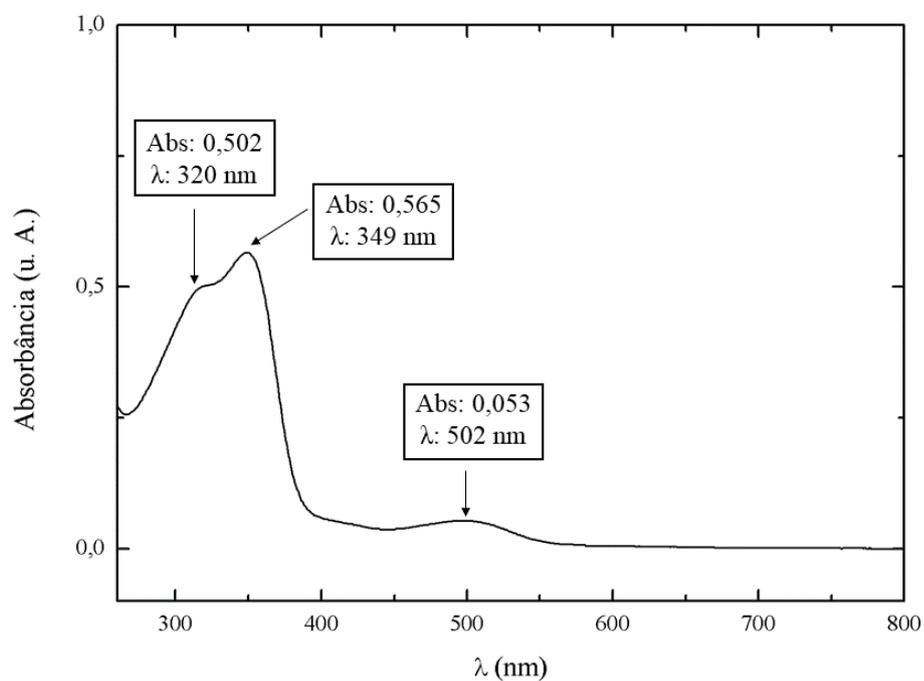
4.4.3 Construção das curvas de calibração

As Figura 25 e 26 apresentam os espectros eletrônicos na região do ultravioleta-visível de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em diclorometano e dimetilsulfóxido, respectivamente. Os resultados obtidos corroboram com os dados apresentados por Gonçalves e colaboradores (2017) no que diz respeito as transições eletrônicas apresentadas por este composto. A partir dos espectros é observado também que a absorção máxima do complexo foi obtida em um comprimento de onda igual a 315,5 e 349 nm, sendo assim realizadas as curvas de calibração conforme item 3.6.1 representadas pelas Figura 27 e 28.

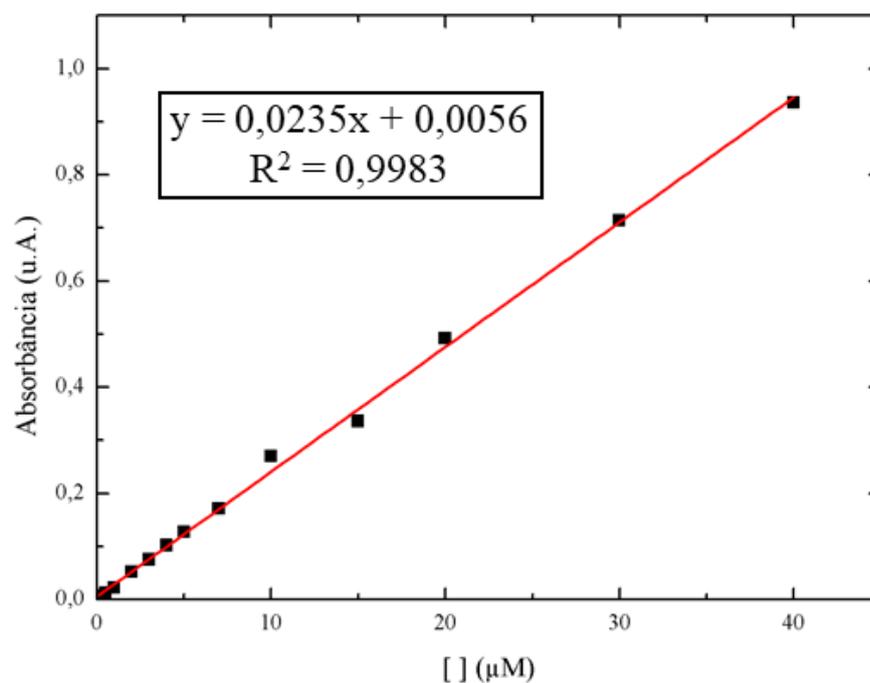
Figura 25 - Espectro eletrônico do $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em CH_2Cl_2 em concentração de 3×10^{-5} mol/L



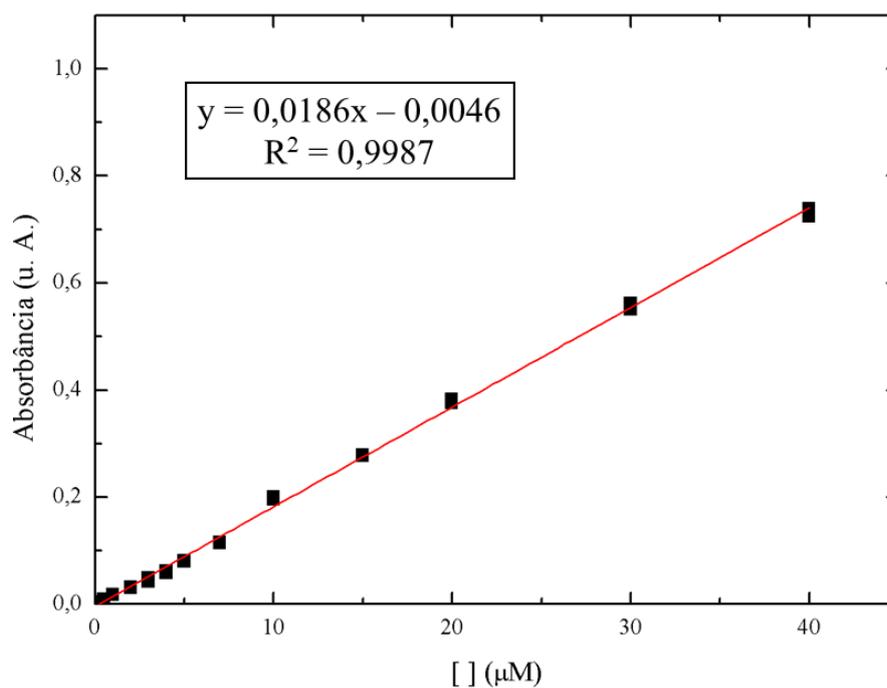
Fonte: Do autor, 2019

Figura 26 - Espectro eletrônico do $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em DMSO em concentração de 3×10^{-5} mol/L

Fonte: Do autor, 2019

Figura 27 - Curva de calibração e equação gerada de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em diclorometano

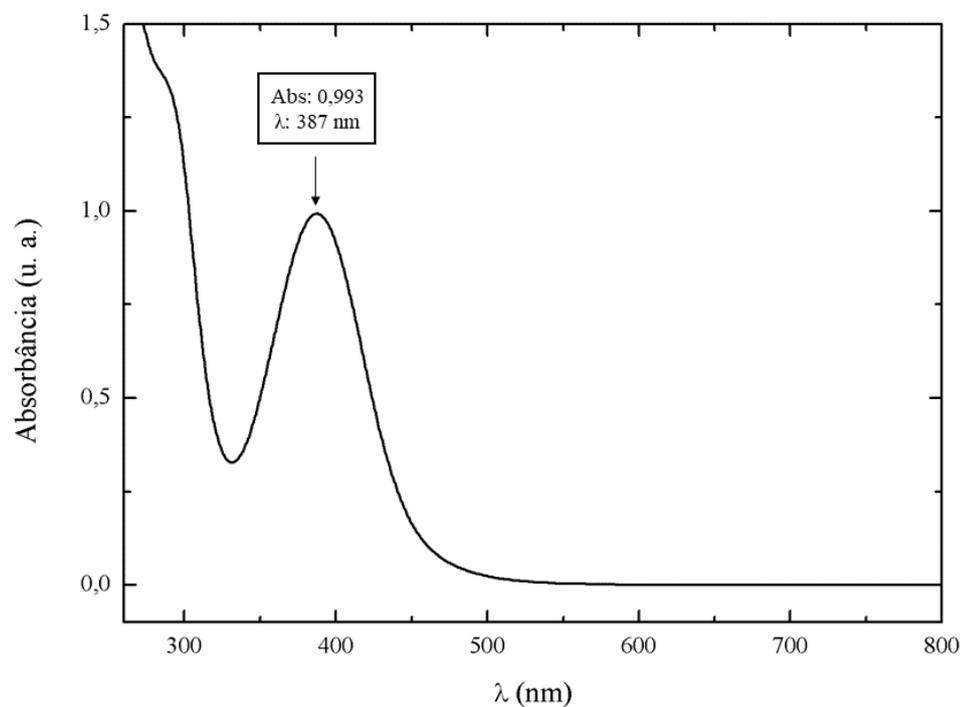
Fonte: Do autor, 2019

Figura 28 - Curva de calibração e equação gerada de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em dimetilsulfóxido

Fonte: Do autor, 2019

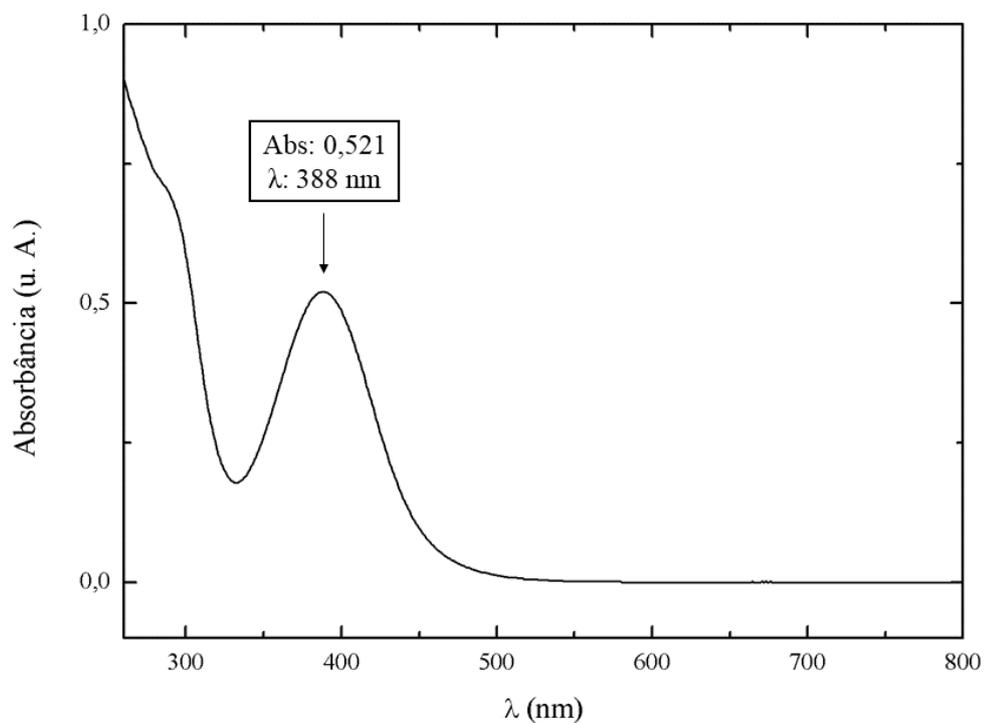
Nos espectros eletrônicos de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ apresentados pelas Figuras 29 e 30 é observado que a absorção máxima do complexo está em um comprimento de onda igual a 387 e 388 nm para os solventes diclorometano e dimetilsulfóxido, respectivamente. Sendo assim, as curvas calibração (Figura 31 e 32) do mesmo foram construídas conforme mencionado item 3.6.1. Vale salientar que as transições eletrônicas apresentadas pelo complexo também corroboram com os dados apresentados por Maia e colaboradores (2017).

Figura 29 - Espectro eletrônico de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em diclorometano com concentração de $5,55 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$



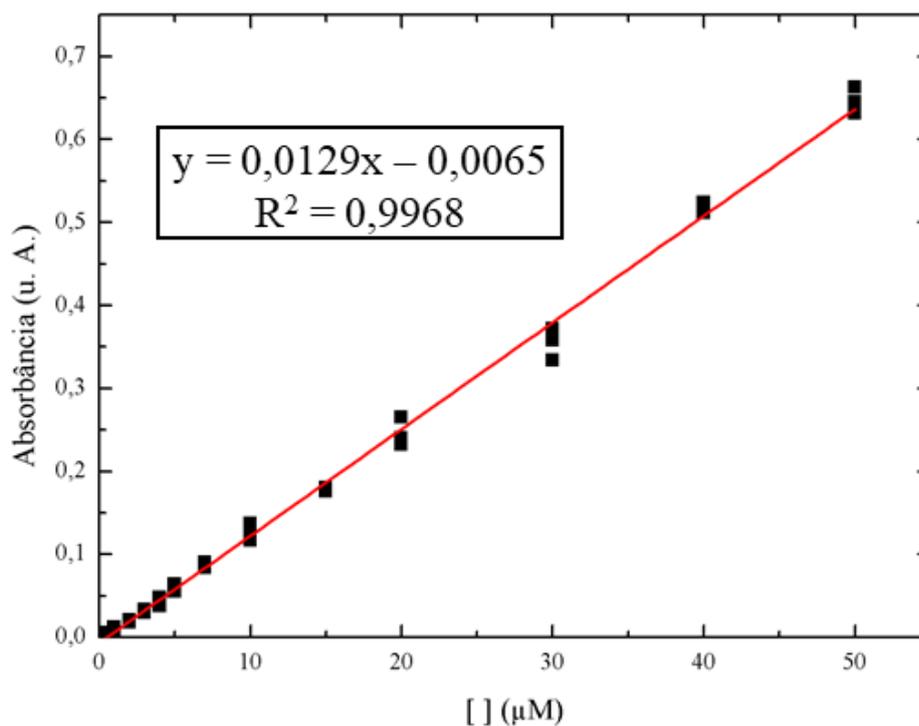
Fonte: Do autor, 2019

Figura 30 - Espectro eletrônico de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em dimetilsulfóxido com concentração de $4,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$



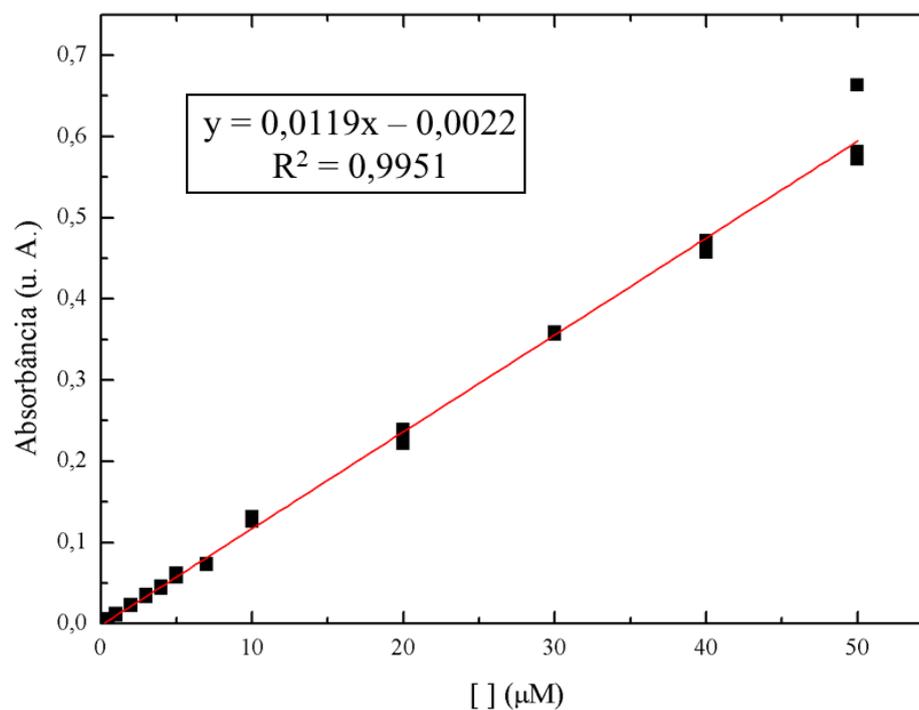
Fonte: Do autor, 2019

Figura 31 - Curva de calibração e equação gerada de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em diclorometano



Fonte: Do autor, 2019

Figura 32 - Curva de calibração e equação gerada de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em dimetilsulfóxido



Fonte: Do autor, 2019

4.4.4 Determinação EE% (método indireto)

Um dos métodos utilizados para determinar a EE% para ambos os complexos foi o de forma indireta pela leitura de absorção via espectroscopia na região do ultravioleta-visível através do sobrenadante gerado no processo de encapsulamento. Através das respectivas curvas de calibração dos complexos em diclorometano é possível quantificar o quanto de massa de complexo ficou retido no sobrenadante. Por meio da equação 1, é possível expressar a eficiência de encapsulamento em porcentagem, uma vez que é conhecida a massa inicial de princípio ativo utilizada assim como a quantidade não encapsulada.

$$EE\% = \frac{\text{Massa de complexo encapsulado (mg)}}{\text{Massa inicial de complexo (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

A Tabela 15 apresenta os valores de massa inicial de $[AuCl(L_1)]$ utilizados no processo de encapsulamento assim como as EE% das respectivas formulações. Diante dos valores de EE(%) expostos, é possível observar que, diminuindo a quantidade de princípio ativo em uma faixa compreendida de 4,03 – 4,27 mg, há um aumento da eficiência de encapsulamento em relação as formulações I e II que utilizaram uma massa inicial de complexo iguais a 5,00 e 4,50 mg, respectivamente. Na literatura existem trabalhos onde a EE(%) em matriz de PLGA são consideradas altas com valores próximos a 90 %, esta alta eficiência está relacionada às características físico-químicas do princípio ativo utilizado, onde um composto hidrofóbico apresentará melhores eficiências de encapsulamento do que uma molécula hidrofílica (CRUZ et al., 2007). Em contrapartida, eficiências de encapsulamento em PLGA próximas a 40 % são consideradas satisfatórias, devido a hidrofiliidade do composto encapsulado (DALMOLIN; KHALIL; MAINARDES, 2016). Novamente não foi possível comparar os valores de EE(%) com outros trabalhos devido a este ser inovador no que diz respeito a encapsulamento de compostos de coordenação contendo Au^{III} , porém a alta eficiência de encapsulamento de $[AuCl(L_1)]$ em PLGA está relacionada a sua alta afinidade pela fase oleosa, sendo este significativamente solúvel em diclorometano assim como a matriz polimérica.

Tabela 15 - Quantidade em mg de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ e EE(%) de suas respectivas formulações

Formulação	Quantidade em mg de [AuCl(L₁)]	EE(%)
I	5,00	79,9 %
II	4,50	85,9 %
III	4,03	93,0 %
IV	4,12	91,4 %
V	4,13	92,3 %
VI	4,11	92,1 %
VII	4,27	88,9 %

Fonte: Do autor, 2019

Na Tabela 16 apresenta os valores de EE(%) para o complexo $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$, sendo eles maiores quando comparados com $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$. A alta eficiência deste complexo está relacionada novamente a natureza iônica do mesmo por apresentar carga oposta ao carboxilato formado do polímero, havendo assim uma atração eletrostática entre os mesmos.

Tabela 16 - Quantidade em mg de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e EE(%) de suas respectivas formulações

Formulação	Quantidade em mg de [Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O	EE(%)
I	4,98	99,8 %
II	4,91	99,7 %

Fonte: Do autor, 2019

4.4.5 Determinação EE% (método direto)

Com a finalidade de se estabelecer uma comparação entre os métodos indireto e direto, foram realizadas duas novas formulações, uma de cada complexo de ouro. Através da leitura de absorção via espectroscopia na região do ultravioleta-visível foi possível determinar o quanto de massa de cada princípio ativo foi encapsulada, por meio da quebra das nanopartículas geradas pelo solvente dimetilsulfóxido. O método direto não foi utilizado nas outras

formulações, pelo fato da perda total do material produzido, inviabilizando as aplicações posteriores.

A Tabela 17 apresenta os valores das EE(%) de ambos os complexos de ouro em matriz de PLGA. Diante dos valores obtidos é possível notar uma diferença de quase 40% entre as EE(%) para [AuCl(L₁)], e de aproximadamente 30% para [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O. A grande diferença entre as EE(%) está associada a perda de massa de princípio ativo no decorrer do processo de encapsulamento. Através da determinação pelo método indireto este fator não é levado em conta, pois é determinado o quanto de massa ficou retido no sobrenadante para posterior dedução da massa inicial. Para se estabelecer uma relação mais fidedigna entre os métodos seria necessário realizar uma maior quantidade de formulações (maior *n*) para ambos os complexos, porém devido a pequena quantidade de princípio ativo disponível, não foi possível tal ação.

Tabela 17 - Quantidade em mg e EE(%) estabelecidas por diferentes métodos de ambos os complexos de ouro

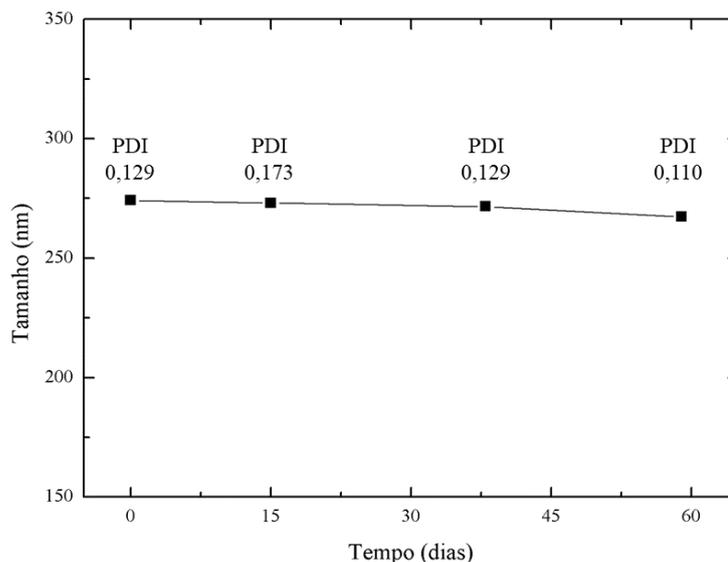
Formulação	Quantidade em mg	EE(%) – método indireto	EE(%) – método direto
[AuCl(L ₁)] (VIII)	4,05	89,29	50,3
[Au(Hdamp)(L ₁ ⁴)]Cl·H ₂ O (III)	5,09	99,8	71,1

Fonte: Do autor, 2019

4.4.6 Estabilidade

A avaliação da estabilidade físico-química das nanopartículas é algo extremamente relevante, pois há a possibilidade de com o passar do tempo os parâmetros da formulação inicial serem modificados. Neste trabalho, o estudo de estabilidade das nanopartículas contendo [AuCl(L₁)] foi realizado por meio de análises de tamanho (nm), índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta. O tempo final para realização das leituras de tamanho e potencial Zeta das NPs/[AuCl(L₁)] para verificação da estabilidade da formulação foi de 59 dias. Vale ressaltar que a condição de armazenamento da formulação III (utilizada no teste) foi a uma temperatura de 8 °C. A Figura 33 apresenta um gráfico da variação do tamanho das nanopartículas no decorrer de 15, 38, 59 dias após encapsulamento do [AuCl(L₁)] em PLGA.

Figura 33 - Estabilidade das nanopartículas de PLGA contendo [AuCl(L₁)] quanto ao tamanho e índice de polidispersividade

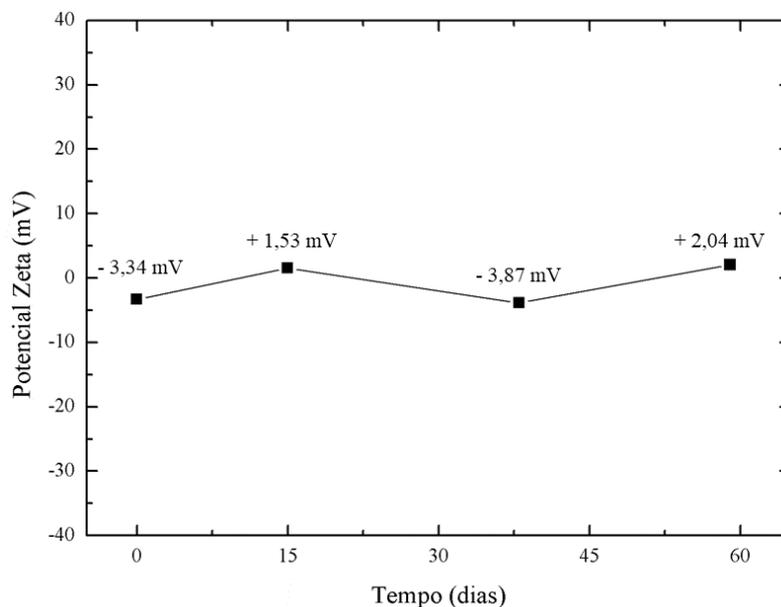


Fonte: Do autor, 2019

Diante dos resultados obtidos, é possível observar que não há alterações significativas em relação ao tamanho (nm) e PDI das nanopartículas no decorrer de quase dois meses de armazenamento.

Com relação aos valores de potencial Zeta (mV) em função do tempo, houve um pequeno aumento no decorrer de quase dois meses. A tendência é de aumento, devido a mais moléculas de [AuCl(L₁)] estarem adsorvidas na superfície das partículas, este fator também contribuiu para o não aumento significativo das mesmas. A Figura 34 apresenta um gráfico da variação do potencial Zeta (mV) no decorrer de 15, 38, 59 dias após o encapsulamento do complexo em PLGA.

Figura 34 - Estabilidade das nanopartículas de PLGA contendo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ em relação ao potencial Zeta (mV)



Fonte: Do autor, 2019

4.4.7 Liofilização

Também conhecido como secagem a frio ou criodessecação, o processo de liofilização consiste em retirar água de uma substância ou formulação de interesse por meio de sublimação, ou seja, a mudança direta do estado sólido para o gasoso. Este processo tem como aplicação a conservação de produtos, dentre os exemplos se destacam, alimentos, células, enzima, vacinas, etc. A grande vantagem da liofilização é a não utilização de conservantes químicos, sendo utilizados somente processos de congelamento e desidratação para tal aplicação (LIOTOP, 2014).

Apesar das nanopartículas de PLGA contendo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ serem estáveis em suspensão, o processo de liofilização foi empregado para utilização do pó de coloração rosa obtido para posteriores análises de espectroscopia na região do infravermelho e testes de liberação *in vitro* comparando-se com a formulação em suspensão. Duas formulações foram selecionadas para serem liofilizadas e ambas congeladas a uma temperatura de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ sendo uma suspensão somente em água, e a outra com uma solução de 5% de sacarose (crioprotetor). A finalidade de se liofilizar em diferentes condições foi a de avaliar alterações nos parâmetros das nanopartículas contendo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ sem e com a presença de um crioprotetor.

Crioprotetores são substâncias utilizadas em diversas áreas do conhecimento, sendo na farmacêutica utilizados como protetores de formulações dos danos causados pelo processo de congelamento. Existem diversos tipos de crioprotetores sendo os mais comuns e utilizados açúcares como trealose, glicose, lactose e sacarose (PIASSI et al., 2009; CASTRO et al., 2011). O modo de ação dos crioprotetores está associado a uma formação de uma “capa”, ou uma matriz amorfa em volta das nanopartículas, gerando um espaçamento entre as mesmas, não acarretando em um processo de agregação tendo como consequência a redispersão destas (SAEZ et al., 2000).

Diante dos valores de tamanho, PDI e Potencial Zeta antes e após o processo de liofilização apresentados na Tabela 18 é possível observar que a presença de sacarose no processo de liofilização é essencial, sendo que com a formulação ausente desta substância no congelamento não é recomendado seu uso em aplicações biológicas devido ao seu significativo aumento de tamanho e PDI, com relação ao tamanho é observado uma mudança de escala, de nanométrica para micrométrica.

Tabela 18 – Valores de tamanho, PDI e potencial Zeta de formulações contendo [AuCl(L₁)] sem e com a presença de crioprotetor após o processo de liofilização

Formulação	<i>Sem crioprotetor</i>			<i>Com crioprotetor</i>		
	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
Sem liofilização	274,1	0,115	3,48 ± 4,53	284,8	0,053	-7,33 ± 4,41
Liofilizadas	1,131 x 10 ⁴	0,612	-5,83 ± 2,83	272,3	0,107	-9,47 ± 4,28

Fonte: Do autor, 2019

Outro dado relevante é o de potencial Zeta onde em ambas condições houve um aumento em módulo, deslocando-se para valores mais negativos após serem liofilizadas, isto se deve, provavelmente, a uma maior interação do complexo com o interior da matriz polimérica após o processo.

Uma formulação contendo [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O também foi submetida ao processo de liofilização, porém, somente com a condição da presença de sacarose no congelamento, uma vez que a formulação contendo [AuCl(L₁)] sem crioprotetor no congelamento houve um aumento significativo de tamanho e PDI, sendo esta inutilizável em aplicações biológicas. Diante dos resultados obtidos apresentados na Tabela 19, o processo de liofilização das nanopartículas contendo [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O não se mostrou viável, pois

houve um aumento significativo de tamanho e PDI, sendo esta formulação utilizada apenas para análise de espectroscopia na região do infravermelho. Em relação ao potencial Zeta houve um aumento, ou seja, o valor desta medida após a liofilização deslocou-se para valores mais positivos, favorecendo assim o processo de agregação das partículas.

Tabela 19 - Valores de tamanho, PDI e potencial Zeta de formulações contendo [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O com a presença de crioprotetor após o processo de liofilização

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (Mv)
Sem liofilização	298,3 ± 44,69	0,401	-6,71 ± 4,25
Liofilizada	529,3 ± 39,92	0,639	-3,25 ± 2,41

Fonte: Do autor, 2019

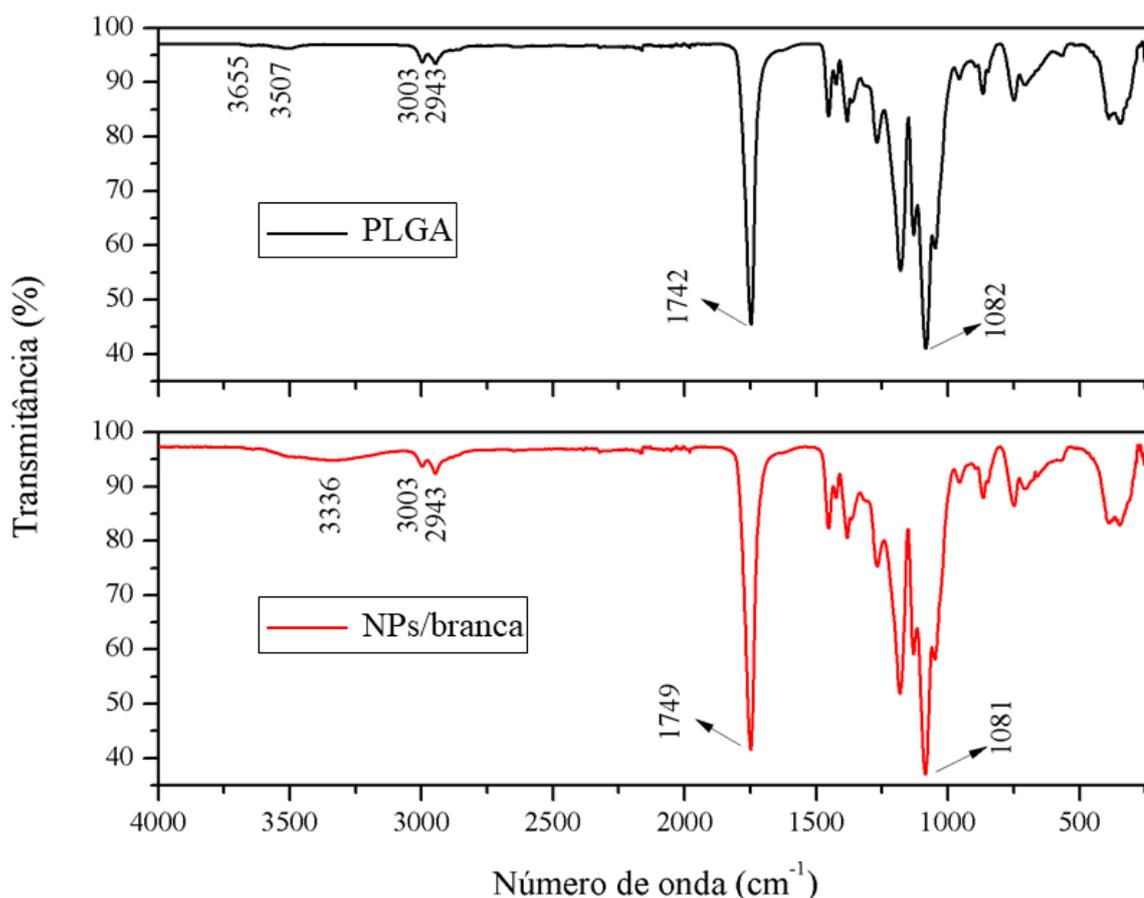
Após o processo de liofilização com a presença de crioprotetor, geralmente ocorre o aumento do valor de Potencial Zeta como reportado por Chasteigner e colaboradores (1996), ou seja, há um deslocamento para valores mais positivos. Os autores observaram que com a presença de sacarose no sistema nanoparticulado desenvolvido houve uma alteração do valor de Potencial Zeta de – 40,9 mV para – 20,4 mV após a liofilização (*freeze-drying*). De acordo com os autores, esta diferença está associada ao mascaramento da superfície da nanoesfera, devido a ligações de hidrogênio entre os grupos OH da sacarose com o do polímero utilizado. Outra hipótese abordada no trabalho é a de moléculas de princípio ativo estarem adsorvidas na superfície do polímero, ocasionando esta diferença (CHASTEIGNER et al., 1996). De acordo com os dados experimentais, as NPs de [Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O indicam o que foi dito anteriormente, ao contrário das NPs de [AuCl(L₁)].

4.4.8 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é empregada com a finalidade de se analisar as bandas características das ligações tanto do princípio ativo quanto da matriz antes e após o processo de encapsulamento. A Figura 35 apresenta os espectros vibracionais na região do infravermelho do PLGA e de uma formulação de NPs/branca. Diante das bandas e de seus respectivos valores em número de onda pode-se observar que o estiramento referente a ligação (C-H) de carbonos de hibridização do tipo *sp*³ foram mantidas em uma faixa de 3003 – 2943 cm⁻¹, assim como o grupo funcional carbonila tanto da função ácido carboxílico quanto da função do tipo éster, sendo a banda referente ao estiramento da ligação (C=O) mantida em

valores próximos a 1740 cm^{-1} . Em 1081 cm^{-1} encontra-se a banda referente ao estiramento da ligação (C-O) da função éster. A banda que houve alteração é referente a ligação (O-H), olhando somente o espectro do PLGA é possível verificar, mesmo que discretamente, dois estiramentos desta ligação em 3655 e 3507 cm^{-1} das funções do tipo álcool e ácido carboxílico respectivamente (SILVERSTEIN et al., 2010; PAVIA et al., 2012). Após a obtenção das nanopartículas brancas é possível constatar no espectro que houve uma sobreposição das bandas em 3336 cm^{-1} de (O-H) devido ao alargamento da mesma, fato este decorrente de ligações de hidrogênio da formulação liofilizada com a água (umidade).

Figura 35 - Espectro vibracional na região do infravermelho do PLGA e das NPs/branca

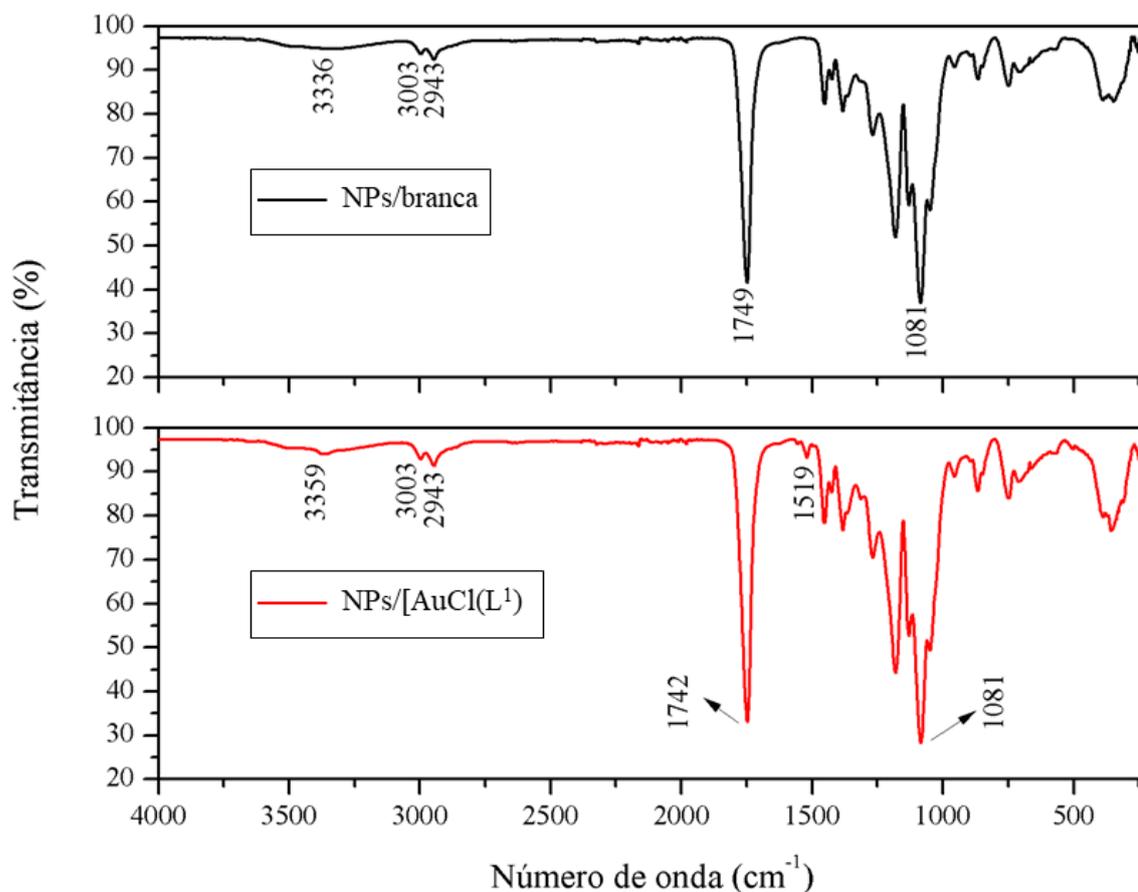


Fonte: Do autor, 2019

A análise do espectro vibracional na região do infravermelho das NPs/[AuCl(L₁)] não pôde confirmar se houve a substituição do ligante cloro na esfera de coordenação por uma outra molécula. Esta análise não foi elucidativa devido a proporção massa/massa de princípio ativo/matriz polimérica sendo próxima de 1:10, portanto, as bandas apresentadas na Figura 36

são provenientes do PLGA, com exceção da banda referente ao estiramento da ligação (C=N) em 1519 cm^{-1} da tiossemicarbazona presente no complexo.

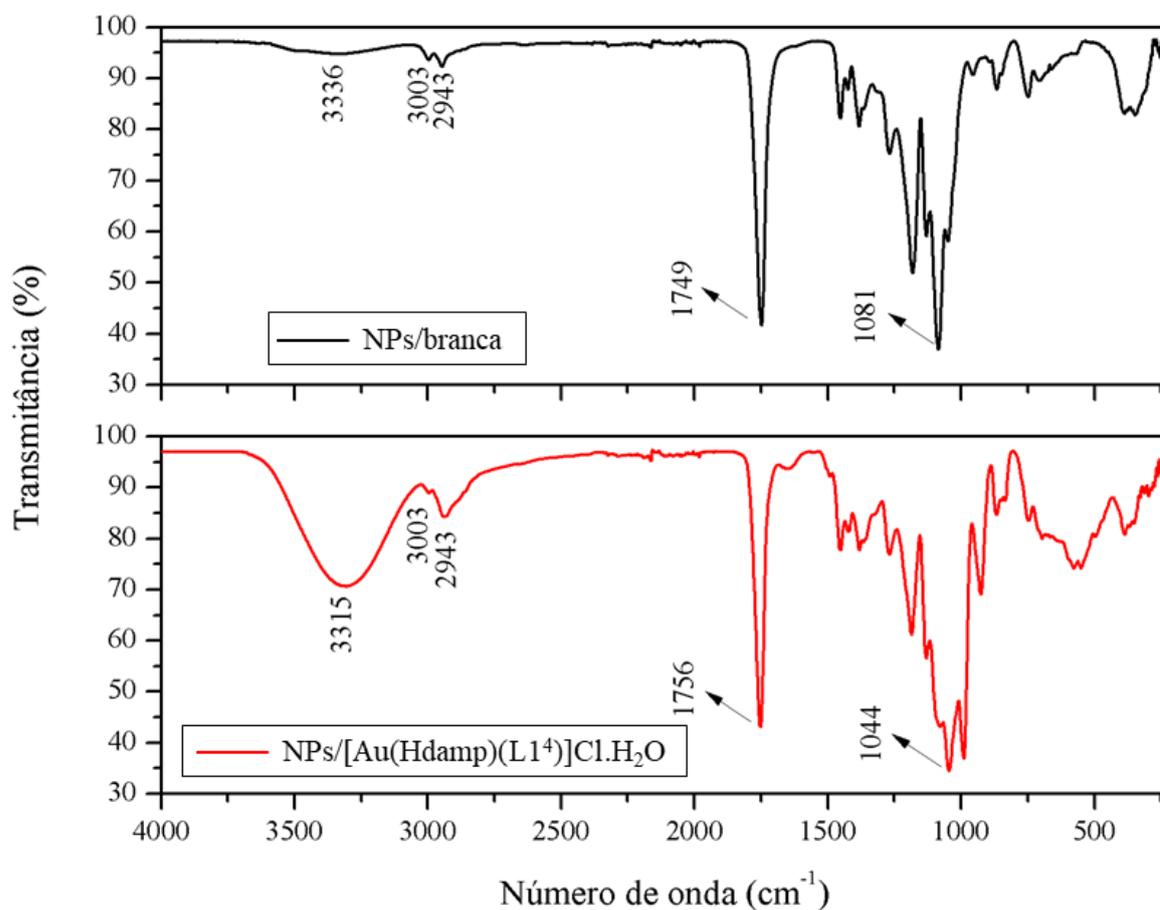
Figura 36 - Espectro vibracional na região do infravermelho das NPs/branca e NPs/[AuCl(L₁)]



Fonte: Do autor, 2019

Para as NPs/[Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O o espectro vibracional da região do infravermelho, apresentado na Figura 37, não nos forneceu informações conclusivas se houve ou não alteração na esfera de coordenação do complexo. Visualmente a formulação deste complexo é bem mais higroscópica do que a do [AuCl(L₁)], justificando a grande absorção de umidade e também por apresentar uma banda referente ao estiramento da ligação (O-H) em 3315 cm^{-1} . Devido a quantidade de princípio ativo ser cerca de dez vezes menor do que o PLGA, novamente as bandas características apresentadas são do polímero.

Figura 37 - Espectro vibracional na região do infravermelho das NPs/branca e NPs/[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O

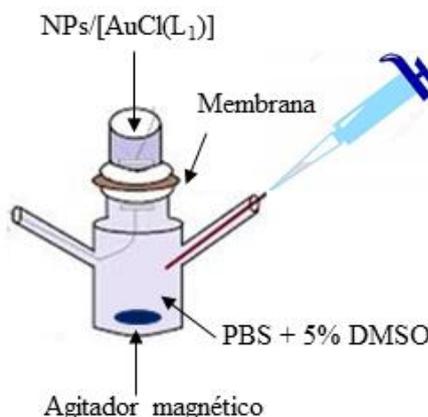


Fonte: Do autor, 2019

4.4.9 Liberação *in vitro* e aplicação de modelos matemáticos

Para o ensaio de liberação *in vitro* das NPs/[AuCl(L₁)] foi utilizada a célula de Franz, também conhecida como célula de difusão vertical, contendo uma membrana de celulose com a função de separar as formulações do meio receptor (Figura 38). Duas formulações foram selecionadas para realização do teste que ocorreu em triplicata, uma já suspensa e uma outra liofilizada ressuspensa, ambas em água. Estas diferentes condições nas formulações visa um estudo comparativo no perfil de liberação do princípio ativo da matriz polimérica das NPs/[AuCl(L₁)]. Vale ressaltar novamente que para as NPs/[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O não foi possível realizar teste de liberação *in vitro* por não encontrar até o momento um meio receptor adequado, sendo testados os meios PBS + 5% de DMSO e PBS + 1% de PVA.

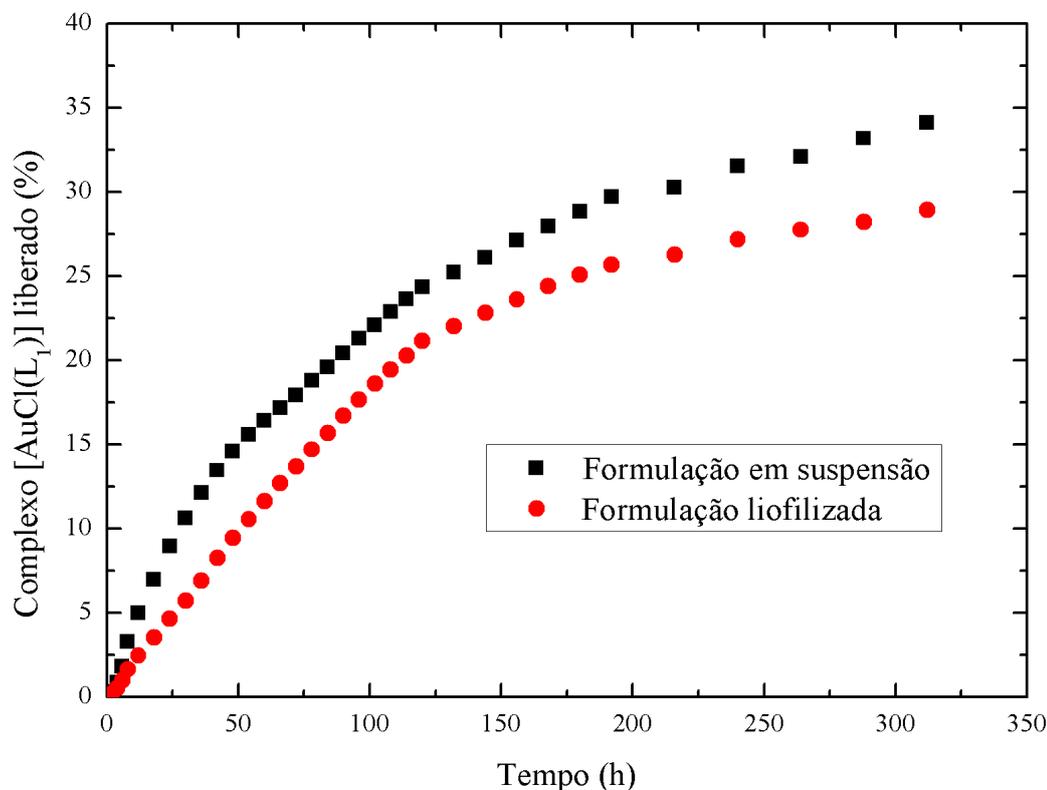
Figura 38 - Esquema representativo do sistema de liberação *in vitro*



Fonte: Do autor, 2019

A Figura 39 apresenta os perfis de liberação do complexo $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ encapsulado em matriz de PLGA. Como pode ser observado, houve uma pequena alteração no perfil de liberação, sendo que as NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ que passaram pelo processo de liofilização obtiveram uma liberação mais lenta do princípio ativo. Esta diferença está associada a dois fatores, ou pela combinação dos mesmos, o primeiro é que houve uma maior interação do complexo com o interior da matriz polimérica devido aos valores de potencial Zeta já apresentados, o segundo é que a sacarose, substância utilizada como crioprotetor, criou uma barreira não somente para evitar o processo de agregação, mas também dificultou a liberação do composto para o meio receptor. Nas primeiras doze horas há uma rápida liberação do complexo nos dois perfis, isto está associado ao primeiro efeito *burst* sendo este relacionado com a difusão do complexo na matriz, ou seja, moléculas de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ adsorvidas na superfície da matriz polimérica rapidamente são liberadas para o meio receptor por estarem mais disponíveis (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007; MAKADIA; SIEGEL, 2011). Os resultados obtidos revelaram uma liberação de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ de 29 % (formulação liofilizada) e 34 % (formulação em suspensão) em um tempo total de 312 h (13 dias).

Figura 39 - Curva de liberação do complexo [AuCl(L₁)] (Mt / M_∞ versus tempo (t)) encapsulado em matriz polimérica de PLGA



Fonte: Do autor, 2019

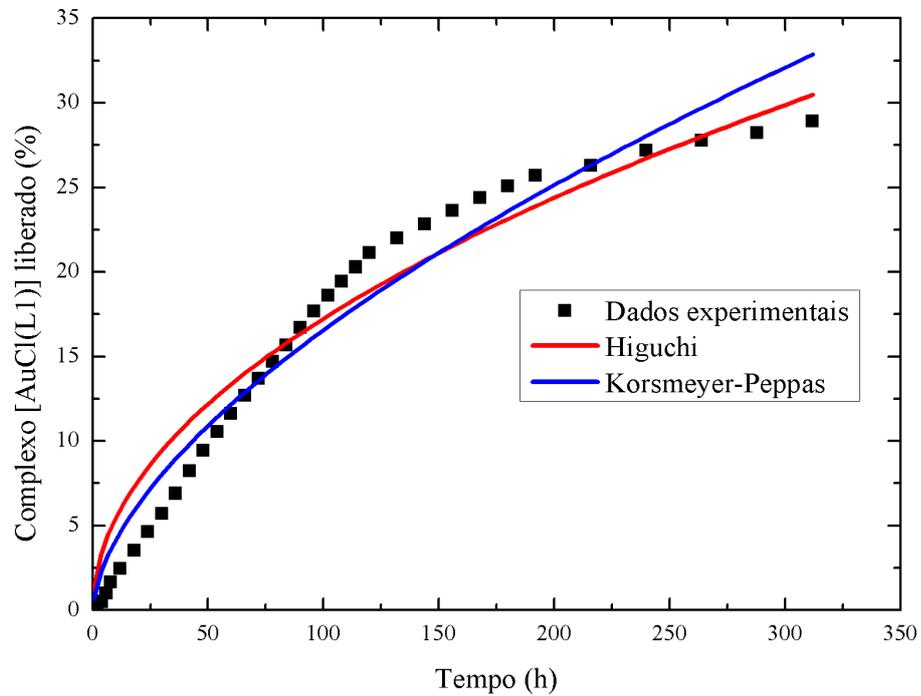
Através dos dados obtidos de liberação do complexo [AuCl(L₁)] modelos matemáticos foram aplicados com auxílio do software OriginPro 8 para explicar o perfil de liberação do mesmo em uma matriz de PLGA. Os modelos utilizados foram o de Higuchi e Korsmeyer-Peppas. O melhor modelo que se ajustou aos dados foi o de Korsmeyer-Peppas. O comportamento de liberação do complexo é dado pela constante cinética $k = 1,03586 \text{ h}^{-1}$ e $k = 1,95112 \text{ h}^{-1}$ com coeficiente de relação $R^2 = 0,96219$ e $R^2 = 0,97864$ para a formulação liofilizada e em suspensão, respectivamente. A Tabela 20 apresentam os valores de R^2 e das constantes cinéticas, sendo que as Figuras 40 e 41 mostram os ajustes dos modelos utilizados com os dados experimentais.

Tabela 20 – Valores de coeficientes de correlação e constantes cinéticas dos modelos matemáticos aplicados para liberação das NPs/[AuCl(L₁)] liofilizadas/solução

Modelo	R^2	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$
Higuchi	0,94738 / 0,97894	1,72485 / 2,07654
Korsmeyer-Peppas	0,96219 / 0,97864	1,03586 / 1,95112

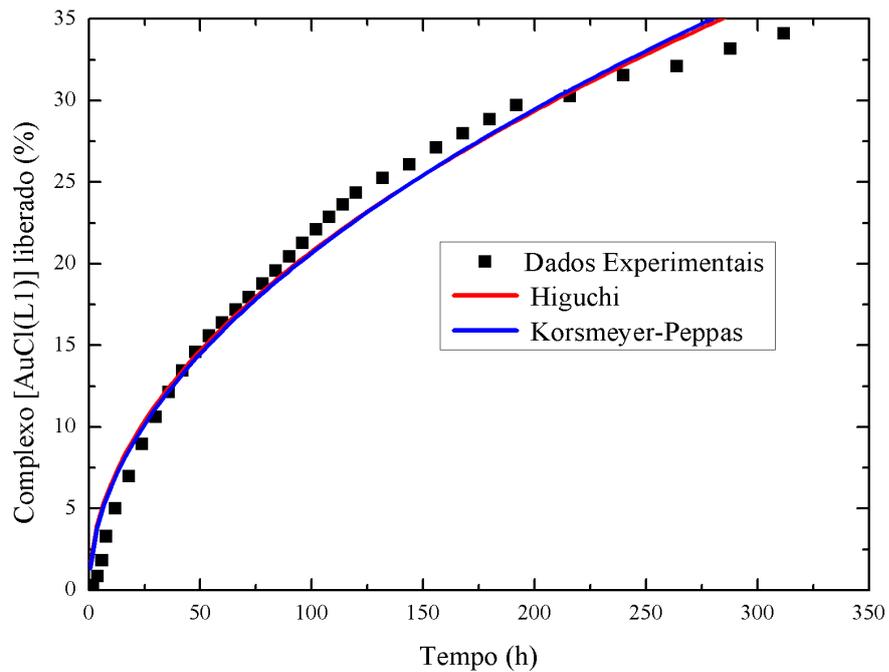
Fonte: Do autor, 2019

Figura 40 - Ajuste dos modelos matemáticos utilizados para a liberação das NPs/[AuCl(L₁)] liofilizadas



Fonte: Do autor, 2019

Figura 41 - Ajuste dos modelos matemáticos utilizados para a liberação das NPs/[AuCl(L₁)] em suspensão



Fonte: Do autor, 2019

O modelo de Korsmeyer-Peppas é um modelo semiempírico, sendo um dos modelos mais utilizados para explicar os mecanismos de liberação controlada. A equação 2 apresenta o modelo citado, onde M_t / M_∞ significa a quantidade de princípio ativo liberado em um tempo infinito, k é a constante cinética, t equivale ao tempo e n indica o coeficiente de difusão (HOSSEINI et al., 2014; FARIA et al., 2017).

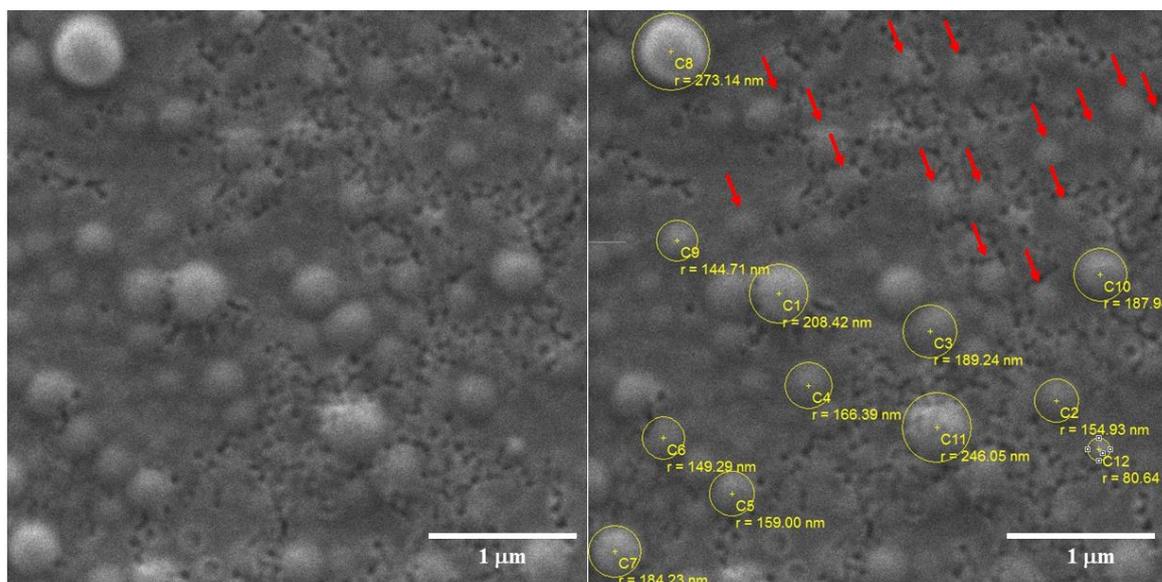
$$\boxed{\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n} \quad (2)$$

O modelo de Korsmeyer-Peppas foi utilizado para determinação do coeficiente de difusão (n) dos dados experimentais. Através do modelo foi obtido um valor de n igual a 0,60192 para as NPs/[AuCl(L₁)] liofilizadas e n igual a 0,51249 para as NPs/[AuCl(L₁)] em suspensão. De acordo com o modelo (Equação 2) para valores de $n \leq 0,43$ indica um mecanismo de liberação do princípio ativo por difusão, já para valores de $n \geq 0,85$ indica um mecanismo de liberação por relaxamento da cadeia polimérica e por fim para valores $0,43 \leq n \leq 0,85$ indica-se um mecanismo de liberação combinada de relaxamento da cadeia polimérica e difusão (HOSSEINI et al., 2014; FARIA et al., 2017). Diante dos valores apresentados para o coeficiente de difusão do complexo [AuCl(L₁)] para ambas NPs/[AuCl(L₁)] há uma combinação de mecanismos de liberação do mesmo.

4.4.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

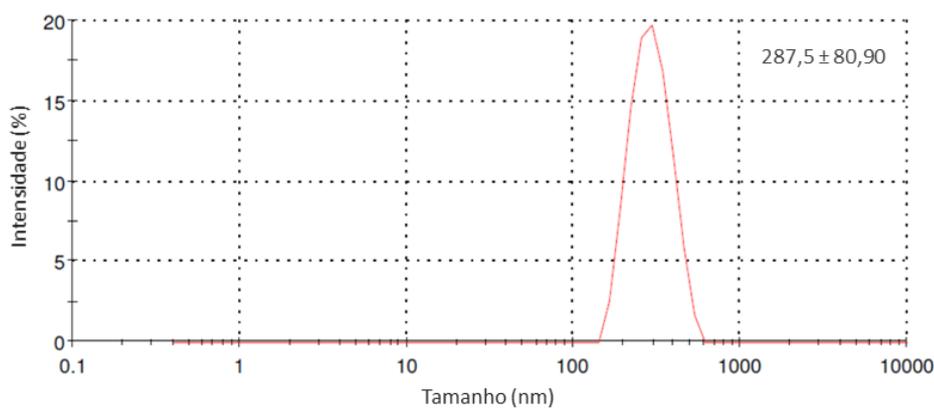
Para uma caracterização mais precisa de materiais em escala nanométrica é empregada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). No presente trabalho, o MEV permitiu a determinação do tamanho das nanopartículas de PLGA (PLGA-NPs) contendo os complexos de ouro ([AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O). A Figura 42 apresenta a morfologia e o tamanho das NPs contendo [AuCl(L₁)]. Pode-se verificar um tamanho médio de aproximadamente 357 nm e a formação de partículas esféricas. Os resultados obtidos via MEV complementam os dados de DLS (Figura 43), e a diferença de aproximadamente 20 % no tamanho médio das NPs de [AuCl(L₁)] se deve ao fato da limitação da aproximação do canhão de elétrons na amostra, onde não foi possível capturar imagens de alta resolução das NPs com tamanhos inferiores, como mostrados na Figura 42 pelas setas em vermelho.

Figura 42 - Micrografia das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação IX), aumento: 50 kx.



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 43 - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação IX)

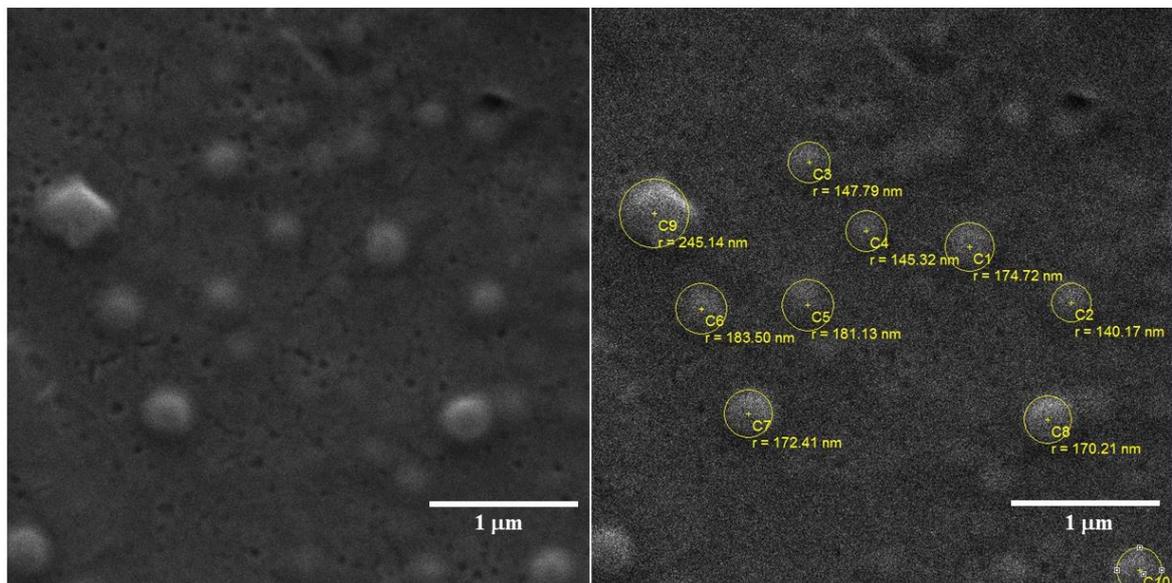


Fonte: Do autor, 2019

As imagens obtidas das NPs de PLGA/[Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O demonstrada na Figura 44 mostram partículas de morfologia esférica moderada com um tamanho médio de aproximadamente 347 nm. Para as NPs de [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O, foi possível verificar uma diferença no tamanho médio de aproximadamente 1,4% em relação aos dados de DLS (Figura 45), confirmando a formação de partículas mais homogêneas. De acordo com Cartaxo e colaboradores (2018) as nanopartículas poliméricas são fortes candidatas para o desenvolvimento de aplicações de entrega sistêmica e direcionada de medicamentos. O tamanho das NPs é uma propriedade determinante, uma vez que define as interações das células, a capacidade de carga do princípio ativo e cinética de liberação. Apesar do tamanho das NPs de [AuCl(L₁)] e [Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O serem maiores que 300 nm, como verificado via

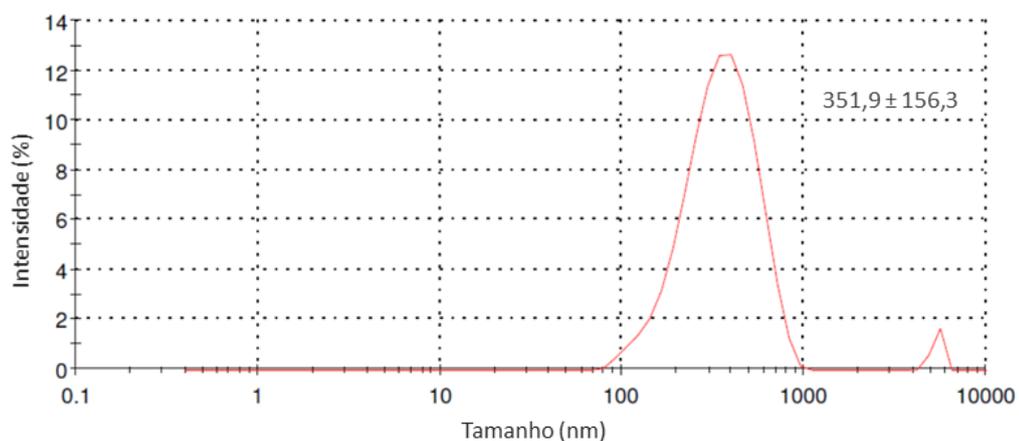
técnica de MEV, isto não é uma problemática uma vez que as NPs produzidas foram administradas via oral, seguindo a recomendação da OMS para o tratamento de doenças negligenciadas. É importante salientar, que embora as NPs de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ possuam um tamanho médio superior às NPs de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ nas análises de microscopia, para aplicações biológicas o importante é o tamanho médio das NPs que compõem o sistema. Neste caso, os resultados obtidos via DLS confirmam que as NPs de $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ possuem uma maior área superficial sendo mais eficazes no processo de liberação controlada como verificado anteriormente no item 4.4.9.

Figura 44 - Micrografia das NPs de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação IV), aumento: 50 kx.



Fonte: Do autor, 2019.

Figura 45 - Curva de polidispersão das NPs/ $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L}_1^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação IV)

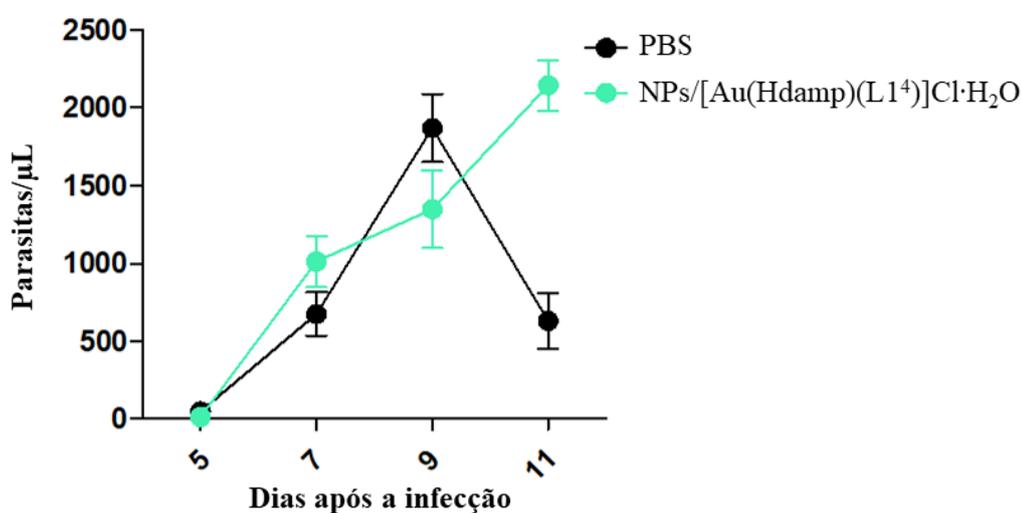


Fonte: Do autor, 2019

4.5 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VIVO*

O ensaio biológico *in vivo* mostrou que quando os camundongos tratados através das NPs/[Au(Hdamp)(L¹⁴)]Cl·H₂O houve um aumento da parasitemia nos animais, ou seja, não houve o efeito esperado. Este aumento ocorre em função da não liberação do princípio ativo da matriz polimérica, uma vez que os parasitas continuaram se replicando no organismo sem a ação tripanocida do complexo tendo como consequência o óbito dos animais. A Figura 46 apresenta o gráfico da quantidade de parasitas em µL de sangue em função do tempo.

Figura 46 - Gráfico da quantidade de parasitas em microlitro de sangue *versus* dias após a infecção

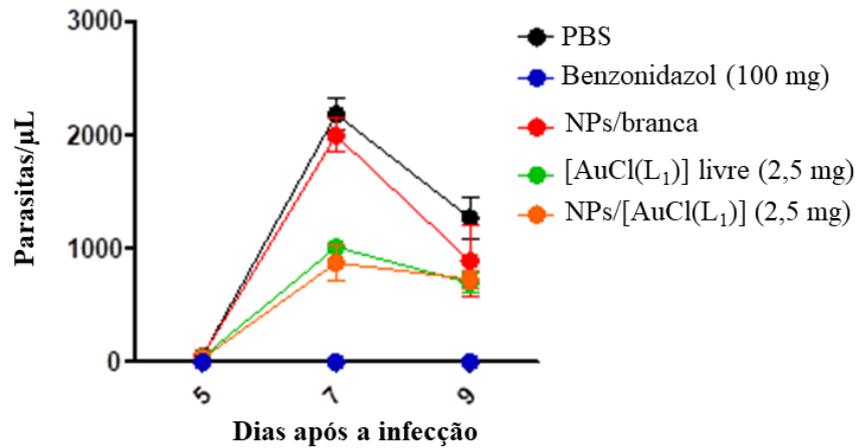


Fonte: Do autor, 2019

O tratamento feito pelas NPs/[AuCl(L₁)] mostrou uma redução de parasitemia de aproximadamente 55 % em comparação ao controle negativo utilizado (PBS), ou seja, o complexo em questão não perdeu atividade após o processo de encapsulamento e foi liberado da matriz polimérica no sistema *in vivo*, o que vai de encontro com os testes de liberação *in vitro*. O sistema NPs/[AuCl(L₁)] mostrou ser mais eficiente em relação ao complexo [AuCl(L₁)] livre, uma vez que a redução da parasitemia do sistema nanoparticulado foi maior do que o composto livre administrado. Outro dado relevante foi a prolongação da sobrevivência dos animais diante das formas de tratamento, sendo de 15 dias para [AuCl(L₁)] livre e 20 dias para NPs/[AuCl(L₁)]. Vale salientar que as doses utilizadas de [AuCl(L₁)] tanto livre quanto no sistema particulado foi cerca de 50 vezes menor que o controle positivo adotado (Benzonidazol). A Figura 47 mostra o gráfico de parasitemia em função do tempo, já a Figura 48 apresenta o gráfico do percentual de sobrevivência dos animais em função do tempo.

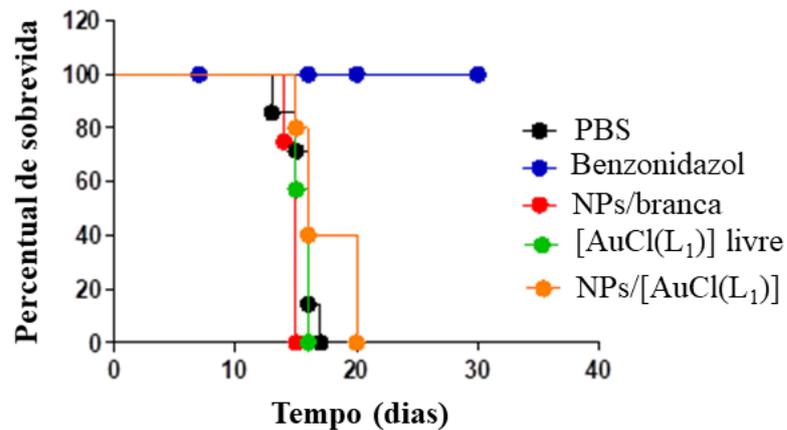
Vale ressaltar que outros experimentos devem ser realizados pelo grupo de pesquisa do professor Sérgio de Albuquerque na USP com a finalidade de se encontrar a dose ideal dos complexos de Au^{III} e sistemas nanoparticulados para reduzir a parasitemia em 100 % sem que haja efeitos tóxicos para os animais.

Figura 47 - Gráfico da quantidade de parasitas por microlitro de sangue em função do tempo



Fonte: Do autor, 2019

Figura 48 - Gráfico do percentual de sobrevivência em função do tempo



Fonte: Do autor, 2019

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a síntese de dois complexos de Au^{III} que são potenciais candidatos para tratamento da doença de Chagas. A partir destes compostos de coordenação foram obtidas nanopartículas dos mesmos em uma matriz polimérica de PLGA para aplicação em camundongos infectados com a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*. Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Os complexos foram obtidos com êxito, cujos dados de caracterização foram comparados aos obtidos anteriormente;
- A partir do método de emulsificação e evaporação de solvente foi possível obter nanopartículas dos complexos com tamanhos, PDI, potencial Zeta adequados para aplicação biológica;
- Através do método de encapsulamento adotado obteve-se altas eficiências de encapsulamento por determinação indireta para ambos os complexos;
- Houve uma diferença de EE(%) por determinação por método direto em relação ao indireto, sendo de quase 40% para [AuCl(L₁)] e aproximadamente de 30% para [Au(Hdamp)(L¹₄)]Cl·H₂O;
- As NPs/[AuCl(L₁)] se mostraram estáveis em suspensão por período próximo a dois meses;
- Não houve alteração nos parâmetros das NPs/[AuCl(L₁)] após processo de liofilização com a presença de crioprotetor, diferentemente das NPs/[Au(Hdamp)(L¹₄)]Cl·H₂O;
- Através do ensaio de liberação *in vitro* das NPs/[AuCl(L₁)] obteve-se uma combinação de mecanismos na liberação do complexo;
- o modelo matemático que mais se ajustou à curva de liberação do [AuCl(L₁)] foi o modelo de Korsmeyer-Peppas;
- Diante das imagens de alta resolução obtidas via MEV, os sistemas nanoparticulados de ambos os complexos produziram nanopartículas esféricas com tamanhos próximos aos obtidos pela análise de DLS;
- Por meio dos ensaios *in vivo* constatou-se uma melhor eficiência do sistema nanoparticulado NPs/[AuCl(L₁)] em relação a administração do complexo livre, assim como uma maior sobrevivência dos camundongos, ao contrário do sistema NPs/[Au(Hdamp)(L¹₄)]Cl·H₂O.

Como perspectivas, pretende-se:

- Analisar a estabilidade das Nps/[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O quanto ao tamanho e potencial Zeta;
- Aplicar outros modelos matemáticos para explicar o perfil de liberação;
- Realizar modificações estruturais na esfera de coordenação do complexo [AuCl(L₁)], assim como caracterizá-los e aplicá-los em ensaio tripanocida *in vitro*;
- A partir dos complexos mais promissores obter nanopartículas dos mesmos através do método de emulsificação e evaporação de solvente;
- Caracterizar os novos sistemas nanoparticulados obtidos, através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, e ensaio de liberação *in vitro*;
- Aplicar e comparar os sistemas nanoparticulados e complexos livres em ensaios tripanocida *in vivo*.

Por meio do trabalho realizado comprovou-se que a estratégia de encapsulamento de compostos bioativos é viável e vantajosa como alternativa no tratamento da doença de Chagas, com destaque para [AuCl(L₁)] onde o sistema nanoparticulado obtido com este princípio ativo apresentou melhores resultados do que quando o composto administrado na forma livre. Deste modo, o presente trabalho mostrou que a nanotecnologia pode ser usada como uma ferramenta relevante para o aprimoramento da ação de compostos bioativos com potencial para uso no tratamento da doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em 10 set. 2018.
- ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradable and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Release Reviews**, v.28, n. 1, p. 5-24, 1997.
- ARSENJEVIC, M.; VOLAREVIC, V.; MILOVANOVIC, M.; KANJEVAC, T. Cytotoxicity of gold(III) complexes on A549 human lung carcinoma epithelial cell line. **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 2-8, 2012.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BARRIOS, A. M.; COHEN, S. M.; LIM, M. H. Medicinal inorganic chemistry: a web themed issue. **Chemical Communications**, v. 49, p. 5910-5911, 2013.
- BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. de P.; BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, v. 30, p. 2062-2067, 2007.
- BERNERS-PRICE, S. J.; FILIPOVSKA, A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. **Metallomics**, v. 3, p. 863-873, 2011.
- BERTRAND, B.; CASINI, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 4209-4219, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 1ªed, v. 3, cap. 8, p. 484. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017.
- BRENER, Z. Observations on immunity to superinfections in mice experimentally inoculated with *Trypanosoma cruzi* and subjected to treatment. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 119-123, 1962.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 236-242, 2012.
- CARNEIRO, Z. A.; MAIA, P. I. da S.; SESTI-COSTA, R.; LOPES, C. D.; PEREIRA, T. A.; MILANEZI, C. M. SILVA, M. A. P. da.; LOPEZ, R. F. V.; SILVA, J. S.; DEFLON, V. M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of H₂bdtc-loaded solid lipid nanoparticles. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 8, n. 5, p. 1-9, 2014.

CASTRO, S. L. de.; SOEIRO, M. de. N. Estudos pré-clínicos da doença de Chagas. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, jul. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/tratamento/#>>. Acesso em: 10 set. 2018.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. de. A.; SILVA, C. M. G. da.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R. de.; RODRIGUES, A. P. R. Intracellular cryoprotectant agentes: characteristics and use of ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, n. 2, 2011.

CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 309-310, 1999.

CHAVES, L. L.; LIMA, S. A. C.; VIEIRA, A. C. C.; BARREIROS, L.; SEGUNDO, M. A.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; REIS, S. Development of PLGA nanoparticles loaded with clofazimine for oral delivery: Assessment of formulation variables and intestinal permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 28-37, 2018.

CHASTEIGNER, S. de.; CAVÉ, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Freeze-drying of itraconazole loaded nanosphere suspensions: A feasibility study. **Drug Development Research**. v. 38, p. 116-124, 1996.

CLAYTON, J. Chagas Disease 101. **Nature**, p. 4-5, 2010.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; COSTA, T. D.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547-2565, 2007.

DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Delivery of vanillin by poly(lactic-acid) nanoparticles: Development, characterization and *in vitro* evaluation of antioxidant activity. **Materials Science and Engineering C**. v. 62, p. 1-8, 2016.

DHULE, S. S.; PENFORMIS, P.; FRAZIER, T.; WALKER, R.; FELDMAN, J.; TAN, G.; HE, J.; ALB, A.; JOHN, V.; POCHAMPALLY, R. Curcumin-loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 8. p. 440-451, 2012.

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

Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDI). Disponível em: <<https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>>. Acesso em 10 set. 2018.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, 2009.

FARIA, D. M.; JÚNIOR, S. M. D.; NASCIMENTO, J. P. L. do.; NUNES, E. da. S.; MARQUES, R. P.; ROSSINO, L. S.; MORETO, J. A. Development and evaluation of a controlled release system of TBH herbicide using alginate microparticles. **Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 225-235, 2017.

FERRAZ, K. S. O.; SILVA, J. G. D.; COSTA, F. M.; MENDES, B. M.; RODRIGUES, B. L.; DOS SANTOS, R. G.; BERALDO, H. *N*(4)-Tolyl-2-acetylpyridine thiosemicarbazones and their platinum (II, IV) and gold(III) complexes: cytotoxicity against human glioma cells and studies on the mode of action. **Biometals**, v. 26, n. 5, p. 677-691, 2013.

FONTEH, P. N.; KETER, F. K.; MEYER, D. New bis(thiosemicarbazone) gold(III) complexes inhibit HIV replication at cytostatic concentrations: Potential for incorporation into virostatic cocktails. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 9, p. 1173-1180, 2011.

FRICKER, S. P. Medical uses of gold compounds: past, present and future. **Gold Bulletin**, v. 29, n. 2, 1996.

GONÇALVES, A. C. R.; CARNEIRO, Z. A.; OLIVEIRA, C. G.; DANUELLO, A.; GUERRA, W.; OLIVEIRA, R. J. FERREIRA, F. B.; SILVA, L. L. W. V.; BATISTA, F. A. H.; BORGES, J. C.; ALBUQUERQUE, S. de.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. S. Pt^{II}, Pd^{II} and Au^{III} complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 141, p. 615-631, 2017.

GONZALEZ-MARTIN, G.; MERINO, I.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. N.; TORRES, M.; NUÑEZ, R.; OSUNA, A. Characterization and trypanocidal activity of nifurtimox containing and empty nanoparticles of polyethylcyanoacrylates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 50, n. 1, p. 29-35, 1998.

GUPTA, R. B.; KOMPPELLA, U. B. Nanoparticles Technology for Drug Delivery. 1^a edição, New York: Taylor & Francis, v. 159, 2006.

HOSSEINI, S M.; HOSSEINI, H.; MOHAMMADIFAR, M. A.; GERMAN, J. B.; MORTAZAVIAN, A. M.; MOHAMMDI, A.; KHOSRAVI-DARANI, K. SHOJAEE-ALIABADI, S.; KHAKSAR, R. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 573-580, 2014.

ILARI, A.; BAIOTTO, P.; MESSORI, L.; FIORILLO, A.; BOFFI, A.; GRAMICCIA, M.; MUCCIO, T. D.; COLOTTI, G. A gold-containing grid against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of thiothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. **Amino Acids**, v. 42, p. 803-811, 2011.

JURBERG, J.; RODRIGUES, J. M. S.; MOREIRA, F. F. F.; DALE, C.; CORDEIRO, I. R. S.; JUNIOR, V. D. L.; GALVÃO, C.; ROCHA, D. S. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2014.

KIM, S.; NG, W. K.; DONG, Y.; DAS, S.; TAN, R. B. H. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 37-42, 2012.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids Surf B**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

LIOTOP. Disponível em: <<http://www.liotop.com.br/o-que-e-liofilizacao/>>. Acesso em 10 set. 2018.

LIPPARD, S. J. Metals in Medicine. In: BERTINI, I.; GRAY, H. B.; LIPPARD, S. J.; VALENTINE, J. S. **Bioinorganic Chemistry**. Mill Valley: University Science Books. Capítulo 9, p. 505-580, 1994.

MAIA, P. I. da. S.; FERNANDES, A. G. de. A.; SILVA, J. J. N.; ANDRICCOPULO, A. D.; LEMOS, S. S.; LANG, E. S.; ABRAM, U.; DEFLON, V. M. Dithiocarbamate complexes with the $[M(PPh_3)]^{2+}$ (M= Pd or Pt) moiety Synthesis, characterization and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 104. P. 1276-1282, 2010.

MAIA, P. I. da. S.; NGUYEN, H. H.; PONADER, D.; HAGENBACH, A.; BERGEMANN, S.; GUST, R.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Neutral gold complexes with tridentate SNS thiosemicarbazide ligands. **Inorganic Chemistry**. v. 51, p. 1604-1613, 2012.

MAIA, P. I. da. S.; NGUYEN, H. H.; HAGENBACH, A.; BERGEMANN, S.; GUST, R.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Rhenium mixed-ligand complexes with S,N,S-tridentate thiosemicarbazone/thiosemicarbazide ligands. **Dalton Transactions**, v. 42, p. 5111-5121, 2013.

MAIA, P. I. S. da.; CARNEIRO, Z. A.; LOPES, C. D.; OLIVEIRA, C. G.; SILVA, J. S.; ALBUQUERQUE, S. de. HAGENBACH, A.; GUST, R.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Organometallic gold(III) complexes with hybrid SNS-donating thiosemicarbazone ligands: cytotoxicity and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 1, 2017.

MAIA, P. I. S.; DEFLON, V. M.; ABRAM, U. Gold(III) complexes in medicinal chemistry. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 13, p. 1515-1536, 2014.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377-1397, 2011.

MALVERN PANALYTICAL. **Zeta Potential**. Disponível em: <<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/zeta-potential>>. Acesso em: 06 jun. 2018.

MALVERN PANALYTICAL. **Zeta deviation larger than the mean – how can that be?** Disponível em: <<http://www.materials-talks.com/blog/2015/09/24/zeta-deviation-larger-than-the-mean-how-can-that-be/>>, Acesso em: 07 jul. 2018.

MANCHANDA, R.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, A.; NAGESSETTI, A.; MCGORON, A. J. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 75, p. 260-267, 2010.

MARENGO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 19, n.3, p. 239-245, 2006.

MENDONZA-MUNOZ, N.; ALCALÁ-ALCALÁ, S.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation of Polymer nanoparticles by the emulsification-solvent evaporation method: from Vanderhoff's pioneer approach recent adaptations. p. 87-121, 2016. Livro: Polymer nanoparticles for nanomedices, Springer.

MISHRA, P. R.; SHAAL, L. A.; MULLER, R. H.; KECK, C. M. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 371, p. 182-189, 2009.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.

NAKAJIMA, A. Accumulation of gold by microorganisms. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 369-374, 2003.

NAVARRO, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 1619-1626, 2009.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. Metal-based drugs for malária, trypanosomiasis and leishmaniasis: recente achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23/24, p. 1070-1078, 2010.

NOBILI, S.; MINI, E.; LANDINI, I.; GABBIANI, C.; CASINI, A.; MESSORI, L. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, n. 3, p. 550-580, 2009.

OLIVEIRA, C. G.; MAIA, P. I. da. S.; SOUZA, P. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; VIANA, R. B.; BATISTA A. A.; NASCIMENTO, O. R.; DEFLON, V. M. Manganese (II) complexes with thiosemicarbazones as potential anti-*Mycobacterium tuberculosis* agents. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, p. 21-29, 2014.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULKARNI, R. M. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 7, p. 827-840, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia**. 4^a ed. São Paulo, 2012.

PETHERICK, A. Chagas disease in the Chaco: Country by Country. **Nature** v. 465, p. 18-20, 2010.

PIASSI, L. M.; CORCINI, C. A.; PANZARDI, A.; JUNIOR, A. S. V.; JUNIOR, T. L.; DESCHAMPS, J. C. Efeito de crioprotetores impermeáveis sobre a viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de camundongos (*Mus musculus*) das linhagens Swiss-Albina e Balb/c. **Ciência Animal Brasileira**. v. 10, n. 4, p. 1161-1170, 2009.

POOLE, J.P.; OWENS, F.J. Introduction to Nanotechnology. Ed. Wiley-Interscience, New Jersey, 2003.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RETTONDIN, A. R.; CARNEIRO, Z. A.; GONÇALVES, A. C. R.; FERREIRA, V. F.; OLIVEIRA, C. G.; LIMA, A. N.; OLIVEIRA, R. J.; ALBUQUERQUE, S. de.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. S. Gold(III) complexes with *ONS*-Tridentate thiosemicarbazones: Toward selective trypanocidal drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 120, p. 217-226, 2016.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SAEZ, A.; GUZMAN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, n. 3, p. 379-387, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. de L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 727-737, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 7ª ed, 2010.

SIMONE, G. S. de. Metabolismo do *Trypanosoma cruzi*. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, jun. 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/bioquimica/>>. Acesso em: 10 set. 2018.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir da polimerização de monômeros – Parte I. Polímeros.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados – Parte II. **Polímeros**, v.22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SWARNAKAR, K. N.; JAIN, K. A.; SINGH, P. R.; GODUGU, C.; DAS, M.; JAIN, S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles. **Biomaterials**. v. 32, p. 6860-6874, 2011.

TAHGHIGHI, A. Importance of metals complexes for development of potential leishmanicidal agents. **Journal of Organometallic Chemistry**, p. 51-60, 2014.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **Journal Control Release**. v. 134, n. 1, p. 35-40, 2009.

TAVEIRA, S. F.; ARAÚJO, L. M.; DE SANTANA, D. C.; NOMIZO, A.; DE FREITAS, L. A.; LOPEZ, R. F. V. Development of cationic solid lipid nanoparticles with factorial design-based studies for topical administration of doxorubicin. **Journal Biomedical of Nanotechnology**. v. 8, n. 2, p. 219-228, 2012.

TAVEIRA, S. F.; DE SANTANA, D. C. A. S.; ARAÚJO, L. M. P. C.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. V. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 10, p. 1382-1390, 2014.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G. de.; FARIA, A. R. de.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. de. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate drug delivery systems**. New York: Informa Healthcare, v. 166, 2007.

VALVERDE, R. **Doenças negligenciadas**, 2013. Disponível em:
<<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>> Acesso em: 10 set. 2018.

VANDERHOFF, J. W.; EL AASSER, M. S.; UGELSTAD, J. Polymer emulsification process. US Patent, v. 4, p.177, p. 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **What is Chagas disease?** Disponível em:
<<http://www.who.int/chagas/disease/en/>>. Acesso em 10 set. 2018.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE IV

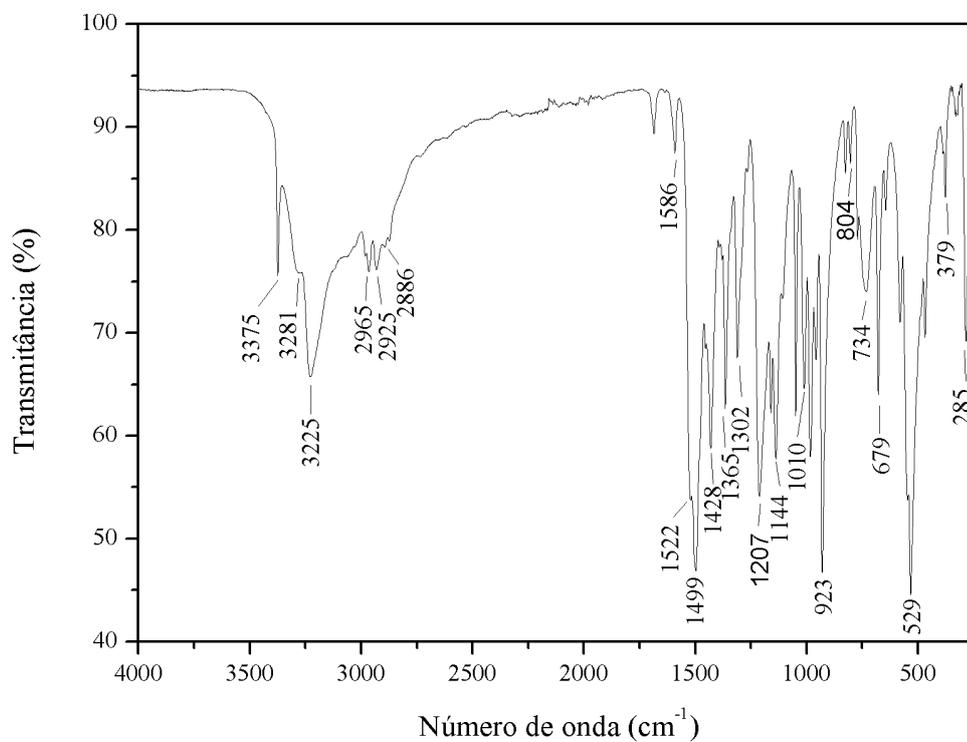
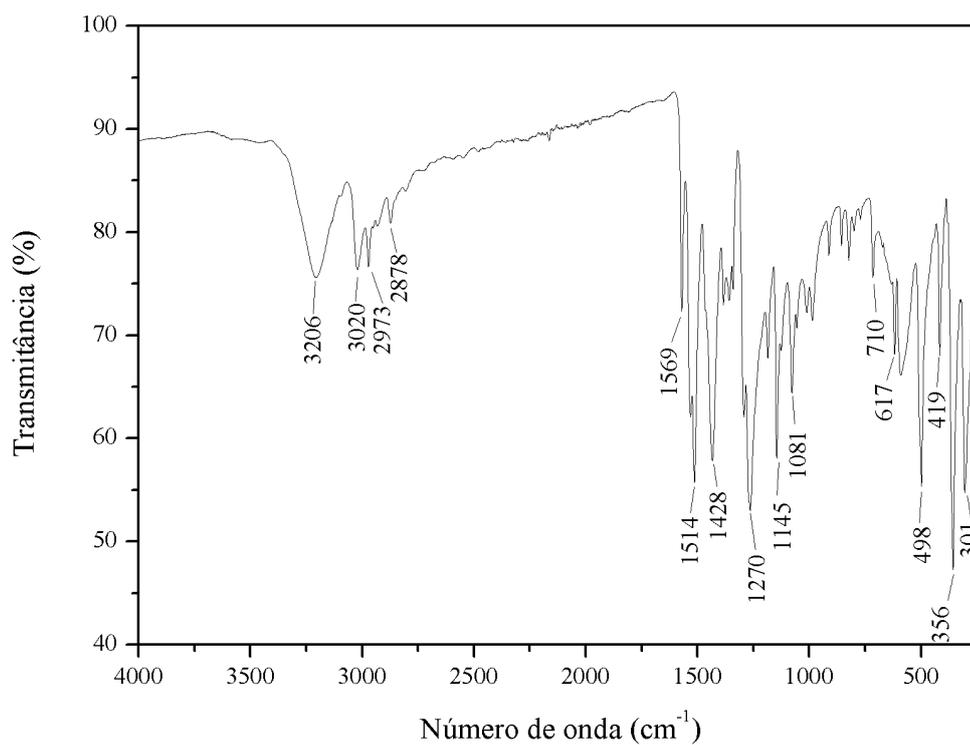
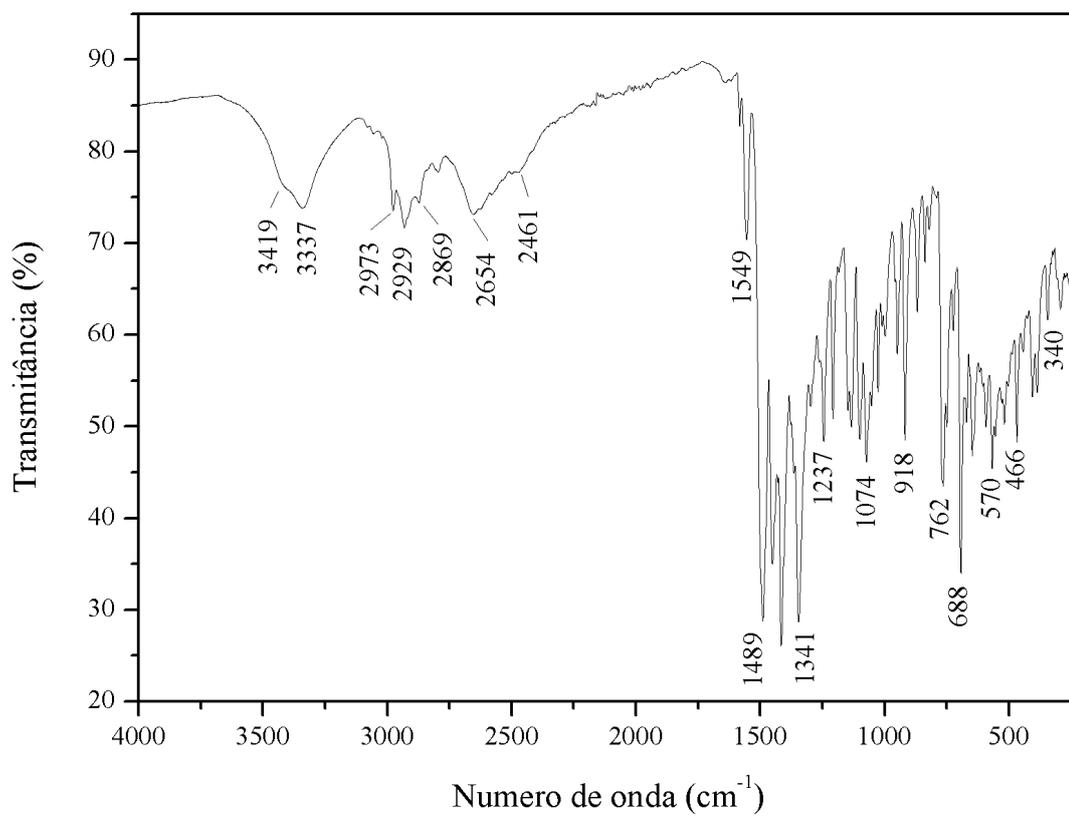
Figura 49 - Espectro de absorção na região do infravermelho de H_2L_1 em ATR (cm^{-1})**Figura 50** - Espectro de absorção na região do infravermelho de $[AuCl(L_1)]$ em ATR (cm^{-1})

Figura 51 - Espectro de absorção na região do infravermelho de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ em ATR (cm^{-1})



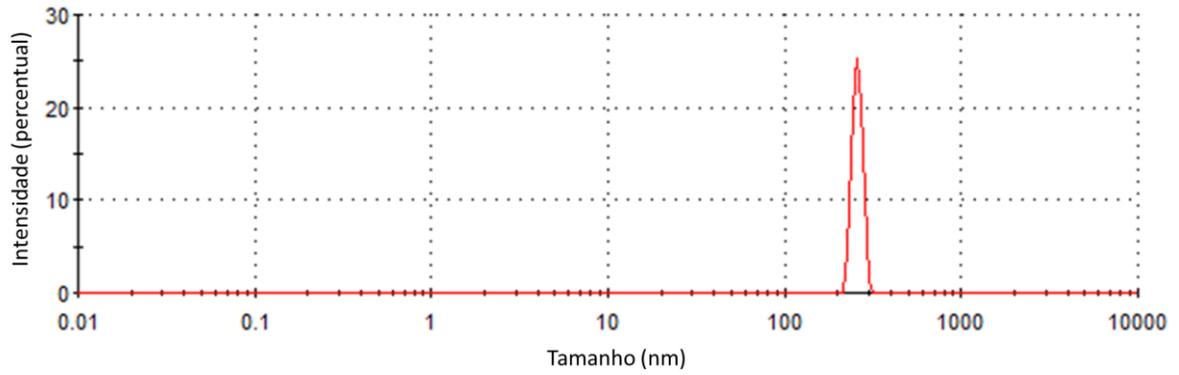
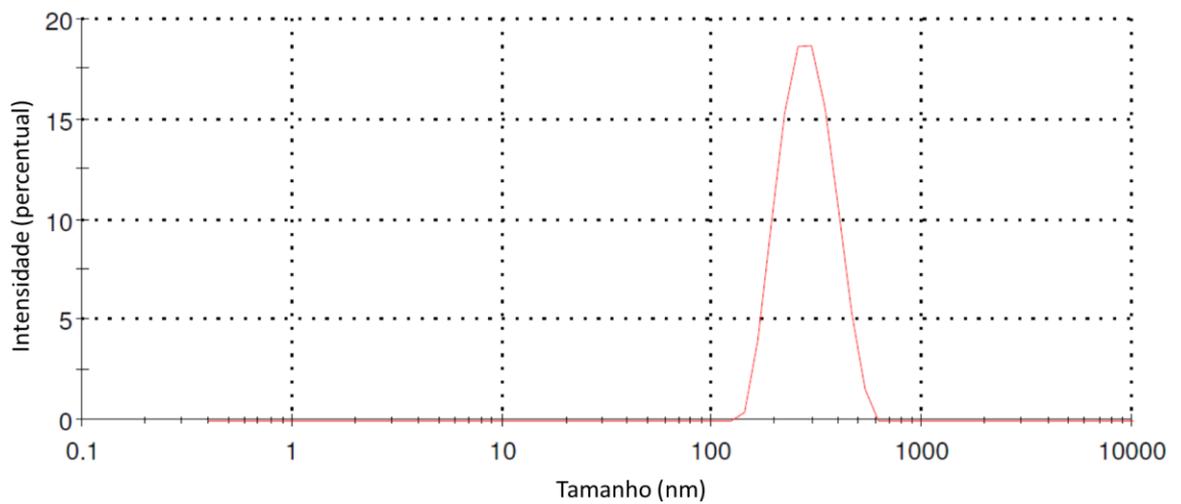
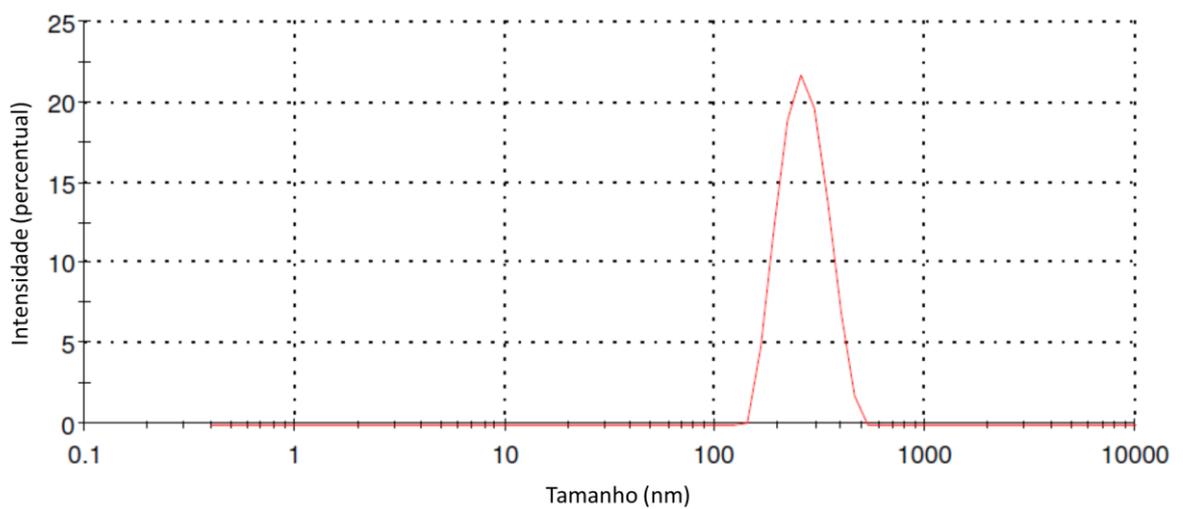
APÊNDICE B - CURVAS DE POLIDISPERSÃO**Figura 52** - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação I)**Figura 53** - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação II)**Figura 54** - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação III)

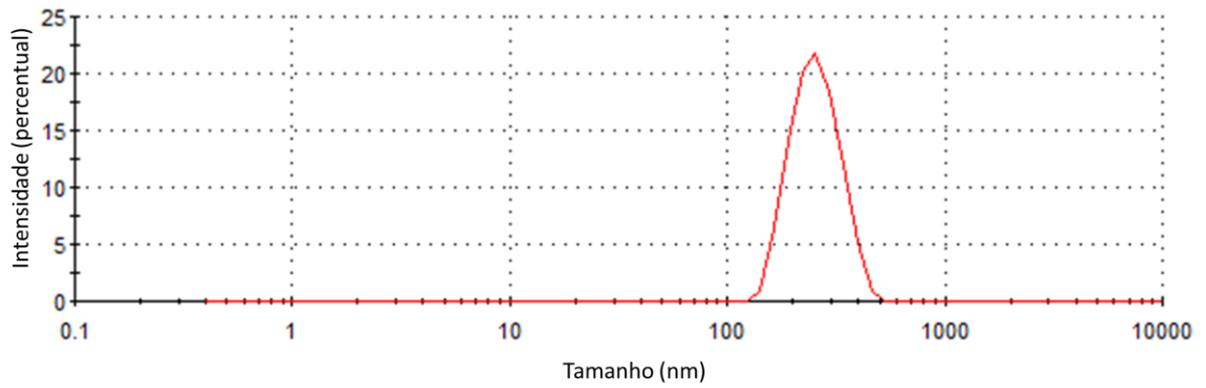
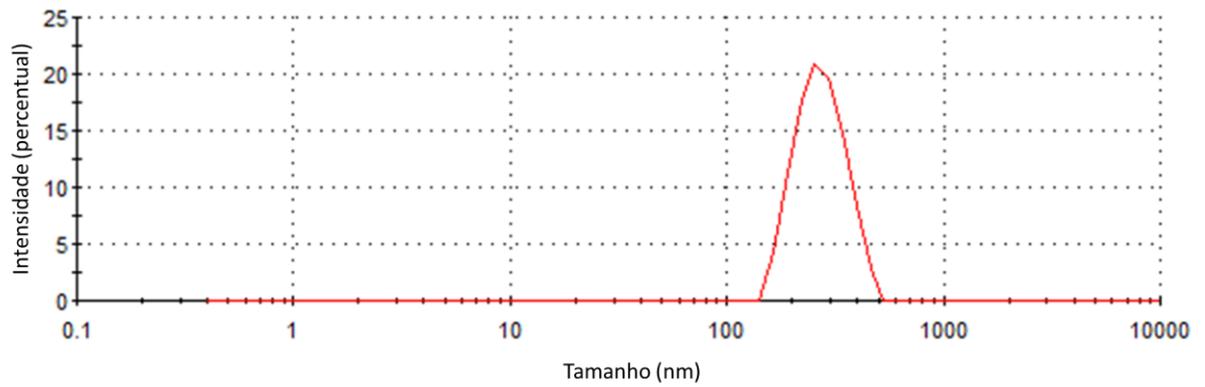
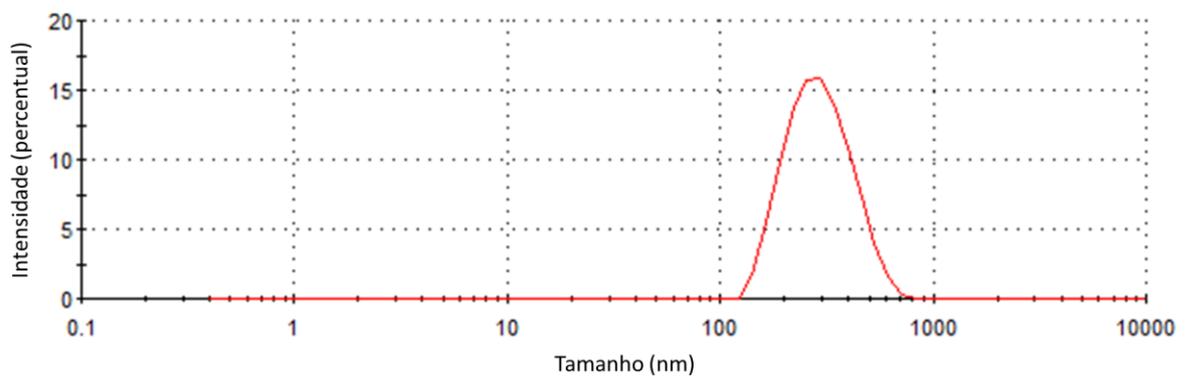
Figura 55 - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação IV)**Figura 56** - Curva de polidispersão das NPs/branca (Formulação V)**Figura 57** - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação I)

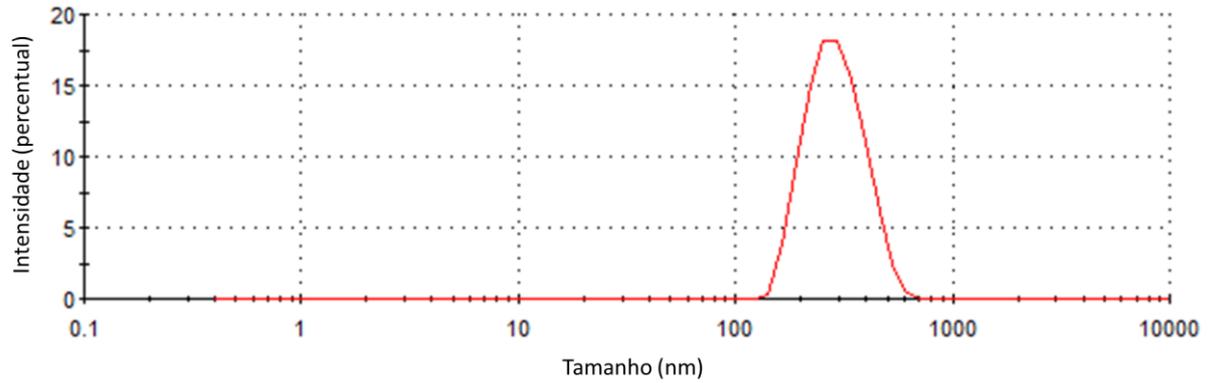
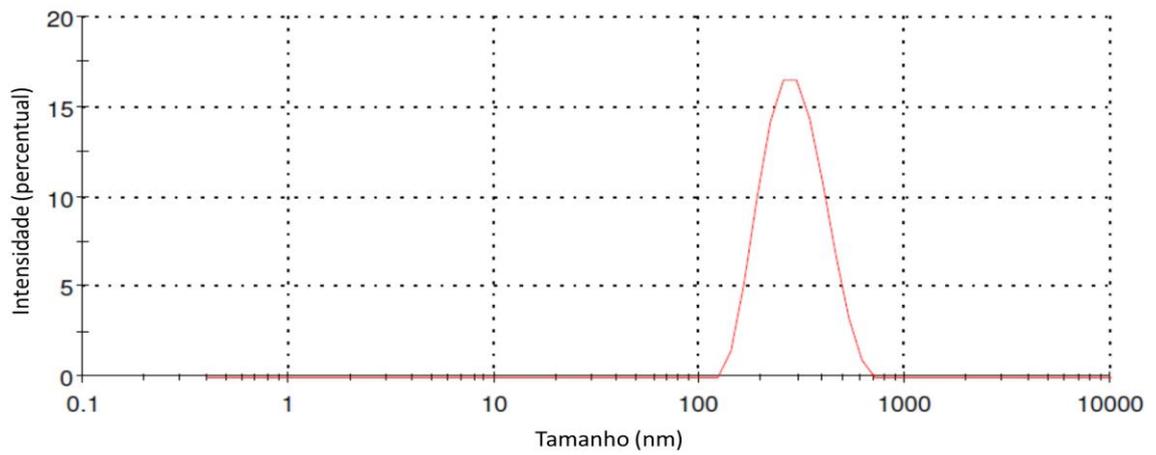
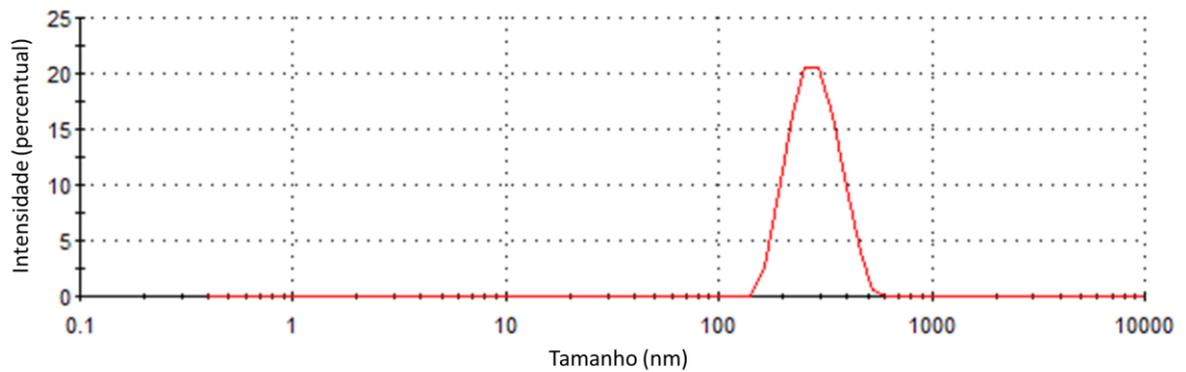
Figura 58 - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação II)**Figura 59** - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação III)**Figura 60** - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação IV)

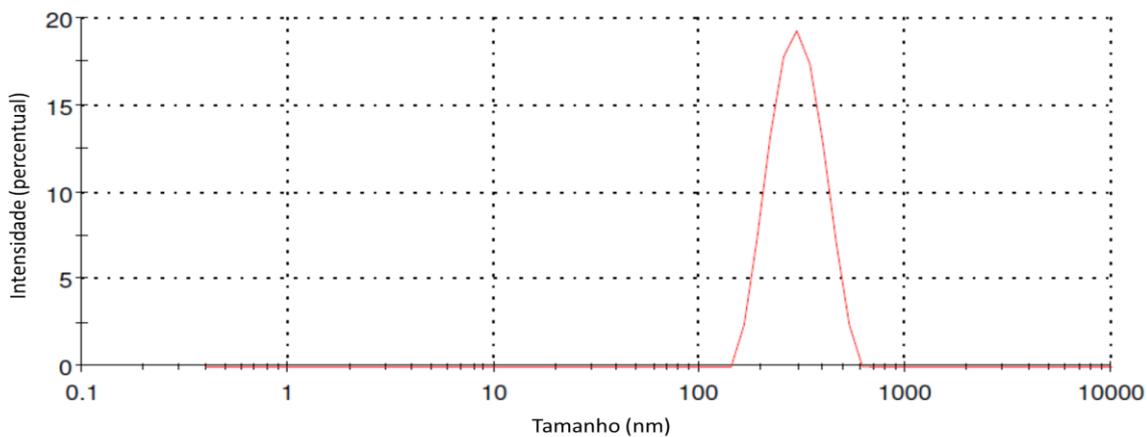
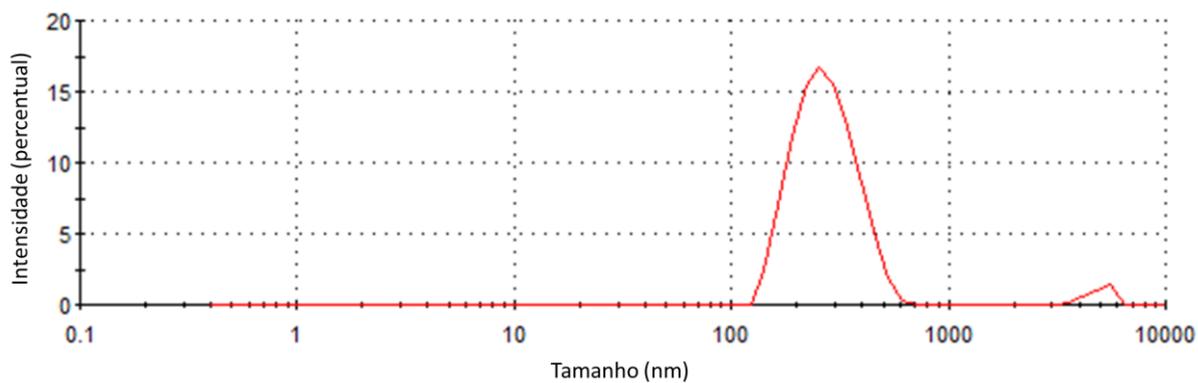
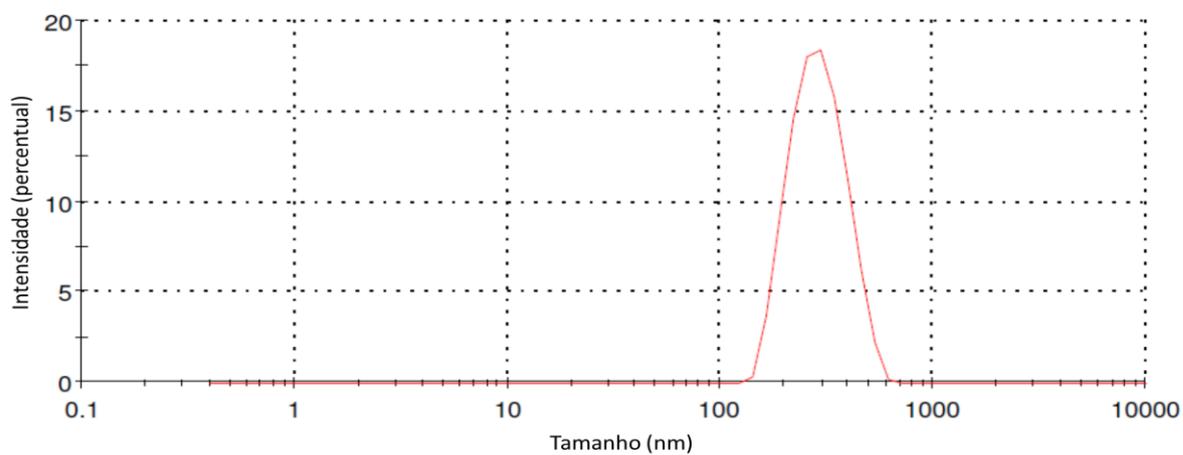
Figura 61 - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação V)**Figura 62** - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação VI)**Figura 63** - Curva de polidispersão das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação VII)

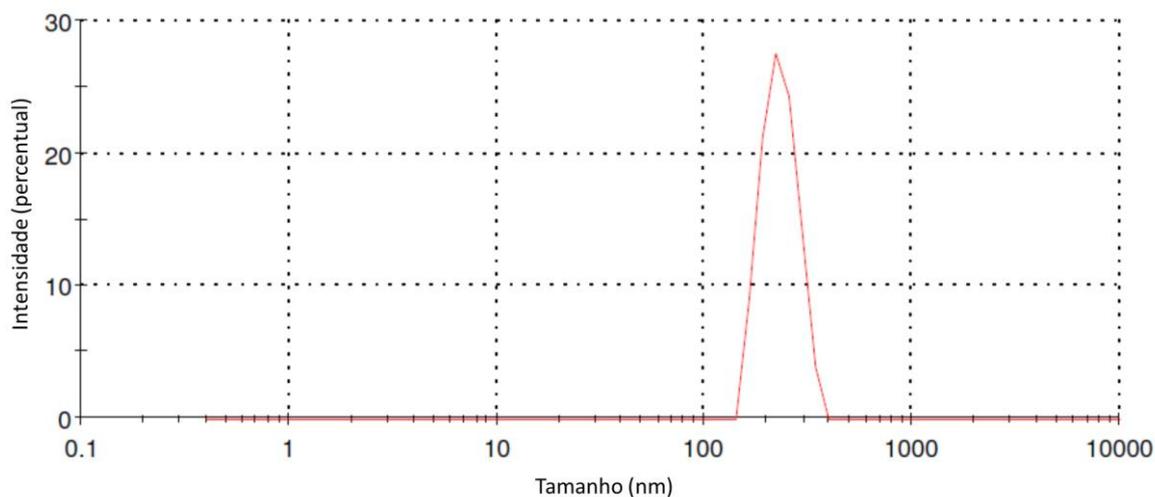
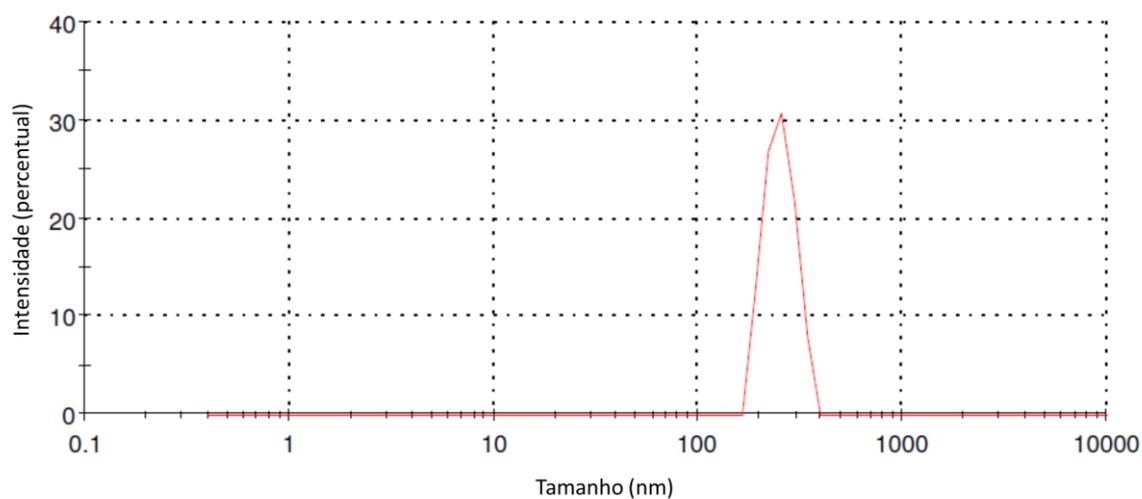
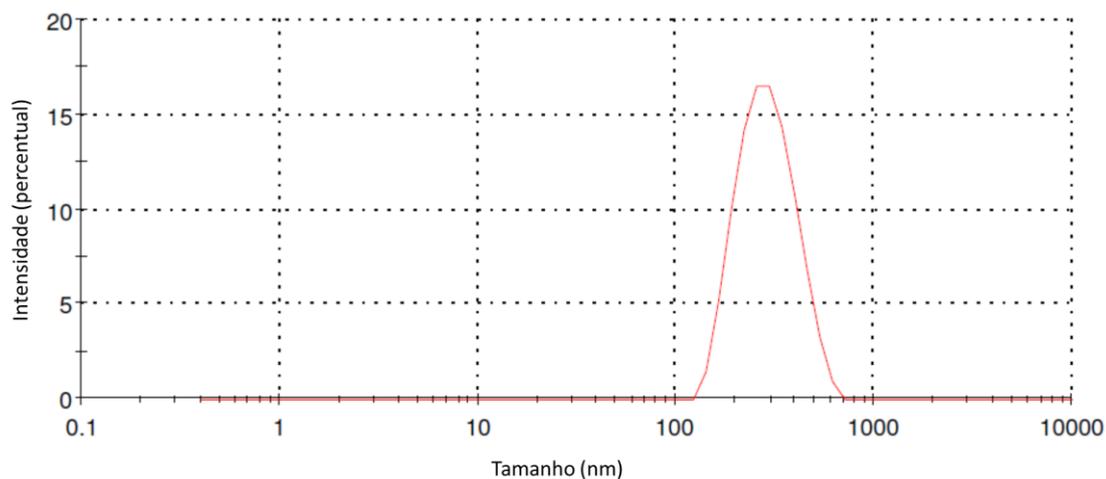
Figura 64 - Curva de polidispersão das NPs/ de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação I)**Figura 65** - Curva de polidispersão das NPs/ de $[\text{Au}(\text{Hdamp})(\text{L1}^4)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Formulação II)**Figura 66** - Curva de polidispersão NPs/ $[\text{AuCl}(\text{L}_1)]$ da formulação III (estabilidade inicial)

Figura 67 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade após 15 dias)

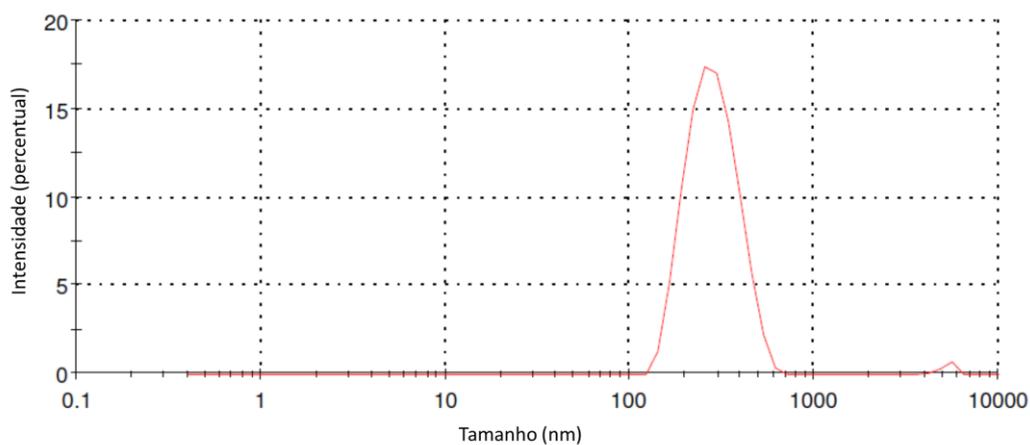


Figura 68 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade após 38 dias)

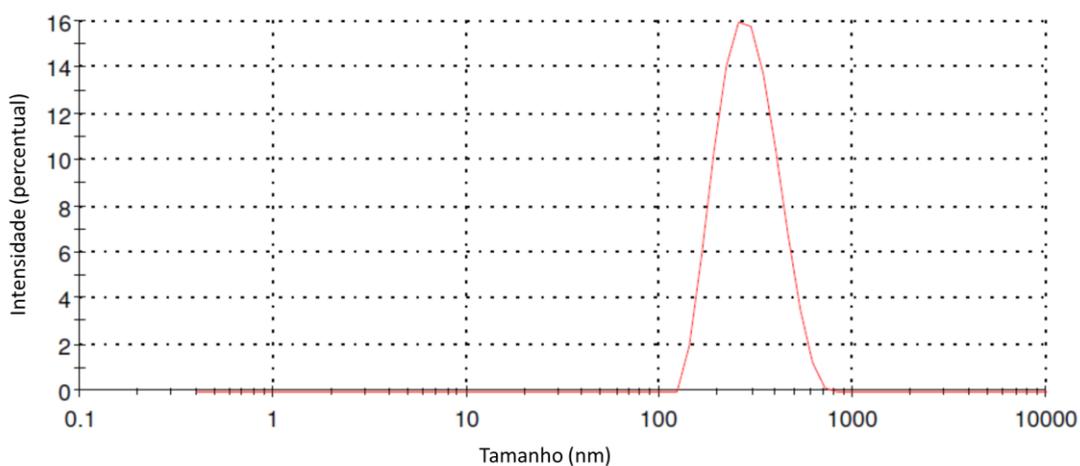


Figura 69 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade após 59 dias)

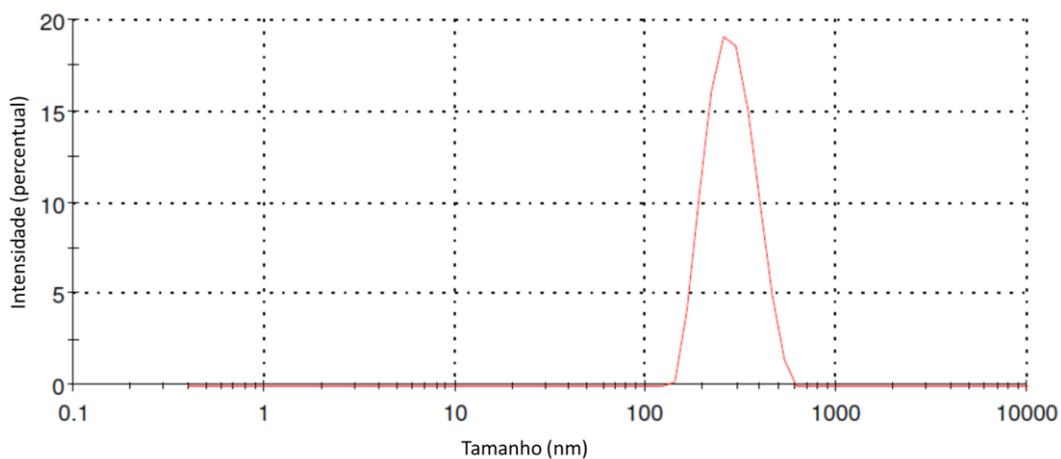


Figura 70 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L₁)] da formulação II liofilizada sem crioprotetor

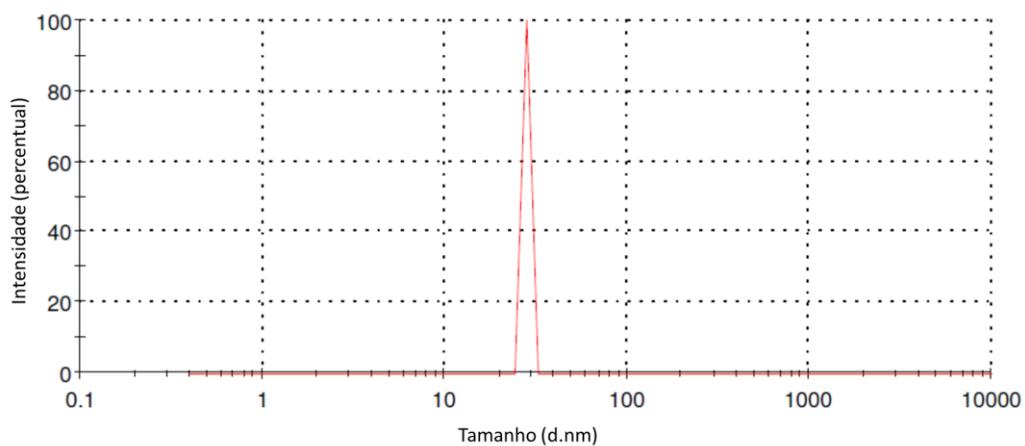


Figura 71 - Curva de polidispersão NPs/[AuCl(L₁)] da formulação V liofilizada com crioprotetor

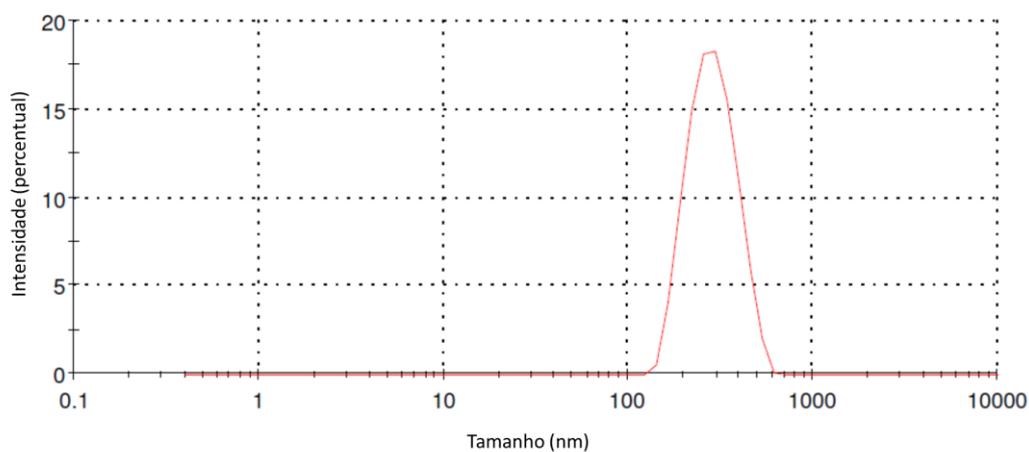
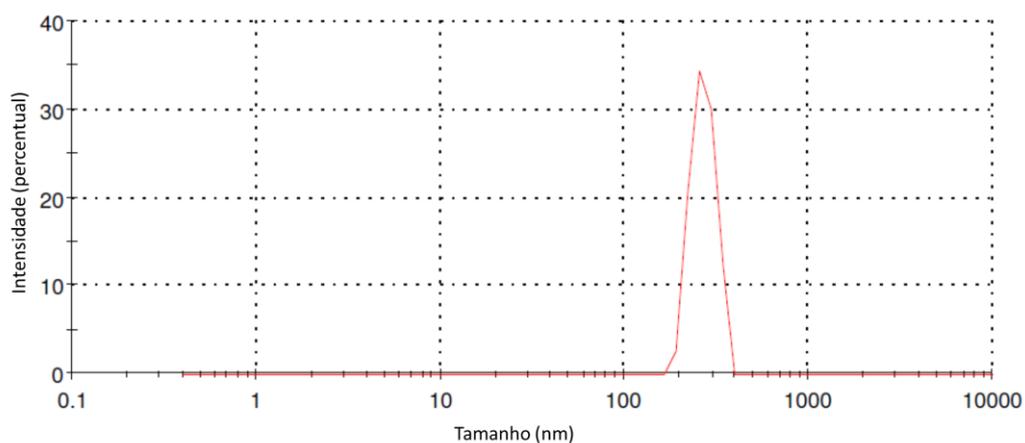


Figura 72 - Curva de polidispersão NPs/[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O da formulação I liofilizada com crioprotetor



APÊNDICE C – MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA

Figura 73 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação I)

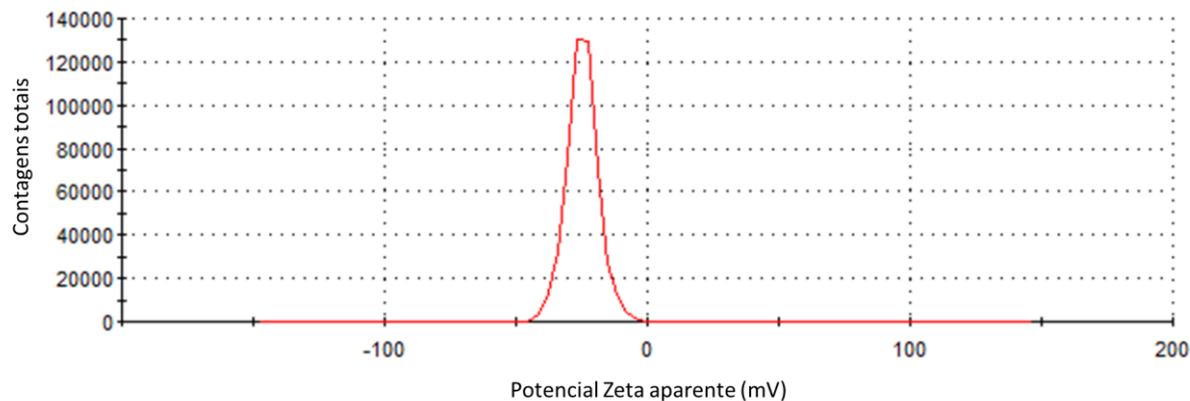


Figura 74 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação II)

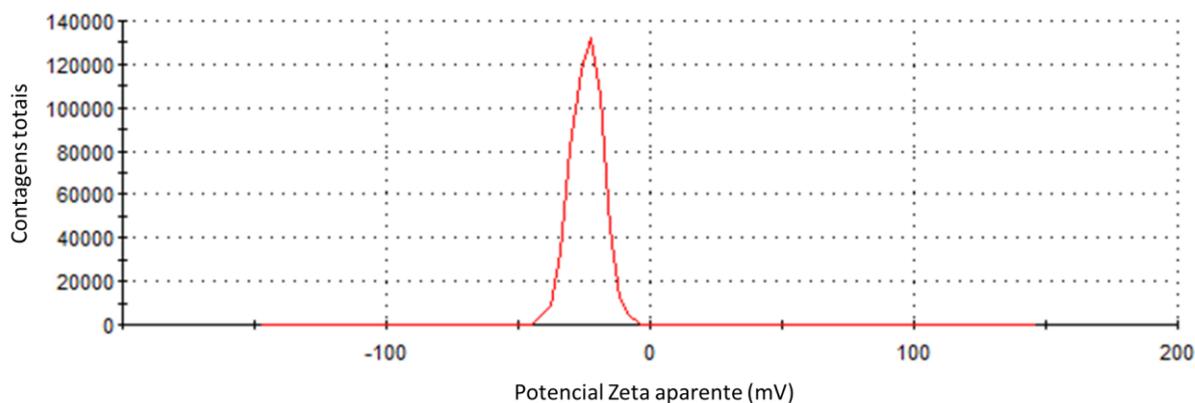


Figura 75 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação III)

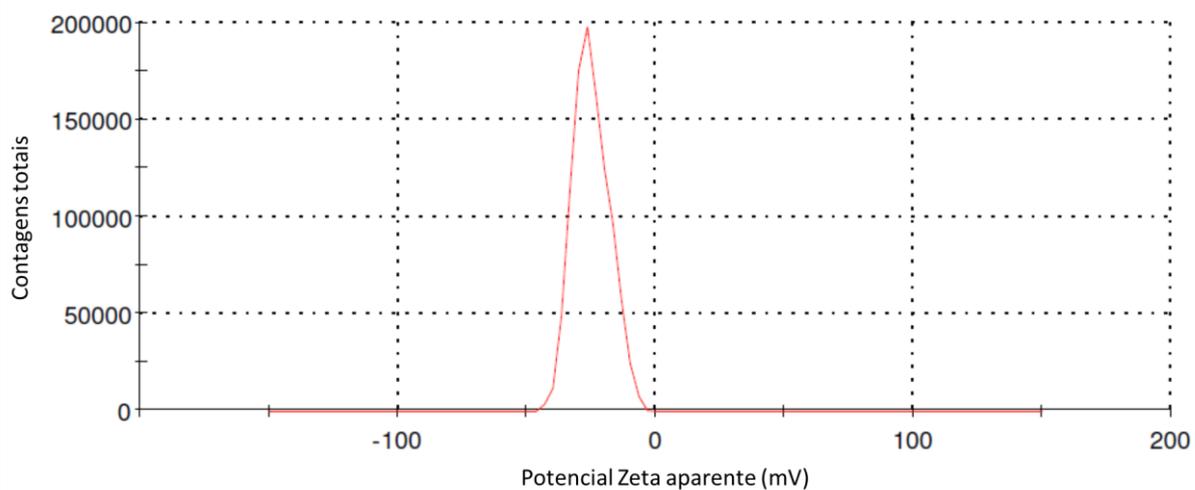


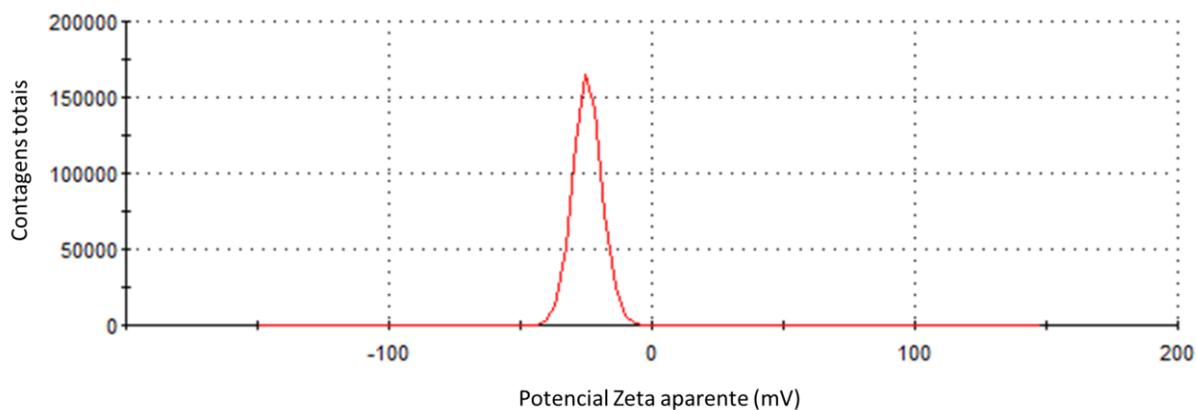
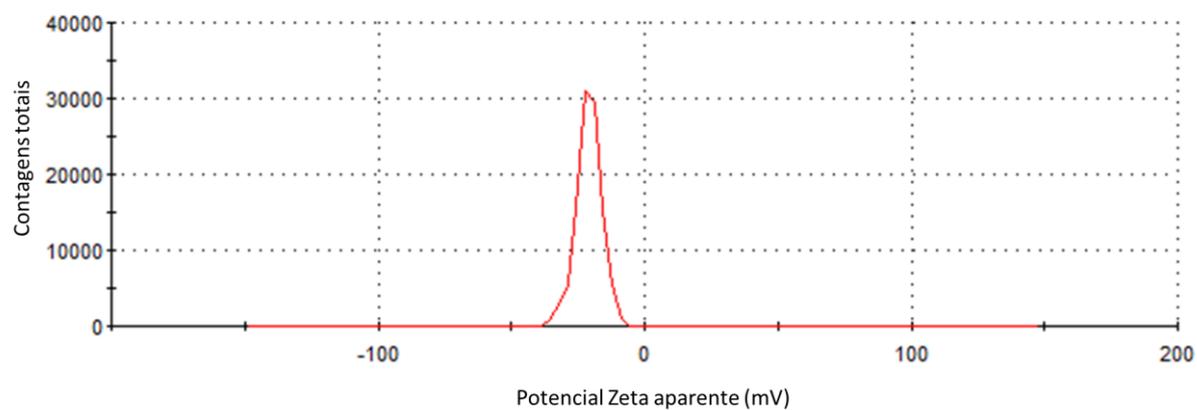
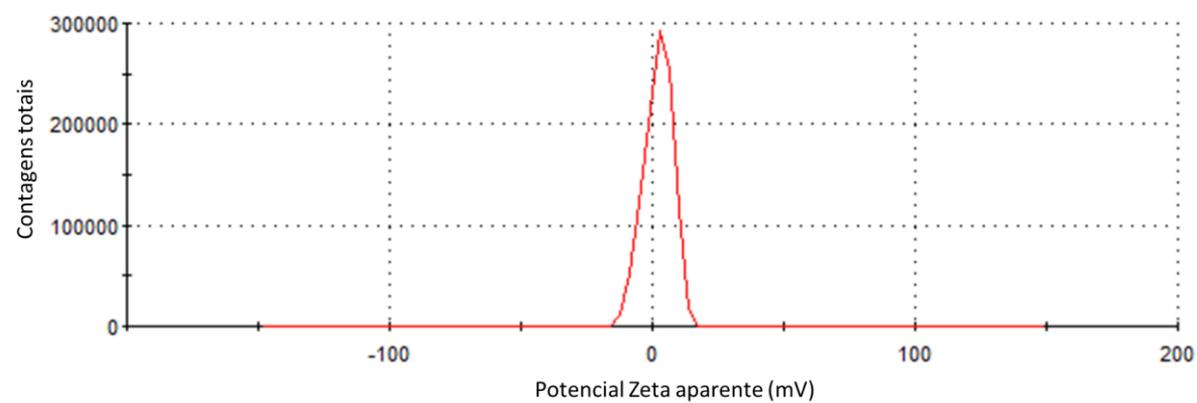
Figura 76 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação IV)**Figura 77** - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/branca (Formulação V)**Figura 78** - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação I)

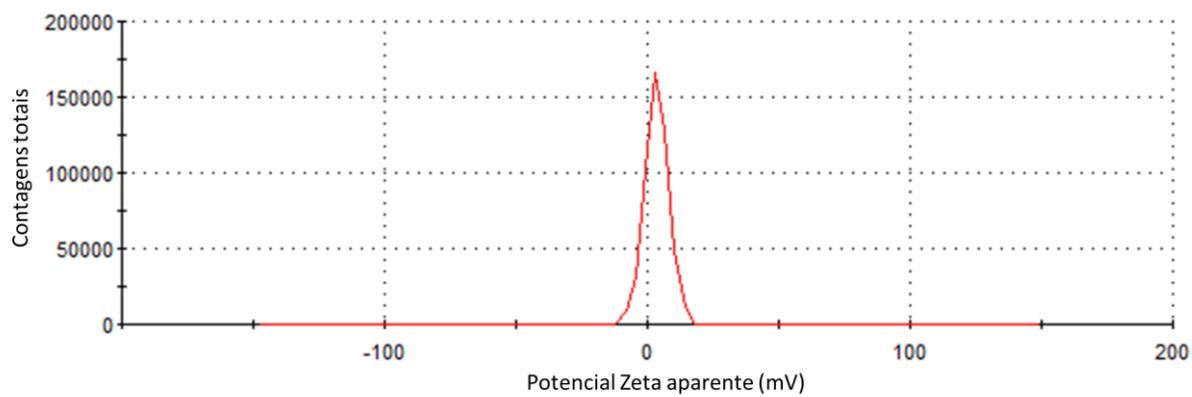
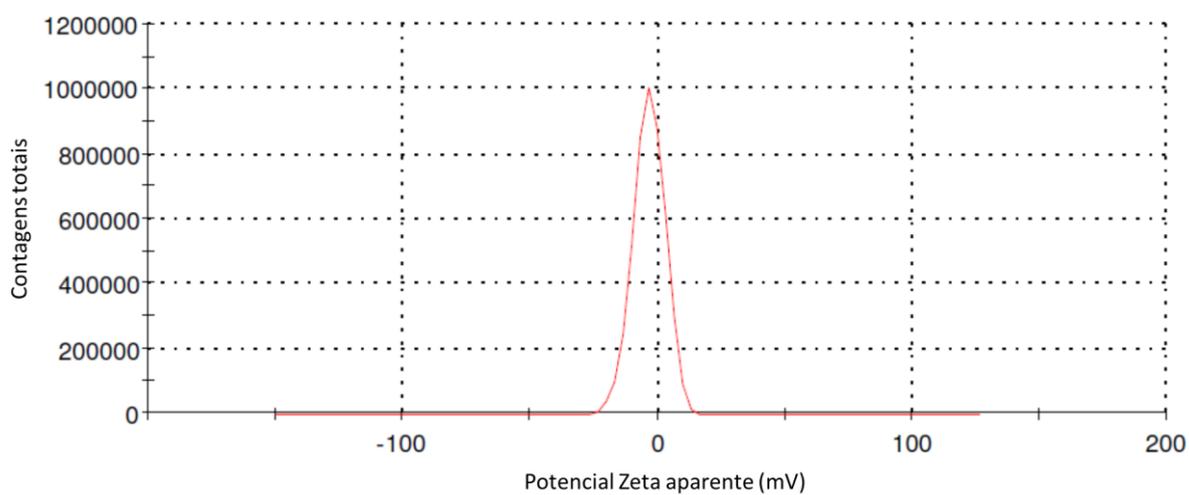
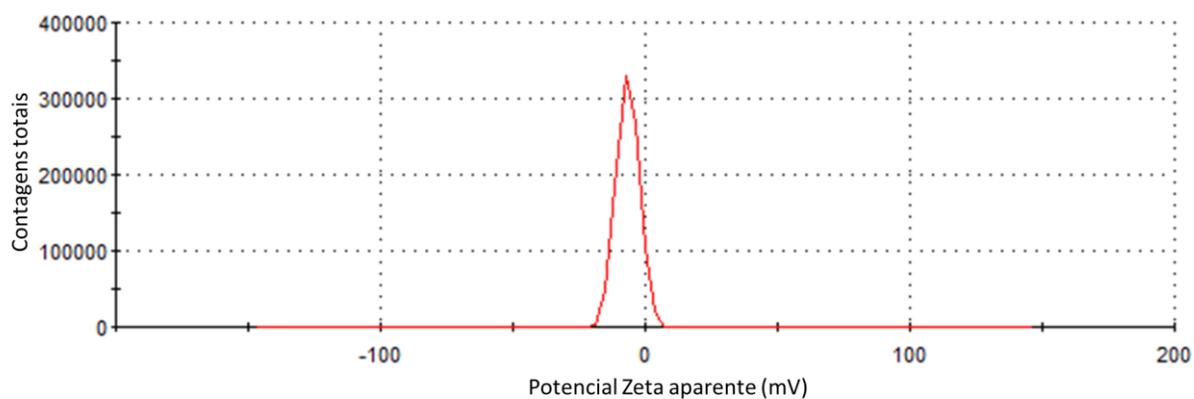
Figura 79 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação II)**Figura 80** - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação III)**Figura 81** - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação IV)

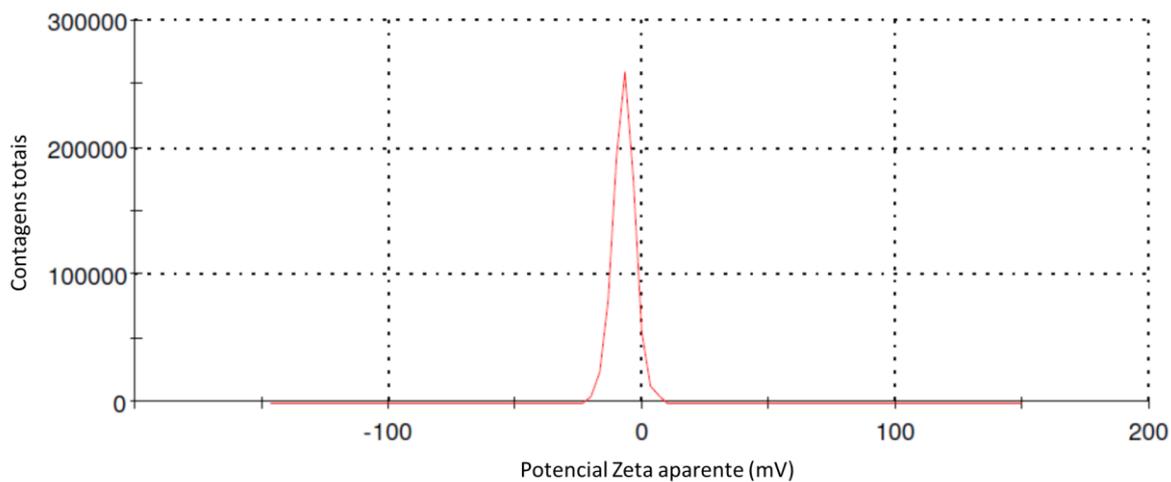
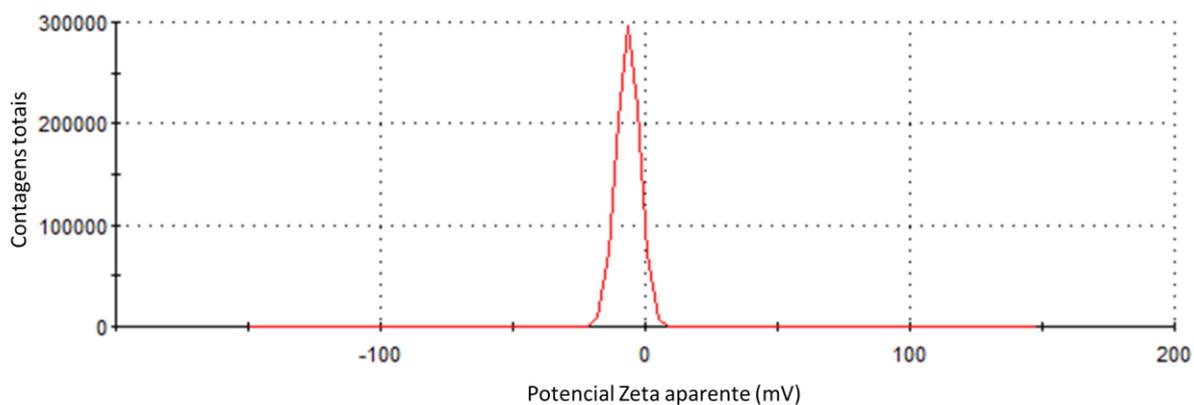
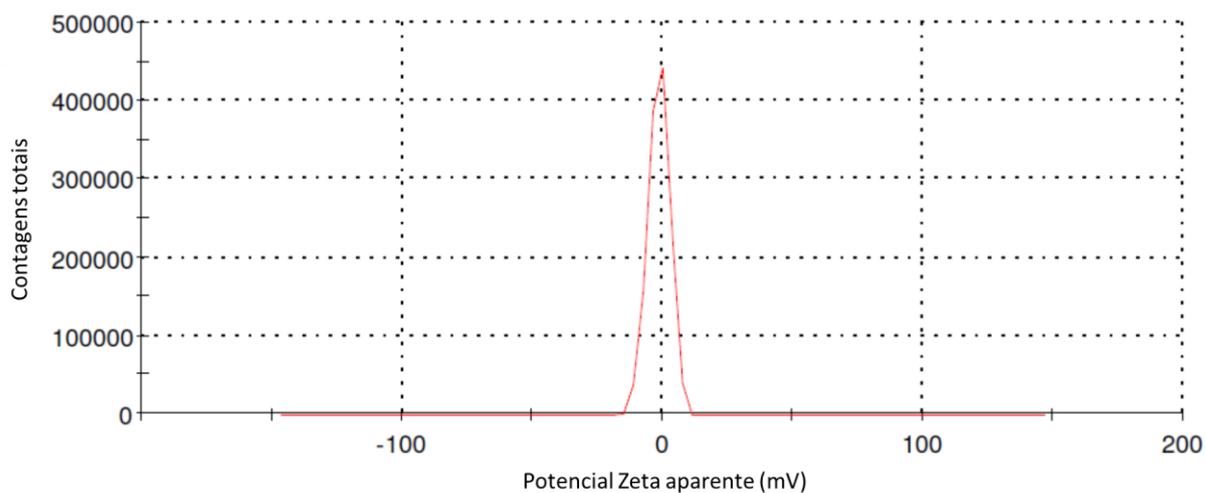
Figura 82 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação V)**Figura 83** - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação VI)**Figura 84** - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] (Formulação VII)

Figura 85 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O (Formulação I)

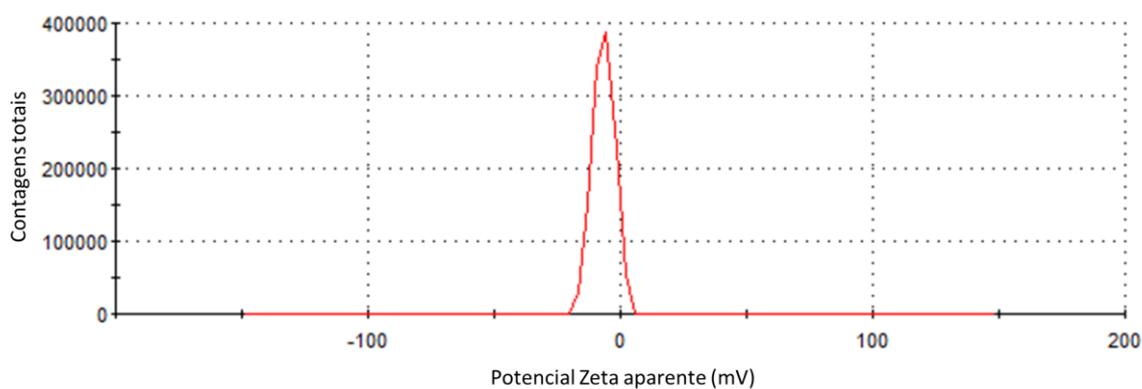


Figura 86 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[Au(Hdamp)(L1⁴)]Cl·H₂O (Formulação II)

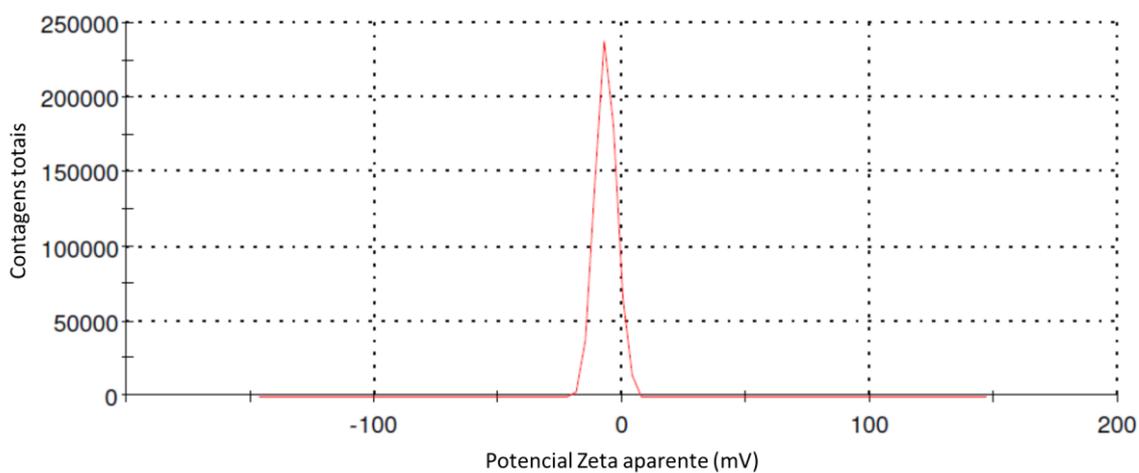


Figura 87 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade inicial)

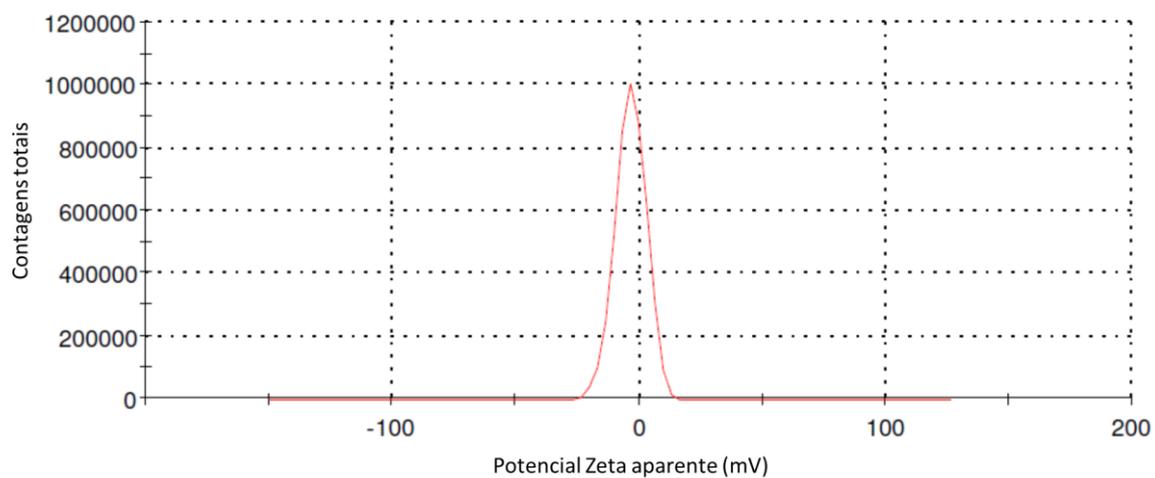


Figura 88 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade após 15 dias)

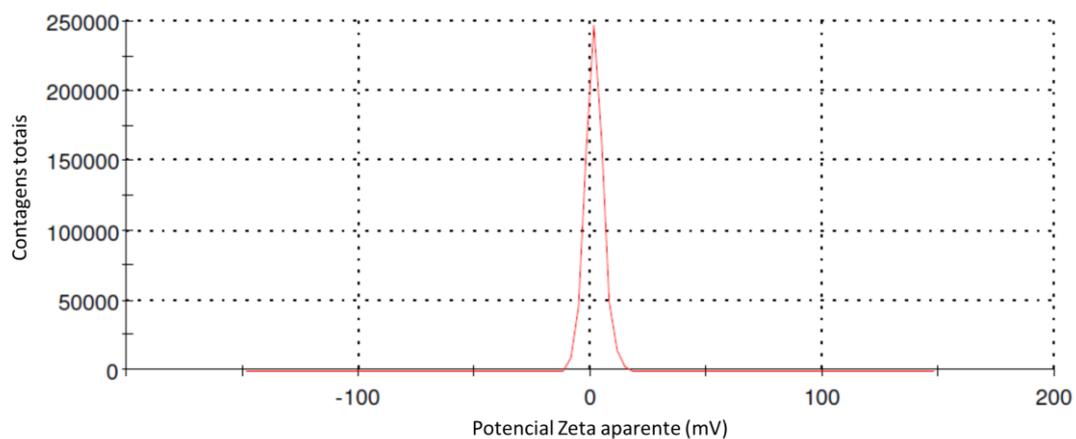


Figura 89 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade após 38 dias)

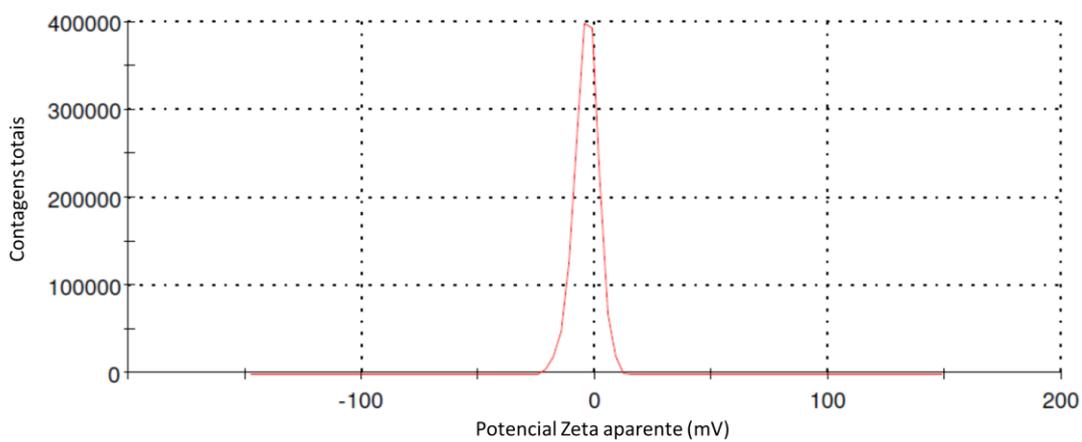


Figura 90 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] da formulação III (estabilidade após 59 dias)

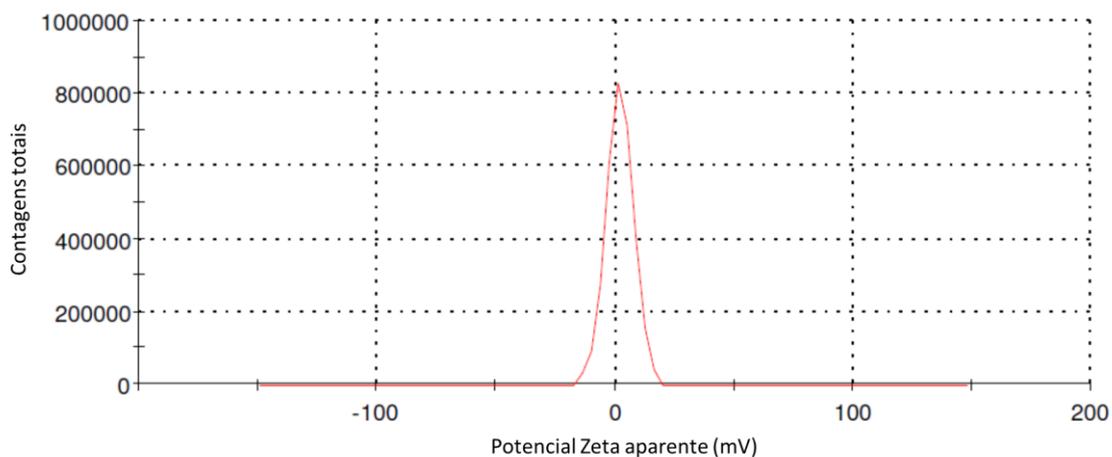


Figura 91 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] da formulação II liofilizada sem crioprotetor

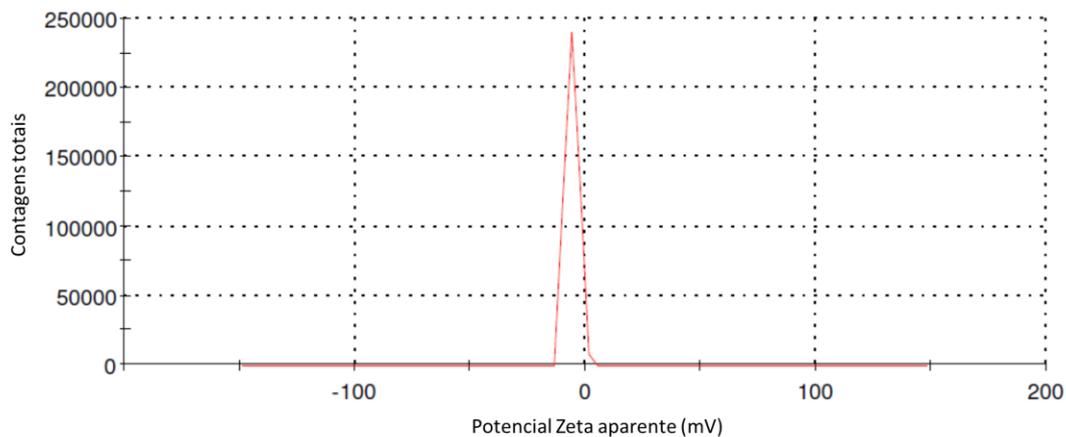


Figura 92 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[AuCl(L₁)] da formulação V liofilizada com crioprotetor

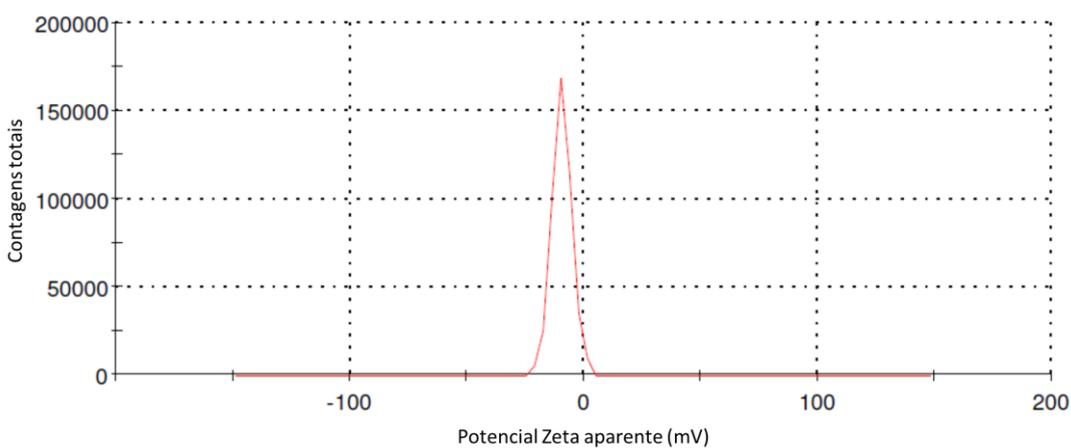


Figura 93 - Medida de potencial Zeta (mV) das NPs/[Au(Hdamp)(L₁⁴)]Cl·H₂O da formulação I liofilizada com crioprotetor

