



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GLEIDSON IGOR ZANETTI FIGUEIREDO

COMPLEXOS DO TIPO HOSPEDEIRO-CONVIDADO A BASE DE
CICLODEXTRINAS COM PROMISSORA ATIVIDADE anti-
Trypanosoma cruzi.

RIO DE JANEIRO
2024

GLEIDSON IGOR ZANETTI FIGUEIREDO

**COMPLEXOS DO TIPO HOSPEDEIRO-CONVIDADO A BASE DE
CICLODEXTRINAS COM PROMISSORA ATIVIDADE anti-*Trypanosoma cruzi*.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadores:

Prof. Dr. Luiz Fernando Brum Malta

Prof. Dr. Camilo Henrique da Silva Lima

**RIO DE JANEIRO
2024**

CIP - Catalogação na Publicação

F475c Figueiredo, Gleidson Igor Zanetti
Complexos do tipo hospedeiro-convidado a
base de ciclodextrinas com promissora atividade
anti Trypanosoma cruzi. / Gleidson Igor Zanetti
Figueiredo. -- Rio de Janeiro, 2024.
130 f.

Orientador: Luiz Fernando Brum Malta.
Coorientador: Camilo Henrique da Silva
Lima.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa
de Pós Graduação em Química, 2024.

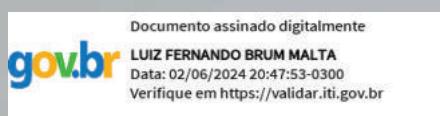
1. Doença de Chagas. 2. Chalconas. 3. Cumarinas.
4. Ciclodextrinas. 5. Compostos de inclusão. I.
Malta, Luiz Fernando Brum, orient. II. Lima,
Camilo Henrique da Silva, coorient. III. Título.

Complexos do tipo hospedeiro-convidado a base de ciclodextrinas com promissora atividade anti-*Trypanosoma cruzi*.

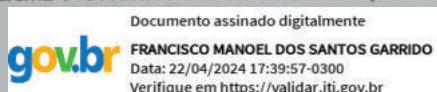
GLEIDSON IGOR ZANETTI FIGUEIREDO

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM QUÍMICA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (QUÍMICA) PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.

Banca examinadora



Prof. Dr. Luiz Fernando Brum Malta, IQ-DQI/UFRJ.



Prof. Dr. Francisco Manoel dos Santos Garrido, IQ-DQI/UFRJ.

Alexandre C. Silvino

Prof. Dr. Alexandre Carneiro Silvino, IMA-UFRJ

Luzineide W. Tinoco

Profa. Dra. Luzineide Wanderley Tinoco, IPPN-UFRJ

Rafael Alves Allão Cassaro

Prof. Dr. Rafael Alves Allão Cassaro, IQ-DQI/UFRJ

Aprovada em 12 de Abril de 2024

Dedico este trabalho a minha família:
Minha esposa Marcelle e aos meus
bebês Adonai e Soninha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me trazer até o presente momento.

Agradeço aos meus pais pela criação, carinho e apoio que sempre deram. Por sempre cofiarem em mim ao longo de todo esse caminho.

Agradeço a minha esposa Marcelle, há 16 anos me acompanhando e me apoiando com muito amor.

Agradeço aos meus orientadores Luiz e Camilo, sempre muito solícitos em ajudar, corrigir, conversar e principalmente apoiar em todos os momentos dessa tese.

Agradeço a todos os amigos que fizeram ou fazem parte do grupo LQSS como Vitor, Vitor Alexandre, Luiz Diego, Caio, Luiz Phelipe, Luiz Henrique, Juliana e Maria Eduarda que também apoiaram e ajudaram de alguma forma para esse trabalho final.

Agradeço ao amigo Felipe (phéphis) do lab 641, ao amigo Wallace (batatão) companhia certa na escrita desse trabalho. Aos amigos Duardin, Joel, Daniel, Dudu, Victor Feudal, Iguinho, João Bet, Teninho entre outros que sempre estiveram juntos de alguma forma.

Agradeço aos amigos de Fluminensismo Fatinha, Mari, Sarmento, Kadu e Vilson por tantos momentos juntos imprescindíveis para este trabalho ser feito.

Agradeço aos amigos do pauper que já fazem parte do meu convívio e também foram parte importante para a conclusão desse trabalho.

Agradeço a professora Jaqueline e ao instituto de química da UERJ pelas análises cedidas.

Ao programa de pós-graduação em Química (PGQU) deixo meu agradecimento tanto a professores como aos funcionários, principalmente Marcelo e Luciana sempre dispostos a resolver os problemas trazidos por mim.

A CAPES por todo apoio financeiro.

*“Conseguimos
Conseguir é o fato de quem desejar
Mas pra isso é preciso perseguir
Procurar”*

*Conseguimos
E o que é seu sei que ninguém pode tirar
Mas precisa fé em si, fé em Deus
Vamos lá*

*Vamos de galope, de galope
Pra poder chegar
Vamos de galope, de galope
Sobre o verbo amar*

*Vamos de galope, de galope
Pra poder chegar
Vamos de galope, de galope
Sobre o verbo amar”*

Os Trapalhões em: Os Trapalhões e o mágico de Oroz

RESUMO

No presente trabalho, foram obtidos complexos do tipo hospedeiro-convidado utilizando as ciclodextrinas hidroxipropil alfa, beta e gama (HpaCD; HpBCD; HpyCD) para o encapsulamento de duas moléculas distintas, uma chalcona (CHC) e uma cumarina (PCUM) modificadas almejando testar as suas atividades anti *Trypanossoma cruzi*. A complexação com ciclodextrinas foi adotada devido à baixa solubilidade em água dessas moléculas, representando então uma abordagem de liberação controlada contra a doença de Chagas. Foram obtidos complexos entre CHC:HpBCD e foram utilizadas três rotas diferentes: liofilização, método mecanoquímico e calcinação. Os ensaios de RMN de hidrogênio comprovaram a inclusão de CHC em HpBCD em solução e forneceram a constante de associação do complexo, que está em torno de 60. A análise termodiferencial e a espectroscopia no infravermelho evidenciaram a formação de um complexo de CHC com HpBCD em estado sólido para o método mecanoquímico e a calcinação. Ensaios biológicos foram realizados para os complexos entre CHC e HpBCD e demonstraram que o complexo obtido via calcinação apresentou atividade antiparasitária contra o *T. cruzi*, tendo como vantagem uma melhor solubilidade em água e requerendo menor quantidade em massa de CHC para atuar. Os complexos entre ciclodextrinas e PCUM foram produzidos via liofilização e pelo método mecanoquímico e foram obtidos 3 complexos distintos envolvendo as ciclodextrinas alfa, beta e gama hidroxipropiladas. As análises por espectrometria de massas ESI apontaram para a formação do complexo apenas para a alfa-ciclodextrina. A análise termodiferencial apontou para a formação dos complexos com alfa e beta-ciclodextrina via método mecanoquímico por 12h. Assim foi demonstrado um melhor encapsulamento pela HpaCD.

Palavras-chave: Doença de Chagas; chalconas; Cumárias; Ciclodextrinas; Compostos de inclusão

ABSTRACT

In the present study, host-guest complexes were obtained using hydroxypropyl alpha, beta, and gamma cyclodextrins (HpaCD; HpBCD; HpyCD) for the encapsulation of two distinct molecules, a modified chalcone (CHC) and a modified coumarin (PCUM), aiming to test their anti-*T. cruzi* activities. Complexation with cyclodextrins was adopted due to the low water solubility of these molecules, representing a controlled release approach against Chagas disease. The CHC:HpBCD complexes were obtained through three different routes: lyophilization, mechanochemical method, and calcination. ¹H NMR assays confirmed the inclusion of CHC in HpBCD in solution and provided the association constant of the complex, which is around 60. Differential thermal analysis and infrared spectroscopy evidenced the formation of a solid-state CHC complex with HpBCD for the mechanochemical method and calcination. Biological assays were performed for the complexes between CHC and HpbCD and demonstrated that the complex obtained via calcination showed antiparasitic activity against *T. cruzi*, with the advantage of better water solubility and requiring a lower mass quantity of CHC to act. Complexes between cyclodextrins and PCUM were produced via lyophilization and the mechanochemical method, resulting in 3 distinct complexes involving hydroxypropyl alpha, beta, and gamma cyclodextrins. Electrospray ionization mass spectrometry analyses indicated the formation of the complex only for alpha-cyclodextrin. Differential thermal analysis pointed to the formation of complexes with alpha and beta-cyclodextrin via the mechanochemical method for 12 hours. Thus, better encapsulation by HpaCD was demonstrated.

Keywords: Chagas disease; chalcone; oumarin; Cyclodextrins, inclusion compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- aCD - α -ciclodextrina
- BCD - β -ciclodextrina
- BZN - Benznidazol
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention
- CHC - Chalcona modificada (E)-3-(4-Bromofenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DMSO-*D*6 - Dimetilsulfóxido deuterado
- DRX - Difração de raios-X
- ERO - Espécies Reativas Oxigenadas
- ESI - Espectrometria de massas com ionização via eletrospray
- FTIR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier
- HpaCD - 2-hidroxipropil-alfa-ciclodextrina
- HpBCD - 2-hidroxipropi-beta-ciclodextrina
- HpYCD - 2-hidroxipropil-gama-ciclodextrina
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura
- MM - Mistura mecânica
- MOF - Metal organic framework
- NFX - Nifurtimox
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PCUM - curmarina modificada N-(2-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina
- PEG - Polietilenoglicol
- PFG - gradiente de campo de pulso
- RMN de Hidrogênio - Ressonância magnética nuclear de H
- SNEDDS - método da auto nano emulsificação
- T. cruzi* - *Trypanosoma cruzi*
- TG - Análise termogravimétrica
- UV-Vis - Espectroscopia na região do UV-Vis
- YCD - γ -ciclodextrina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do ciclo de infecção/replicação do <i>T. cruzi</i> e a representação de suas formas: a) tripomastigota; b) amastigota e c) epimastigota.....	17
Figura 2 - Sinal de Romaña a esquerda e chagoma a direita	18
Figura 3 - Estrutura do Benznidazol (Ácido 2-[(2-nitro-1H-imidazol-1-il)metil]-1H-benzimidazol-5-carboxílico) e do Nifurtimox (3-metil-1-[(E)-1-(5-nitrofuran-2-il)prop-1-en-2-il]imidazolidina-2,4-diona).....	19
Figura 4 - Estrutura de: a) chalcona modificada E)-3-(4-Bromophenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) (CHC) e b) curmarina modificada N-(2-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina.....	21
Figura 5 - Estruturas para a) ácido ursólico. b) poli- δ -caprolactona.....	24
Figura 6 - Estrutura principal da chalcona.....	27
Figura 7 - Estrutura principal da cumarina.....	30
Figura 8 - Cumarina (esquerda); chalcona (direita) e cumaro-chalcona (centro).....	31
Figura 9 - Representação das moléculas de alfa, beta e gama-ciclodextrina. Suas dimensões e formas	33
Figura 10 - Tipos de ciclodextrinas nativas e substituídas encontradas comercialmente, aonde n indica o numero de monômeros que formam a ciclodextrina sendo n = 6; 7 e 8 para as ciclodextrinas alfa, beta.....	35
Figura 11 - Trabalhos realizados sobre os termos “cyclodextrin” e “delivery” e o volume de trabalhos por ano desde 1973 no banco de dados Scopus.....	36
Figura 12 - termos relacionados a pesquisa por “cyclodextrin” e “delivery” na base de dados web of Science.....	37
Figura 13 - Análise da base de dados “web of Science” para a pesquisa “cyclodextrin” e “delivery” por países.....	39
Figura 14 - Análise da base de dados “web of Science” para a pesquisa “cyclodextrin” e “delivery” por países e por data.....	39
Figura 15 - Espectros RMN ^1H RMN de: a) HpBCD; b) solução contendo HpBCD:CHC na proporção de 1:0,2. No inset: molécula e numeração dos hidrogênios do HpBCD.....	53
Figura 16 - Espectros de RMN ^1H de: a) CHC; b) solução contendo HpBCD:CHC na	

proporção de 5:1 e c) solução contendo HpBCD:CHC na proporção de 10:1. Atribuição dos hidrogênios da região aromática de CHC também constam na figura.....	55
Figura 17 - Método de Job para a interação entre HpBCD e CHC. No detalhe, o espectro de UV-vis de CHC.....	58
Figura 18 - Gráfico de Benesi–Hildebrand para a associação entre CHC:HpBCD na razão estequiométrica de 1:1.....	59
Figura 19 - Gráfico de Benesi–Hildebrand para a associação entre CHC:HpBCD na razão estequiométrica de 1:2.....	60
Figura 20 - Curvas TG (azul) e DTG (vermelho) para as amostras: a) CHC; b) MM e c) HpBCD.....	64
Figura 21 - Curvas TG (azul) e DTA (vermelho) para as amostras: a) MM; b) Produto moído; c) produto liofilizado; e d) produto calcinado.....	65
Figura 22 - Visualizações de MEV e espectros EDS nos pontos 1, 2 e 3 para a)MM; b) produto calcinado; c) produto liofilizado; d) produto moído.....	67
Figura 23 - Difratogramas de raios X em pó das amostras: a) HpBCD; b) MM; c) Produto moído; d) produto calcinado. * Picos relativos a CHC.....	69
Figura 24 - Subtração dos espectros FTIR das amostras: a) CHC; b) MM c) HpBCD d) produto moído; e) produto calcinado; f) produto liofilizado. (*) sinais de CHC analisados	72
Figura 25 : Espectros de RMN ¹ H adquiridos em DMSOD6 para a) CHC; b) complexo liofilizado; c) complexo calcinada; d) complexo moído.....	77
Figura 26 - Espectro de ¹ H RMN para o PCUM e atribuição dos hidrogênios.....	82
Figura 27 - Espectros de ¹ H RMN para mistura liofilizada entre: a) HpaCD e PCUM; b) HpBCD e PCUM; c) HpYCD e PCUM. No detalhe o espectro de “c” ampliado..	83
Figura 28 - Espectros de ¹ H RMN para mistura moída entre: a) HpaCD e PCUM; b) HpBCD e PCUM; c) HpYCD e PCUM.....	85
Figura 29 - Espectro de massas para as amostras a) PCUM; b) HpaCD; c) Composto de inclusão com HpaCD moído; d) Composto de inclusão com HpaCD liofilizado. Setas indicam o íon molecular do PCUM em 366 m/z. asteriscos indicam os picos relacionados a HpaCD com o íon molecular. Insets: a região do íon molecular para o produto liofilizado e a região compreendida entre 1500 e 2000 m/z.....	89
Figura 30 - Espectro de massas para as amostras a) PCUM; b) HpBCD; c) Composto de inclusão com HpBCD moído; d) Composto de inclusão com HpBCD liofilizado. Setas indicam o íon molecular do PCUM em 366 m/z. Inset: a região do íon molecular para o produto liofilizado.....	90

Figura 31 - Espectro de massas para as amostras a) PCUM; b) HpYCD; c) Composto de inclusão com HpYCD moído; d) Composto de inclusão com HpYCD liofilizado. Setas indicam o íon molecular do PCUM em 366 m/z. Inset: a região do íon molecular para o produto liofilizado.....	91
Figura 32 - Difratogramas de raios X em pó das amostras: a) PCUM; b) HpaCD; c) Mistura mecânica; d) produto moído com HpaCD; e) produto liofilizado com HpaCD.....	94
Figura 33 - difratogramas de raios X em pó das amostras: a) PCUM; b) HpBCD; c) Mistura mecânica; d) produto moído com HpBCD; e) produto liofilizado com HpBCD.....	95
Figura 34 - Difratogramas de raios X em pó das amostras: a) PCUM; b) HpYCD; c) Mistura mecânica; d) produto moído com HpYCD; e) produto liofilizado com HpYCD.....	96
Figura 35 - Curvas ATG (azul) e ATD (vermelho) para as amostras: a) PCUM; b) Mistura mecânica com HpaCD; c) Mistura mecânica com HpBCD; d) Mistura mecânica com HpYCD; e) produto liofilizado com HpaCD; f) produto liofilizado com HpBCD; g) produto liofilizado com HpYCD.....	98
Figura 36 - Curvas ATG (azul) e ATD (vermelho) para as amostras: a) produto moído por 3h com HpaCD; b) produto moído por 3h com HpBCD; c) produto moído por 3h com HpYCD; d) produto moído por 12h com HpaCD; e) produto moído por 12h com HpBCD; f) produto moído por 12h com HpYCD.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados e suas respectivas marcas	47
Tabela 2 - Mudanças químicas dos prótons de HpBCD livre e em HpBCD:CHC.	56
Tabela 3 - Mudanças químicas dos prótons de CHC livre e em HpBCD:CHC.....	56
Tabela 4 - Coeficientes de difusão (D) e valor da constante de estabilidade (K) para o complexo de inclusão.....	62
Tabela 5 - Temperaturas do processo de perda de massa e pico de decomposição...66	
Tabela 6 - FTIR simulado e experimental de CHC.....	70
Tabela 7 - Atividade antitripanossômica sobre formas epimastigotas de <i>T. Cruzi</i> (IC50), toxicidade (CC50) para células LLCMK22 e índice de seletividade (IS) de CHC e dos complexos HpBCD:CHC.....;;.....	73
Tabela 8: Reagentes utilizados e suas respectivas marcas	78
Tabela 9 - Deslocamentos químicos δ referentes aos sinais do PCUM nas amostras do PCUM puro e associado a HpaCD, HpBCD e HpYCD obtidas por liofilização e síntese mecanoquímica e seus respectivos $\Delta\delta$ ($\delta_{PCUM} - \delta_{amostra}$).....	86
Tabela 10 - Coeficientes de difusão (D) e valor da constante de estabilidade (K) para os complexos obtidos por liofilização envolvendo as ciclodextrinas HpaCD e HpBCD.....	87
Tabela 11 - Picos relativos a HpaCD e conjugados ao íon molecular do PCUM para as moléculas HpaCD; complexo obtido por liofilização com HpaCD; complexo obtido por moagem com HpaCD.....	92
Tabela 12 - Temperaturas e % em massa do processo de perda de massa para as amostras liofilizadas e seus controles.....;;,;;.....	99
Tabela 13 - Temperaturas e % em massa do processo de perda de massa para as amostras moídas.....	102

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS.....	16
1.2 OBJETIVOS	22
1.2.1 Objetivo geral.....	22
1.2.2 Objetivos específicos	22
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.3.1 Formulações e estratégias contra a doença de chagas.....	23
1.3.2 Chalconas e doença de chagas.....	27
1.3.3 Cumarinas e a doença de chagas.....	29
1.3.4 Ciclodextrinas	32
1.3.4.1 Histórico.....	33
1.3.4.2 Ciclodextrinas como veículo molecular.....	36
1.3.4.3 Ciclodextrinas e a doença de chagas.....	44
2. SÍNTSE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO DA 2-HIDROXIPROPIL BETACICLODEXTRINA COM A E)-3-(4-Bromofenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona	47
2.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	47
2.1.1 Materiais	47
2.1.2 Métodos	47
2.1.2.1 Espectrofotometria na região do UV-vis em solução.....	47
2.1.2.2 Caracterização por espectroscopia de RMN de hidrogênio.....	48
2.1.2.3 Síntese do complexo hospedeiro-convidado em estado sólido.....	48
2.1.2.4 Caracterização do complexo em estado sólido.....	49
2.1.2.5 Método computacional.....	50
2.1.2.6 Citotoxicidade para células de mamíferos.....	50
2.1.2.7 Uso do <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
2.1.2.8 Efeito sobre o crescimento de epimastigotas.....	51
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
2.2.1 Caracterização em solução.....	52
2.2.1.1 Espectroscopia de RMN ¹ H.....	52
2.2.1.2 Espectroscopia UV-vis.....	57
2.2.1.3 Espectroscopia Ordenada por Difusão (DOSY)	61
2.2.2 Caracterização em estado sólido do complexo hospedeiro-convidado.....	62
2.2.2.1 Análise Termogravimétrica.....	62
2.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	66
2.2.2.3 Difractometria de raios X em pó (DRX)	68
2.2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	69
2.2.2.4 Avaliação da atividade anti-epimastigota e citotoxicidade in vitro de CHC e complexos hospedeiro-convidado.	73
2.2.2.5 Espectroscopia de rmn de hidrogênio	76
3. SÍNTSE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO DA N-(2-BROMOFENIL)-3-CARBOXIAMIDA-CUMARINA COM A 2-HIDROXIPROPIL ALFACICLODEXTRINA; 2-HIDROXIPROPIL BETACICLODEXTRINA E 2-HIDROXIPROPIL GAMACICLODEXTRINA.....	78

3.1	PARTE EXPERIMENTAL.....	78
3.1.1	Materiais	78
3.1.2	Métodos	78
3.1.2.1	<i>Síntese do complexo com alfa, beta e gama hidroxipropil ciclodextrinas (HpaCD; HpBCD; HpYCD) via lyophilização.....</i>	78
3.1.2.2	<i>Síntese do complexo com alfa, beta e gama hidroxipropil ciclodextrinas (HpaCD; HpBCD; HpYCD) via método mecanoquímico.....</i>	79
3.1.2.3	<i>Caracterização por espectroscopia de RMN ¹H.....</i>	79
3.1.2.4	<i>Espectrometria de massas.....</i>	79
3.1.2.5	<i>Caracterização do complexo em estado sólido.....</i>	80
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.2.1	Caracterização em solução.....	81
3.2.1.1	<i>Espectroscopia RMN ¹H.....</i>	81
3.2.1.2	<i>Espectrometria de massas.....</i>	88
3.2.2	Caracterização em fase sólida.....	93
4.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
4.1	CONCLUSÕES.....	103
4.2	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	104
REFERÊNCIAS.....		105
APÊNDICES.....		117
Apêndice A - Artigo publicado intitulado: Cyclodextrin-encapsulated new drug with promising anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> activity.....		117

1. INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

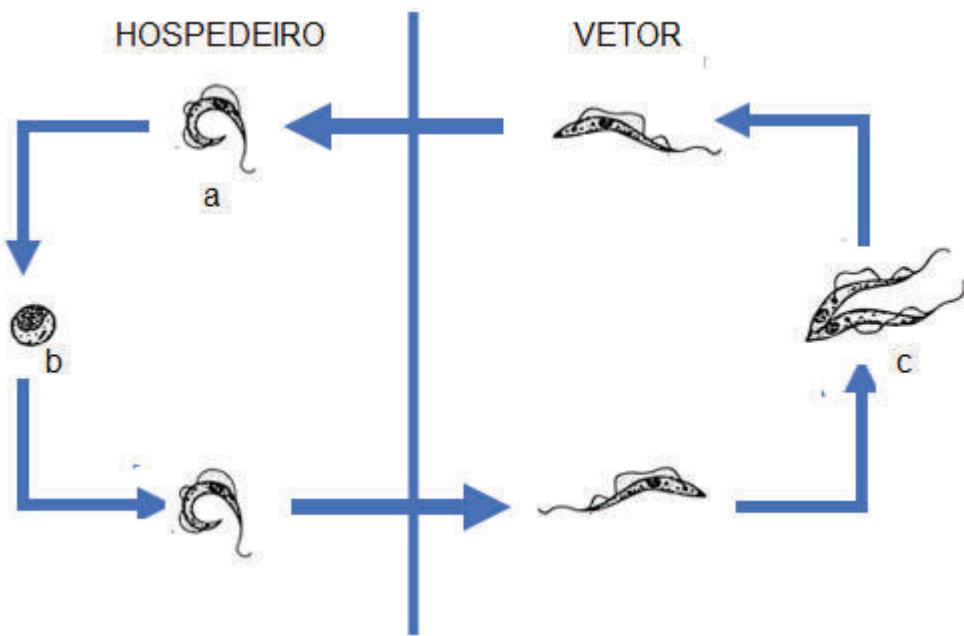
As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças que se caracterizam pela carência de tratamento adequado e pela carência de recursos para o seu combate, bem como pela falta de recursos destinados à pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Nessa categoria, estão inclusas enfermidades como hanseníase, leishmaniose, e doença de Chagas (Bermudez *et al.*, 2016)

Estimativas indicam que, em 2023, cerca de 8 milhões de indivíduos em todo o mundo sofreram com a doença de Chagas e, anualmente, mais de 10.000 óbitos estão relacionados a essa condição segundo a OMS (OMS, 2023). A doença de Chagas impõe desafios consideráveis tanto do ponto de vista econômico quanto humano, impactando não somente a eficácia do tratamento dos enfermos, mas também a capacidade laboral destes (Mazzetti *et al.* 2020. De Oliveira; Viegas 2020. Pérez-Molina; Molina, 2018). A doença de Chagas é endêmica em regiões da América do Sul e Central e estima-se que aproximadamente 1 milhão de pessoas estejam infectadas com a doença em 2023. Mas ela pode ser encontrada em outras regiões do mundo, afetando indivíduos em áreas não endêmicas. Por exemplo, em 2018, nos Estados Unidos e na Europa foram relatados cerca de 400 mil casos de indivíduos com a doença. (Bocchi *et al.*, 2017)

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é uma das principais doenças parasitárias negligenciadas na América Latina, afetando principalmente os grupos sociais mais desfavorecidos e marginalizados. (OMS, 2020) A transmissão da doença de Chagas ocorre após a picada do barbeiro, um inseto da classe dos triatomíneo, que excreta o protozoário nas fezes e, em contato com a corrente sanguínea, começa a infecção (Sales Junior *et al.*, 2017). Outras formas de infecção pelo parasita *T. cruzi* seria através da transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou o consumo de alimentos contaminados (Rassi Jr; Neto e Rassi, 2017). O parasita possui duas formas evolutivas: uma infecciosa e outra replicativa. Em sua forma infecciosa, a tripomastigota, ao entrar na corrente sanguínea, infecta células próximas e se transforma na sua forma replicativa amastigota. Após a replicação, a forma amastigota

se diferencia em sua forma tripomastigota, rompendo a célula infectada e se espelhando pelo organismo pela corrente sanguínea infectando diversos órgãos, principalmente o coração, onde o parasita se replica e começa novamente o ciclo de infecção. O barbeiro, ao picar uma pessoa infectada, contrai o parasita que se transforma na forma epimastigota, que se replica no seu intestino médio, e se diferencia na forma tripomastigota no intestino posterior do vetor encerrando o ciclo de infecção. (CDC, 2021) (Fig. 1)

Figura 1: Representação do ciclo de infecção/replicação do *T. cruzi* e a representação de suas formas: a) tripomastigota; b) amastigota e c) epimastigota.

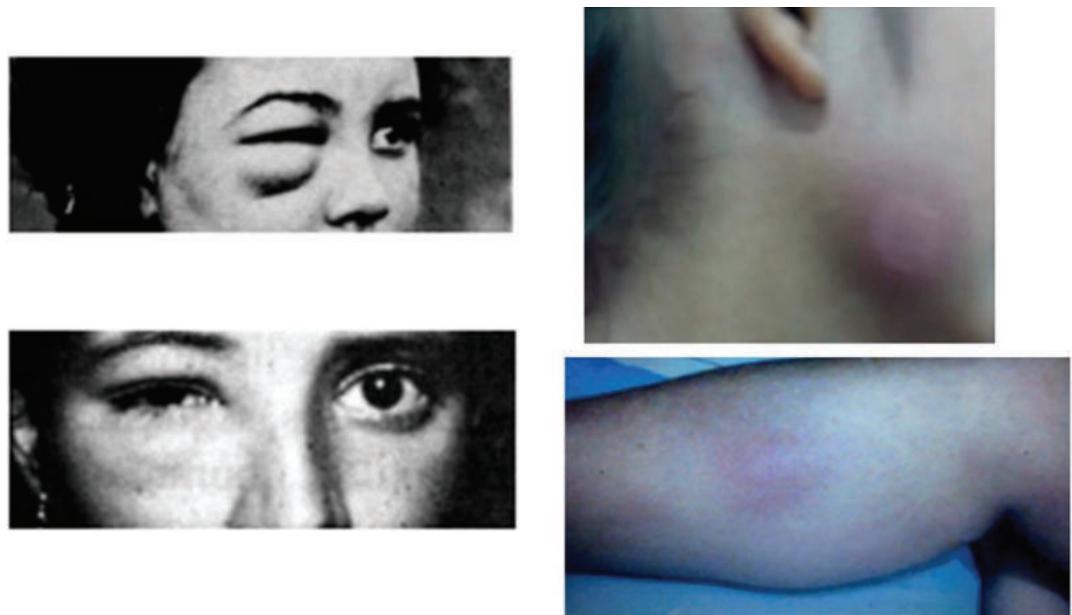


Fonte: Adaptado de (CDC, 2021)

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distintas: a fase aguda, que pode ser caracterizada por um edema na pálpebra, conhecida como sinal de Romaña, e/ou um inchaço no local da picada, chamado de chagoma. Ela tem duração de alguns dias após a infecção (Fig. 2) (Brasil, 2010). A fase crônica, que pode se manifestar após um período de 10 a 30 anos após infecção, pode ocasionar complicações

cardíacas e aumento do volume dos órgãos afetados. (Bern, 2015; Lidani *et al.*, 2019; Bonney *et al.*, 2019; Batista *et al.*, 2020)

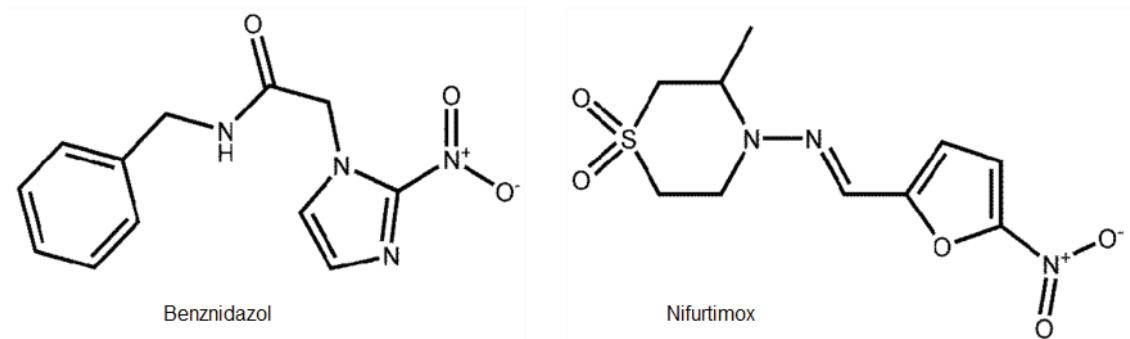
Figura 2 - Sinal de Romaña a esquerda e chagoma a direita



Fonte: Adaptado de: : (Brasil, 2010; Souza; Povoa, 2016)

Apenas dois fármacos estão disponíveis para o combate à doença de Chagas, desenvolvidos na década de 1970: o benznidazol (BZN) e o nifurtimox (NFX). (Fig. 3) Ambos consistem em moléculas heterocíclicas contendo o grupamento nitro que promovem o estresse oxidativo através da geração de espécies reativas oxigenadas (ERO), danificando o DNA do parasita e impedindo a sua replicação. Desses dois, apenas o benznidazol é utilizado no Brasil. (Castro; de Mecca; Bartel, 2006)

Figura 3: Estrutura do Benznidazol (Ácido 2-[(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)metil]-1*H*-benzimidazol-5-carboxílico) e do Nifurtimox (3-metil-1-[(E)-1-(5-nitrofuran-2-il)prop-1-en-2-il]imidazolidina-2,4-diona).



Fonte: O autor

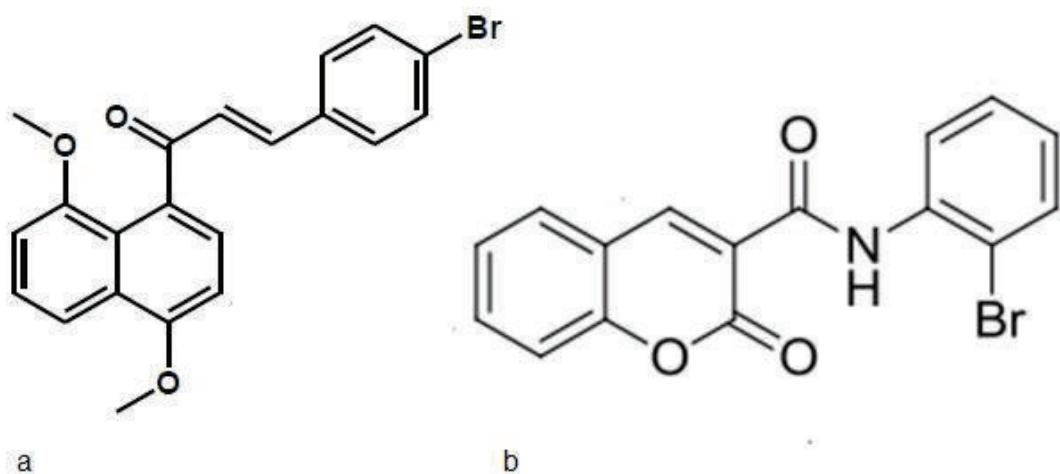
No entanto, esses dois fármacos apresentam efeitos adversos devido ao uso contínuo como alta toxicidade, vômito e dor de cabeça. Possuem baixa biodisponibilidade e solubilidade, além de apresentarem eficácia limitada na fase crônica da doença. A eficácia do benznidazol também pode ser influenciada pela diversidade genética das cepas do *T. cruzi*, enfatizando a urgência de se desenvolver novas abordagens terapêuticas para o tratamento desta enfermidade (Coura; Borges-Pereira, 2010). Esse fato somado a baixa disponibilidade de testes diagnósticos em diversas regiões endêmicas, devido a uma série de desafios, tais como carência de recursos, infraestrutura inadequada e obstáculos de ordem socioeconômica são fatores adicionais que urgem a necessidade de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos regimes terapêuticos para a doença de Chagas, objetivando tanto a redução do ônus global desta afecção quanto a melhoria dos desfechos clínicos para os indivíduos acometidos. (Pérez-Molina; Molina, 2018)

Neste contexto, é crucial investigar novas moléculas que possam se tornar fármacos. (Pérez-Molina; Molina, 2018; Hotez *et al.*, 2016). Vários estudos têm examinado alternativas para o tratamento da doença de Chagas como a utilização de compostos sintéticos, derivados naturais e o reposicionamento de fármacos (Torrico *et al.* 2018). O objetivo dessas iniciativas é identificar compostos que possuam uma potente e seletiva atividade tripanocida, superando e minimizando as limitações e os efeitos adversos vinculados ao tratamento disponível. (Morillo, *et al.* 2017)

É imprescindível destacar que, além do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, estratégias relacionadas aos sistemas de liberação controlada e encapsulamento das moléculas-alvo são relevantes (Matada; Pattanashettar; Yernale, 2021). A atenção deve ser direcionada à baixa solubilidade de cerca de 40% dos medicamentos disponíveis, visando maximizar sua eficácia terapêutica e minimizar possíveis efeitos adversos (Oliveira, *et al.*, 2020)

Os estudos disponíveis na literatura sobre as moléculas das classes das chalconas e cumarinas para a formulação de novos princípios ativos contra a doença de Chagas demonstram o seu potencial e reforçam a importância deste estudo na busca por alternativas aos tratamentos disponíveis. O presente estudo demonstra a relevância da pesquisa científica de tais moléculas no campo das doenças negligenciadas, partindo de 2 estruturas previamente sintetizadas: a chalcona modificada (*E*)-3-(4-Bromofenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) (CHC) (Albuquerque, *et al.*, 2021) e a curmarina modificada N-(2-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina (PCUM) (Fabris, 2019) (Fig. 4); porém, agora o estudo foi conduzido sob a ótica da nanotecnologia de forma as suas limitações de solubilidade em água (chalconas são insolúveis em água (Budziak; Arczewska; Kamiński, 2020), cumarinas apresentam 1,7 mg mL⁻¹ (Alemanha, 2019). Desta forma, a pesquisa continuou, através do desenvolvimento de complexos com ciclodextrinas para aumentar as suas biodisponibilidades.

Figura 4 – Estrutura de: a) chalcona modificada E)-3-(4-Bromofenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) (CHC) e b) curmarina modificada N-(2-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina (PCUM).



Fonte: Adaptado de: (Albuquerque *et al.*, 2021; Fabris, 2019)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar compostos de inclusão de ciclodextrinas hidroxipropiladas com duas moléculas para o uso antichagásico, gerando compostos entre (2-hidroxipropil)-beta-ciclodextrina (HpBCD) e a chalcona modificada E)-3-(4-Bromofenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona) (CHC) (Albuquereque *et al.*, 2021). E utilizando as ciclodextrinas (2-hidroxipropil)-alfa-ciclodextrina (HpaCD), (2-hidroxipropil)-beta-ciclodextrina (HpBCD) e (2-hidroxipropil)-gama-ciclodextrina (HpYCD) com a curmarina modificada N-(2-bromofenil)-3-carboxiamida-cumarina (PCUM) (Fabris, 2019).

1.2.2 Objetivos específicos

- Síntese dos compostos de inclusão da (2-hidroxipropil)-beta-ciclodextrina (HpBCD) com a CHC por síntese mecanoquímica, calcinação e liofilização;
- Caracterização dos compostos de inclusão por espectroscopia na região do UV-Vis; Ressonancia magnética nuclear ^1H (RMN de hidrogênio); Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR); Difração de raios-X (DRX); Análise termogravimétrica (TG); microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Testes biológicos realizado com os complexos obtidos em células tipo LLCMK2 contra a forma epimastigota do *Trypanossoma cruzi*.
- Síntese dos compostos de inclusão da PCUM com a (2-hidroxipropil)-alfa-ciclodextrina (HpaCD); (2-hidroxipropil)-beta-ciclodextrina (HpBCD); (2-hidroxipropil)-gama-ciclodextrina (HpYCD) por liofilização e síntese mecanoquímica.
- Caracterização dos compostos de inclusão por Ressonância magnética nuclear ^1H (RMN de hidrogênio); espectrometria de massas com ionização via eletrospray (ESI); Difração de raios-X (DRX); Análise termogravimétrica (TG)

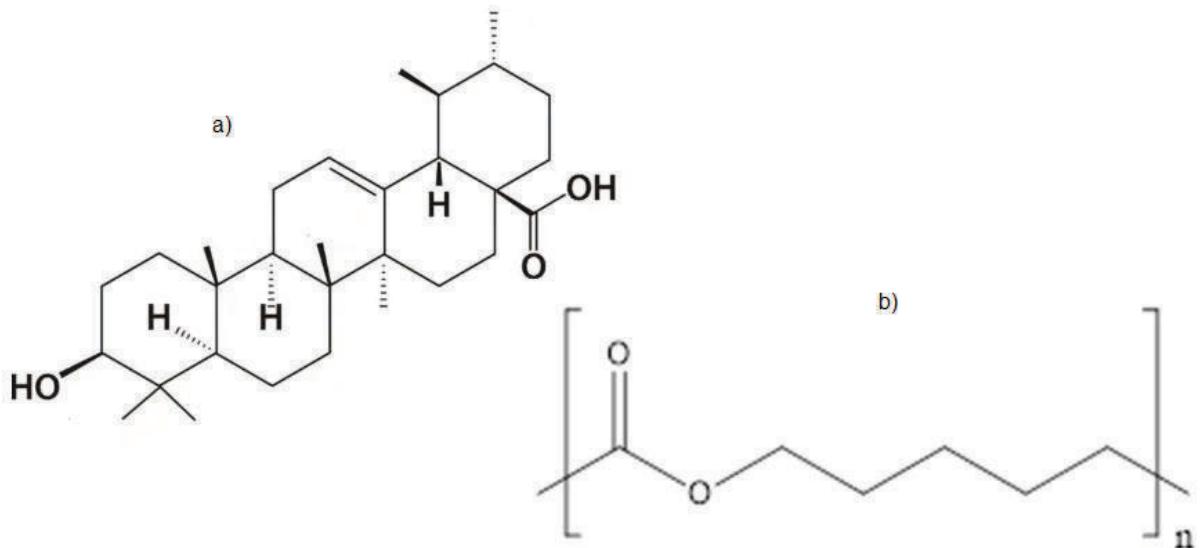
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Formulações e estratégias contra a doença de chagas

A falta de novas formulações e de estratégias diferentes para as necessidades já discutidas sobre os fármacos existentes para o tratamento da doença de Chagas, são temas de discussão na literatura aos sistemas de entrega controlada. É comum encontrar trabalhos sobre o benznidazol e o nifurtimox relacionados a novas formulações com carreadores moleculares como curcubiturilas (Barcellos *et al*, 2017), nanopartículas (Bezerra *et al*, 2020), álcoois polivinílicos (Amaral *et al*, 2021), zeólitas (Ferraz *et al*, 2020, 2021), sílicas (Nhavene *et al*, 2018; Pitasse-santos *et al*, 2022) e lipossomos (Adamiak *et al*, 2021; Memariani H.; Memariani M., 2021; Pise A., Pise S., 2021; Da Silva *et al*, 2023)

Barcellos e colaboradores (Barcellos *et al*, 2017) usaram a nanoprecipitação em seu trabalho para encapsular o ácido ursólico em poli-ε-caprolactona (Fig. 5) para combater a doença de Chagas. Testes *in vivo* em ratos compararam a atuação desse complexo com o benznidazol puro. Os autores apontaram para uma citotoxicidade na mesma faixa tanto para o benznidazol quanto para o complexo, de 0 a 5% de viabilidade de células LLCMK2 e chegaram em uma redução para 21,4% de parasitas vivos para o benznidazol e 56,8% de parasitas vivos para o complexo após 24h com a mesma concentração de 30 μ mol.L⁻¹.

Figura 5 – Estruturas para a) ácido ursólico. b) poli-ε-caprolactona



Fonte: O autor

Amaral e colaboradores (Amaral *et al.* 2021) utilizaram filmes de álcool polivinílico, propilenoglicol e timol como veículo molecular para melhorar a absorção por meio oral do benznidazol. Os autores indicaram que a solubilidade do benznidazol aumentou em 1,5x e que esta formulação inibe a cristalização do benznidazol na formulação, aumentando a sua ação tripanocida.

Bezerra e colaboradores (Bezerra *et al.* 2020) utilizaram ácido salicílico como forma de melhorar a solubilidade do BZN. Para obter a mistura entre esses dois compostos foi utilizado dois solventes diferentes, a acetonitrila e o acetato de etila, para a coprecipitação. A mistura com ácido salicílico aumentou a solubilidade do BZN de 0,2 para 0,3mg/mL

Ferraz e colaboradores. (Ferraz, 2020, 2021) preparam um material a base de zeólitas, contendo grupos imidazóis, para ser usado como um veículo molecular para o BZN, a fim de aprimorar sua solubilidade e a biodisponibilidade. O trabalho demonstrou um sistema de liberação controlada *in vitro* através da variação do pH e mostrou, em comparação, que a porcentagem de Benznidazol no composto de inclusão varia de 30 a 50% quando o pH varia de 4,5 a 7,6 para um tempo de 48h de análise. O estudo também apontou uma toxicidade semelhante para o produto e para o BZN, em torno de 95% de viabilidade de células PBMC.

Nhavene e colaboradores (Nhavene *et al.* 2018) propuseram em seu estudo o uso de sílica funcionalizada com quitosana para ancorar e carrear BZN no tratamento da doença de Chagas. O ancoramento ocorre quando BZN é adsorvido na superfície porosa das nanopartículas de sílica funcionalizada. De acordo com os autores, o produto obtido apresentou uma distribuição uniforme de BZN e foi liberado com êxito. Nos testes *in vitro* o complexo formado em comparação com o benznidazol foi igualmente efetivo contra as formas epimastigotas do *T. cruzi*, variando apenas na margem de erro para testes por 120h utilizando concentrações de 0,002 mmol.L⁻¹ para o complexo e 0,06mmol.L⁻¹ para o benznidazol, apresentando citotoxicidade para um total de 10⁷ células infectadas e mantendo a ação tripanocida por 120h. O autor salienta ainda que este veículo molecular poderia ser usado também para outros potenciais fármacos contra doenças negligenciadas.

Pitasse-Santos e colaboradores (Pitasse-Santos *et al.*, 2022) desenvolveram uma série de moléculas contendo grupamentos oxadiazóis como agentes anti-*T. cruzi* suportados em matriz de sílica. O estudo mostrou que esse material tem uma resistência química que melhora a biodisponibilidade da molécula com atividade anti-*T. cruzi*. Além disso, o estudo indicou um perfil físico-químico e cinético de liberação do composto e mostrou-se eficaz no combate ao parasita, tendo um IC₅₀ de 2,9 µMol.L⁻¹ contra a forma amastigota do parasita.

Rolon e colaboradores (Rolon *et al.* 2022) analisaram a produção dos fármacos nifurtimox e benznidazol, pelo método de auto nano emulsificação (SNEDDS em inglês) no qual as moléculas em tamanho de partícula nanométrica teriam uma melhor solubilidade em comparação das formulações usuais. Desta forma, foram usadas sílicas porosas impregnadas com essas nanopartículas em uma formulação para uso oral, como alternativa às formulações originais. Os autores realizaram testes *in vitro* contra a forma epimastigota e chegaram ao valor de IC₅₀ de 0,02; 0,03; 2,0 e 11,8 µg.mL⁻¹ para o complexo contendo nifurtimox, o complexo contendo nifurtimox e benznidazol, nifurtimox puro e benznidazol puro respectivamente. Com um valor de CC₅₀ de 0,16; 0,48; 95,5 e 153,3, respectivamente.

Reigada e colaboradores (Reigada *et al.*, 2024) utilizaram em seu estudo como moléculas tripanocidas a loratadina, um anti-histamínico e a isotretinoína, um medicamento utilizado para acne. Os autores escolheram a utilização de um veículo molecular para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade das moléculas

trianocidas, o veículo molecular escolhido foi uma lipossoma preparada com fosfatidilcolina, colesterol e quitosana. Os dados de IC_{50} contra a forma epimastigota do parasita apresentados pelos autores foram de $7,54\mu\text{mol.L}^{-1}$; $54,12\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $13,02\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a isotretinoína encapsulada, isotretinoína isolada e benznidazol, respectivamente, e $15,71\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $28,06\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a loratadina encapsulada e a loratadina isolada, respectivamente. Além dos valores de IC_{50} os autores indicaram que a citotoxicidade para os complexos foi na mesma faixa para a lipossoma isolada, variando de 10 a 15% de células inviabilizadas para concentrações de até $0,68\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Muraca e colaboradores (Muraca *et al.* 2023) utilizaram carreadores a base de lipídeos nanoestruturados como veículo molecular para o benznidazol. Esse carreador foi feito a base de mristato miristílico, poloxamer 188, emulsificadores e cromol, um triglicerídeo oriundo do óleo de coco. O encapsulamento se deu pela técnica de ultrassom. Os autores realizaram testes de citotoxicidade, o veículo contendo Benznidazol apresentou uma inviabilidade de células de 10% em comparação a 20% do benznidazol puro para uma concentração de $31\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os autores também realizaram testes *in vitro* contra a forma tripomastigota do *T. cruzi* e obtiveram o valor de $6,07\mu\text{mol.mL}^{-1}$ de IC_{50} para o benznidazol puro e de $5\mu\text{mol.mL}^{-1}$ para o veículo contendo benznidazol para uma concentração de $50\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O uso de *N,N'* – esquaramida, um composto cujo grupo central é um cicloalqueno contendo duas amidas, foi estudado por Quijia e colaboradores (Quijia *et al.* 2020) como agente tripanocida. Foram utilizados lipídios extraídos de células RAW264.7 para encapsular essa molécula. Foram feitos ensaios biológicos *in vitro* contra a forma epimastigota e amastigotas. Foram encontrados valores de IC_{50} de $15,85 \pm 4,82\mu\text{mol.L}^{-1}$ e $24,92 \pm 4,80\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. E um valor de citotoxicidade $CC_{50} = 1199,50 \pm 1,22\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Outro grupo de moléculas utilizado como carreador são as ciclodextrinas. Oliveira e Viegas (Oliveira; Viegas, 2020) descreveram o uso de beta-ciclodextrina e do Curcubit[7]urila, um macrociclo com capacidade de encapsulamento de espécies neutras e catiônicas, como alternativa à baixa solubilidade do BNZ. O estudo computacional mostrou que ambos os compostos formam complexos estáveis em soluções aquosas, sem alterações nos testes de dinâmica molecular e formam

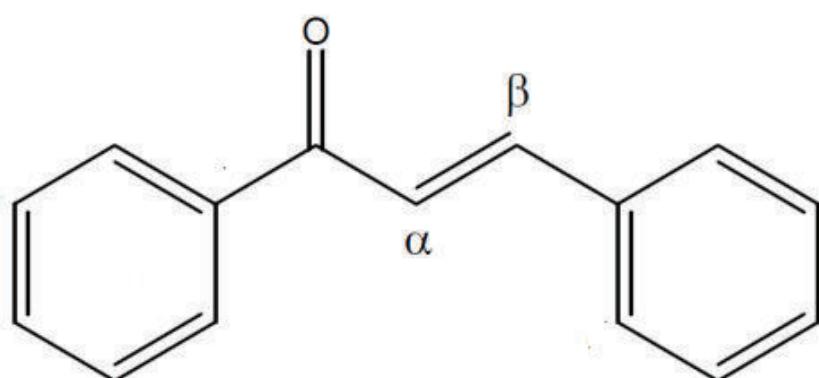
compostos de inclusão com energia de ligação de -60,8 e -21,8 kJ.mol⁻¹, para o curcubiturila e a beta-ciclodextrina, respectivamente.

Arrua e colaboradores (Arrua *et al.* 2019) mencionaram as dificuldades encontradas na solubilidade do benznidazol e do nifurtimox, enfatizando a relevância do encapsulamento dessas moléculas, com destaque para veículos moleculares baseados em ciclodextrinas como solução para esse problema. Sobre as ciclodextrinas, há relatos na literatura utilizando a ciclodextrina para aumentar a solubilidade e biodisponibilidade do benznidazol. Há trabalhos com gama-ciclodextrina, como o de Ndayishimiye e colaboradores (Ndayishimiye, *et al.* 2021) e trabalhos com a utilização de beta-ciclodextrina (Pozo-Martinez *et al.*, 2022; Streck *et al.*, 2020), além de trabalhos com outras moléculas alvo empregadas contra a doença de Chagas, que serão discutidos posteriormente.

1.3.2 Chalconas e doença de chagas

As chalconas, flavonoides de estrutura aberta, que são naturalmente encontradas em diversas espécies vegetais, são notáveis por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e até mesmo antiparasitárias. Composta por dois grupos aromáticos conectados por uma carbonila e uma olefina conjugada, formando um sistema carbonílico triatômico com uma ligação alfa beta insaturada, sendo o núcleo fundamental 1,3-diarilprop-2-en-1-ona. (Fig. 6) (Ávila *et al.* 2008)

Figura 6 - Estrutura principal da chalcona



Fonte: O autor.

Em virtude das suas características antiparasitárias entre as características relatadas para essas moléculas, as chalconas têm sido objeto de investigações científicas com o intuito de identificar novas moléculas potencialmente ativas contra o *Trypanosoma cruzi* (Coa *et al.* 2017; Espinoza-Hicks *et al.* 2019; Bortoluzzi *et al.* 2021; Sychrová *et al.* 2020). Uma das moléculas utilizada no presente estudo consiste em uma chalcona modificada, reconhecida por sua atividade anti *T. cruzi*.

Ao pesquisar por chalconas na base de dados *Scopus*, são encontradas 18751 referências. Porém, ao cruzarmos essa pesquisa com o termo “*Chagas disease*” as referências encontradas caem para 145, com apenas 45 artigos publicados nos últimos cinco anos sobre o uso de chalconas contra a doença de Chagas. Dentre os referidos artigos, 30 são trabalhos relacionados a pesquisa e desenvolvimento de chalconas modificadas através de química computacional e a síntese delas. (Cavalcante *et al.* 2023; Nunes *et al.* 2023) Os outros artigos focam no uso e nos testes de chalconas contra doenças negligenciadas, dentre eles, cinco tem como alvo a doença de Chagas. Esse resultado da pesquisa bibliográfica demonstra a escassez de pesquisas e desenvolvimento de chalconas contra a doença de Chagas.

Dentre os trabalhos na literatura pode se citar: o trabalho realizado por da Silva e colaboradores (Da Silva *et al.* 2021) que avaliou a ação de uma tiosemicarbazona, uma molécula organosulfurada oriunda de chalconas e dibenzalcetonas. Após a caracterização e os testes de citotoxicidade contra a forma amastigota do *T. cruzi* o autor encontra um valor de IC_{50} de $12,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, valor próximo ao do benznidazol ($IC_{50} = 5,64 \mu\text{mol.L}^{-1}$) o que demonstra a ação das chalconas frente a esse parasita.

Bortoluzzi e colaboradores (Bortoluzzi *et al.* 2021) relataram que a partir da extração utilizando partição em fases da raiz da *Lonchocarpus cultratus* foram identificadas, por cromatografia, chalconas na composição da fração oriunda do hexano. Essa porção foi testada contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota e foram encontrados como IC_{50} os valores de $10,98$; $2,42$ e $0,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Estes valores são próximos dos resultados de IC_{50} relatados pelo autor para o BZN ($3,13$; $1,36$ e $0,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente).

González e colaboradores (González *et al.* 2021) em seu trabalho ressaltaram a importância da busca por novas moléculas antiChagas devido aos efeitos colaterais do benznidazol e da sua baixa eficácia contra a doença em sua fase crônica. O autor

enfatiza a importância das chalconas como moléculas candidatas contra o *T. cruzi*. O autor desenvolveu 26 moléculas variando as modificações entre grupamentos hidroxila e grupamentos isoprenilas. O autor conclui que as moléculas com substituintes que são doadores de elétrons têm uma maior eficácia contra o parasita.

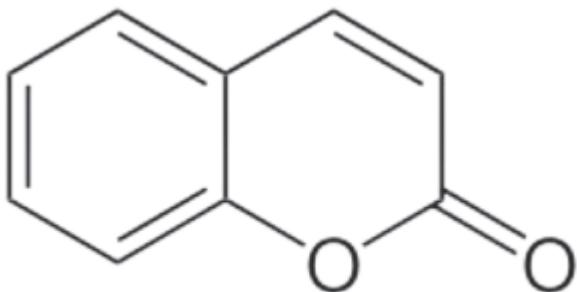
Conclusão parecida chegou o autor Blanco (Blanco *et al.* 2022) ao estudar uma série de chalconas sintetizadas através da condensação de Claisen-Schmidt, aonde a estrutura principal da chalcona é montada já com as substituições nos dois anéis. As estruturas sintetizadas foram testadas e mostraram ação contra *T.cruzi*, *Leishmania*, e contra células cancerígenas.

Gomes e colaboradores (Gomes *et al.* 2019) utilizam em seu estudo uma abordagem estatística ao analisar 36 chalconas modificadas em testes *in vitro* contra o *T. cruzi* baseado em *machine learning* e métodos estatísticos de multivariáveis. O autor chega à conclusão que a carbonila ligada ao sistema alfa beta insaturado é fundamental para a atividade contra o parasita. O autor, em consonância aos autores previamente mencionados, também credita a grupos hidroxila, grupos doadores de elétrons uma melhora na eficácia do potencial anti chagásico das chalconas.

1.3.3 Cumarinas e a doença de chagas

As cumarinas são ésteres cíclicos formados por um anel de benzeno ligado a um anel de α-pirona. (Fig. 7) São metabólitos secundários encontrados em diversas espécies de plantas. (Franco *et al.* 2021) As cumarinas são desenvolvidas, modificadas e estudadas para diversos fins medicinais e descritas na literatura como agentes antifúngicos, antiinflamatórios, antirradicais livres, antivirais, protetores hepáticos, controladores de diabetes e antitrypanossomicos. (Chandrakanth *et al.* 2024; Zeki, Mustafa, 2024^a; Zeki, Mustafa, 2024^b)

Figura 7 - Estrutura principal da cumarina



Fonte: O autor

O presente trabalho utilizou uma cumarina modificada que fez parte de uma série de cumarinas com modificações que fizeram parte de um projeto de pesquisa realizado anteriormente. (Fabris, 2019)

Ao pesquisar pelo termo cumarinas na base de dados Scopus encontramos 52051 resultados, porém, ao cruzarmos a pesquisa com doenças negligenciadas essa busca encontra 34 trabalhos, sendo apenas 16 artigos entre os resultados e dentre esses apenas 3 artigos sobre doenças de Chagas nos últimos 5 anos. Esse resultado mostra que, apesar da quantidade de pesquisas em torno das cumarinas ser alta, os estudos sobre as doenças negligenciadas ainda é muito escasso e o presente trabalho explora também essa carência de informações no tema.

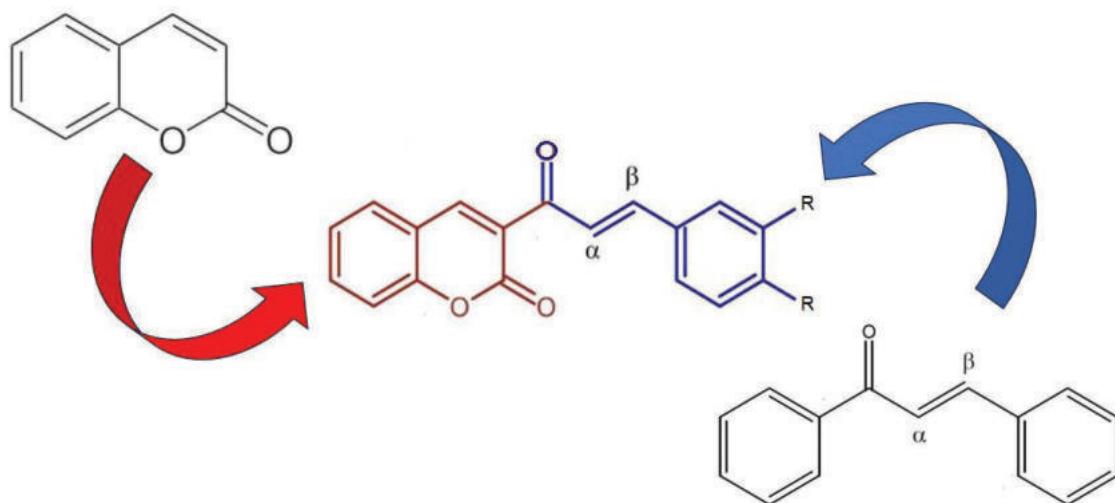
Dos artigos relacionados temos o trabalho de Rodriguez-Hernandez e colaboradores (Rodríguez-Hernandez *et al.* 2020) estudaram cumarinas naturais extraídas da árvore *Calophyllum brasiliense*, Os autores sugerem mecanismos de ação para a morte do parasita pela cumarina. Os autores através dos testes *in vitro* para as espécies epimastigotas e trypomastigotas, as cumarinas tiveram ação tripanocida chegando a valores de IC₅₀ de 85,8 e 36,9 μ mol.L⁻¹ para as formas epimastigotas e trypomastigotas, respectivamente, mostrando a importância dessa molécula contra a doença de Chagas.

Nour, em sua pesquisa (Nour *et al.* 2023) explora o extrato de ervas medicinais e seus usos contra doenças negligenciadas. Neste trabalho o autor através de extração e fracionação da erva *Severinia buxifolia* (Poir) Ten, utiliza diversos solventes

e isola fases do extrato principal, caracteriza e testa *in vitro* a ação desses extratos contra os parasitas *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania infantum*. O autor utilizou como solventes acetato de etila, n-hexano, diclorometano e n-butanol. A fração oriunda do n-hexano, que continha cumarinas apresentou atividade anti *T. cruzi*. ($IC_{50} = 38,4 \mu\text{g/mL}$), o autor destaca que essas cumarinas encontradas nesse extrato tem potencial para futuros desenvolvimentos para novos fármacos contra a doença de Chagas.

O trabalho de Cuellar e colaboradores (Cuellar *et al.* 2022) vai ao encontro do presente estudo, visto que o autor sintetiza uma série de cumarina-chalconas (Fig. 8) devido a documentada ação dessas moléculas contra diversos tipos de doenças e parasitas. O autor sintetizou 13 produtos dessas cumaro-chalconas com diversos grupamentos diferentes doadores e retiradores de elétrons. Um dos compostos, apresentou em testes *in vitro* valor de IC_{50} próximos aos valores encontrados para o BZN $18,4 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $14,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. O autor reforça a importância de mais estudos sobre essas duas moléculas a cumarina e a chalcona como potenciais produtos contra o *Trypanosoma Cruzi*.

Figura 8 – Cumarina (esquerda); chalcona (direita) e cumaro-chalcona (centro)



Adaptado de (Cuellar *et al.* 2022)

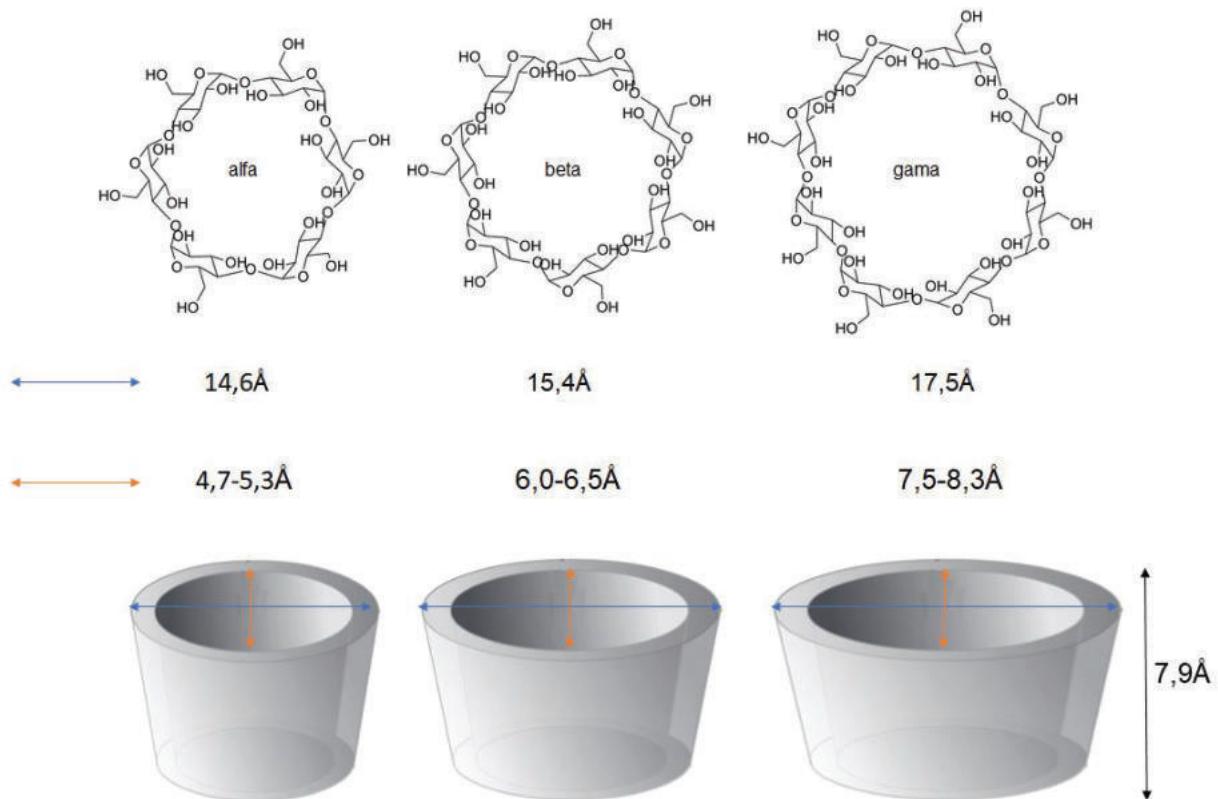
1.3.4 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacarídeos macrocíclicos. Através de ligações glicosídicas do tipo α (1,4), grupos de d-glicose são ligados dando o formato cílico dessas moléculas conhecido e descrito na literatura. As ciclodextrinas são nomeadas conforme a quantidade de unidades de d-glicose, são elas α -ciclodextrina (alfa-ciclodextrina, aCD), β -ciclodextrina (beta-ciclodextrina, BCD) e γ -ciclodextrina (gamma-ciclodextrina, YCD) contendo 6, 7 e 8 grupamentos de D-glicose, respectivamente. (Malta *et al.* 2008)

As ciclodextrinas apresentam em seu macrociclo dois círculos de raios diferentes, formando um toróide, um formato cônico cortado paralelamente a sua base. Os carbonos contendo hidroxilas secundárias formam a parte mais larga do toróide, enquanto a parte contendo a hidroxila primária forma a parte de menor raio.

Devido ao número de d-glicoses em cada uma das ciclodextrinas A cavidade formada por essas estruturas toroidais possuem tamanhos diferentes e variam o tamanho do seu raio de 14,6 a 17,5 Å. (Machado *et al.* 2008). Já a altura do tórus é a mesma pra cada uma das ciclodextrinas. (Fig. 9) Devido ao número de d-glicoses em cada uma das ciclodextrinas A cavidade formada por essas estruturas toroidais possuem tamanhos diferentes e variam o tamanho do seu raio de 14,6 a 17,5 Å. (Machado *et al.* 2008). Já a altura do tórus é a mesma pra cada uma das ciclodextrinas.

Figura 9 - Representação das moléculas de alfa, beta e gama-ciclodextrina. Suas dimensões e formas.



Adaptado de (Venturini *et al.*, 2008; Jesus; Pinto; Fraceto, 2009 e Machado *et al.*, 2008)

1.3.4.1 - Histórico

O primeiro estudo publicado sobre as ciclodextrinas foi publicado ainda na primeira metade do século XIX, mais precisamente em 1831 (Villiers, 1831). O autor nesse artigo produziu um composto a partir da digestão de amido com a bactéria *Bacillus amylobacter*. Ao caracterizar esse composto indicou que a fórmula molecular seria $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$ a qual chamou de “cellulosina” pela sua semelhança com a celulose. (Loftson; Duchene, 2007)

Villiers havia sintetizado o que mais tarde foi identificado como uma mistura de alfa e betaciclodextrina (Venturini *et al.* 2008) e de fato, a semelhança relatada por Villiers com a celulose se dá pelo monômero de glicopiranose presente na estrutura das ciclodextrinas.(Aree, 2023)

Após mais de 70 anos, Schardinger ao estudar a digestão do amido com bactérias patogênicas obteve duas substâncias semelhantes as relatadas por Villiers. (Schardinger, 1903). Nesse estudo ele conseguiu identificar e diferenciar as duas substâncias as quais ele nomeou como dextrinas. Alguns anos depois, em outro trabalho sobre as propriedades físico químicas dessas substâncias ele chamou essas substâncias de ciclodextrinas. (Loftson; Duchene, 2007)

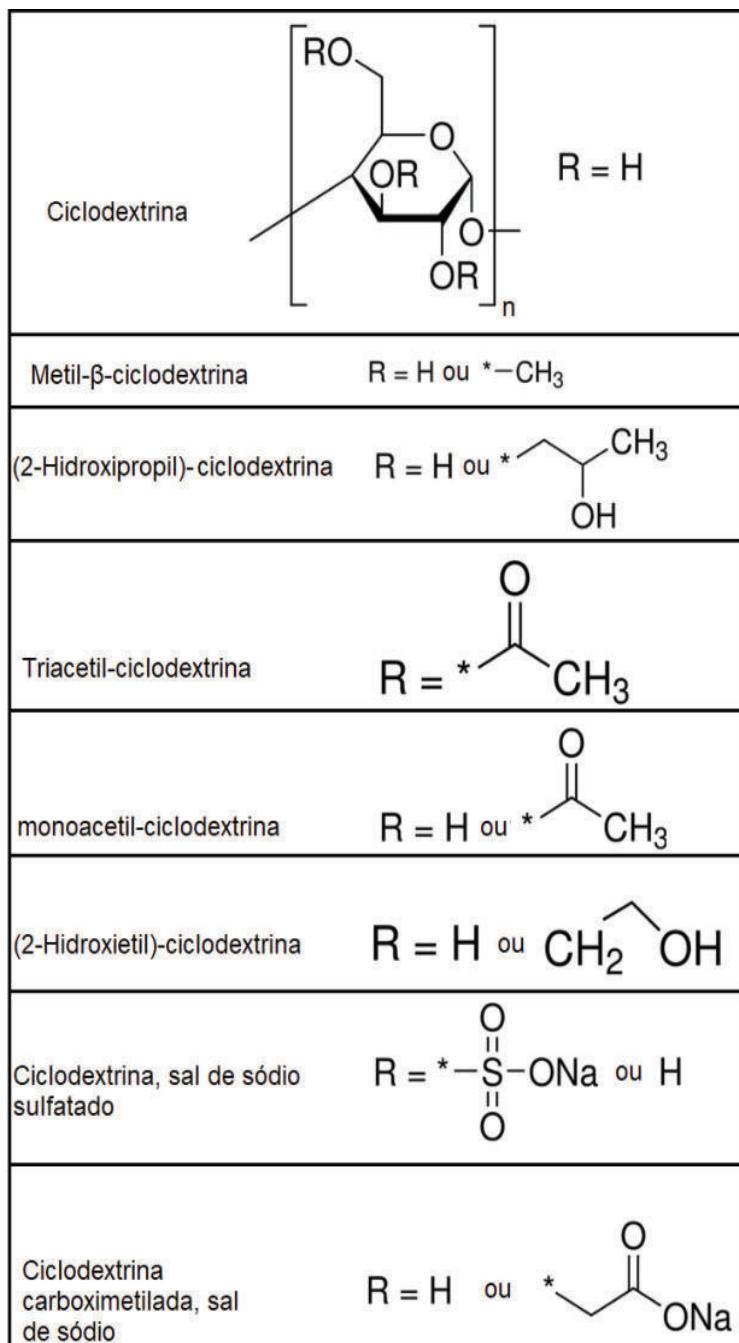
Na década de 30 foram relatadas derivados acetatos de ciclodextrinas capazes de formar complexos de inclusão (Pringsheim, 1932) e foram descritas as ligações glicosídicas α -1,4 que ligam os monômeros de glucopiranose e formam as ciclodextrinas (Freudenberg; Meyer-Delius, 1936)

Na década de 50 foram descritas ciclodextrinas maiores do que as até então registradas, as gama ciclodextrinas (French, 1957) e as estruturas das ciclodextrinas foram elucidadas (Loftson; Duchene, 2007)

Na década de 80, mais precisamente em 1983, houve a patente da (2-hidroxipropil) beta-ciclodextrina pela farmacêutica Jansen (Malanga *et al.* 2016) uma das ciclodextrinas mais utilizadas para fins medicinais pela sua já conhecida capacidade de formar complexos com moléculas hidrofóbicas, mas também por sua solubilidade elevada em água devido a sua estrutura cercada de hidroxilos no seu exterior. (Aree, 2023; Si *et al.* 2024; Liu H. *et al.* 2024) Essa ciclodextrina e seus análogos alfa e gama foram utilizadas neste presente trabalho pelos mesmos motivos.

As ciclodextrinas hoje podem ser encontradas comercialmente, vendidas com diversos tipos de substituintes. (Fig. 10)

Figura 10 - Tipos de ciclodextrinas nativas e substituídas encontradas comercialmente, aonde n indica o numero de monômeros que formam a ciclodextrina sendo n = 6; 7 e 8 para as ciclodextrinas alfa, beta e gama, respectivamente.



Fonte: O autor

Como descrito anteriormente, devido a presença das ligações glicosídicas o interior das ciclodextrinas possui um caráter hidrofóbico, diferentemente do seu exterior que é hidrofílico, devido a presença de hidroxilas. (Cunha-Filho; Sá-Barreto, 2007; Machado *et al.* 2008; Si *et al.* 2024). Essa característica inerente as

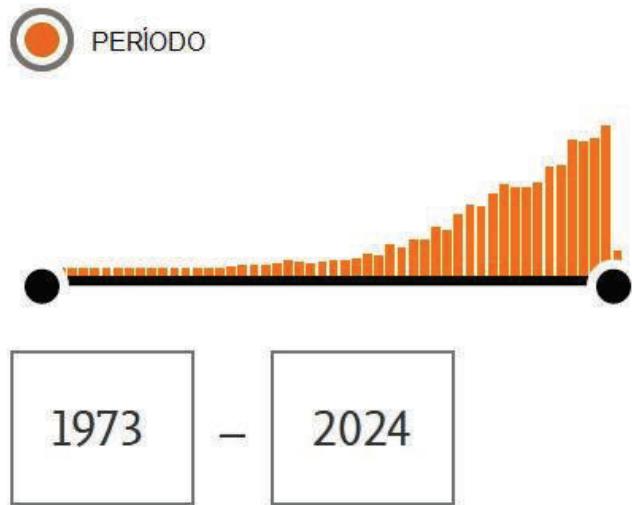
cyclodextrinas faz delas moléculas ideais para o uso como carreador molecular, em interações do tipo hospedeiro-convidado. Nessa abordagem, moléculas hidrofóbicas interagem com o interior também hidrofóbico das cyclodextrinas e podem ser carreadas em ambientes aquosos devido a característica hidrofílica do exterior das cyclodextrinas (Wang *et al.* 2016).

1.3.4.2 *Cyclodextrinas como veículo molecular*

Na literatura as cyclodextrinas são muito utilizadas como veículos moleculares devido ao seu exterior hidrofílico e seu interior hidrofóbico, sendo utilizadas como carreadores de moléculas hidrofóbicos. (Kali; Haddadzadegan; Bernkop-Schnürch, 2024; Liu *et al.* 2024)

Ao pesquisar pelos termos “cyclodextrin” e “delivery” são encontrados 8873 e 8956 resultados, respectivamente nas bases de dados *scopus* e *web of Science*. Esses trabalhos são registrados desde o começo da década de 70 até hoje. (fig. 11)

Figura 11 - Trabalhos realizados sobre os termos “cyclodextrin” e “delivery” e o volume de trabalhos por ano desde 1973 no banco de dados *Scopus*.



8873 resultados

Adaptado de: base de dado *Scopus*

Utilizando a ferramenta de software VOSviewer (VOS, 2016) é possível analisar as palavras-chave, os países que mais pesquisam e a correlação entre os termos estudados.

Utilizando a base de dados *web of Science*, foram analisados todos os registros de pesquisas envolvendo os termos “cyclodextrin” e “delivery”. Foram encontradas 19636 palavras-chaves e as correlações entre os termos são vistos na figura 12.

Figura 12 - termos relacionados a pesquisa por “cyclodextrin” e “delivery” na base de dados *web of Science*.

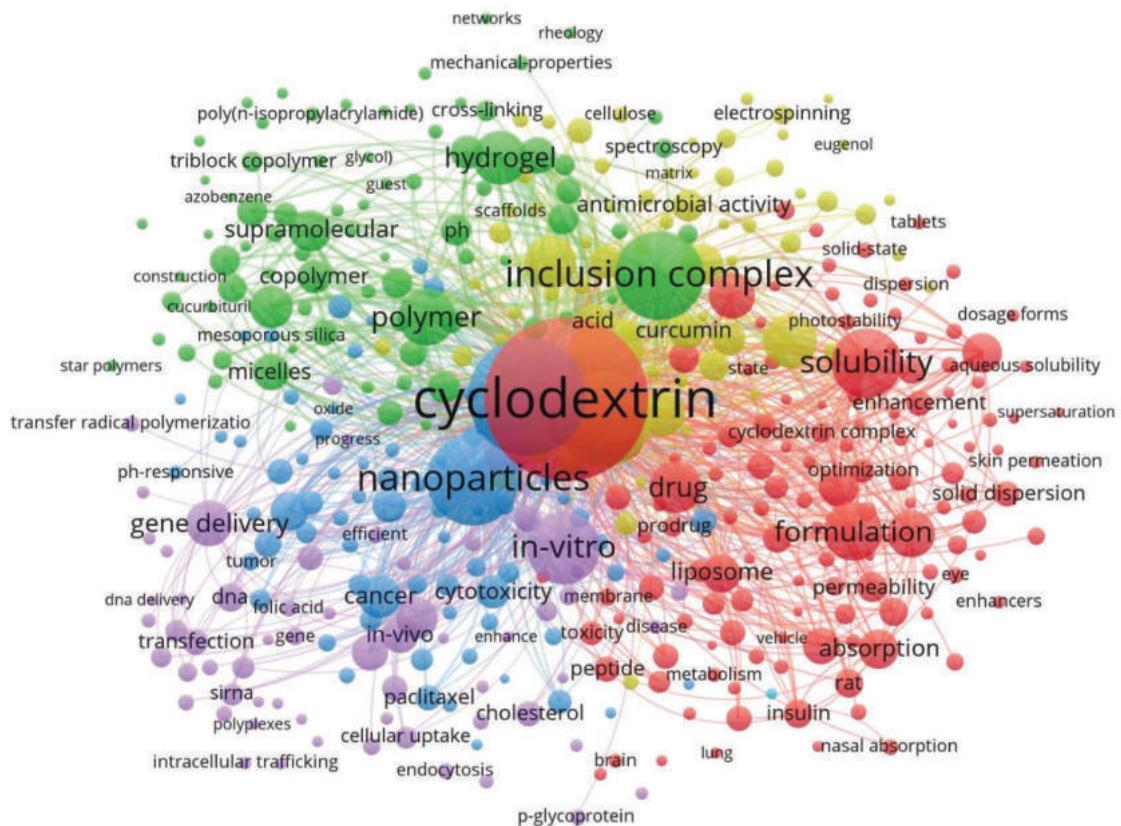


Imagen obtida pelo software *VOS Viewer*. (VOS, 2016)

Na figura 12 estão os termos mais vistos no histórico de pesquisas e suas correlações. Os termos são divididos por clusters de cores diferentes que indicam relação entre si. O tamanho das esferas indica a quantidade de vezes que esses termos foram citados e as linhas que os interligam mostram a relação entre termos.

O cluster vermelho, possui termos como “drug”, “formulation”, “solubility”, “optimization”, “adsorption”, indicando um dos grandes usos pesquisados na literatura para a ciclodextrina, a solubilização de moléculas hidrofóbicas.

O cluster verde possui termos como “supramolecular”, “inclusion complex”, “hydrogel”, “guest”, indicam assuntos relacionados a capacidade da ciclodextrina em formar complexos e a interação supramolecular com moléculas convidadas.

O cluster amarelo indica os termos relacionados a parte espectroscópica, caracterização e técnicas relacionadas as análises dos complexos formados com ciclodextrinas, com termos como “electrospinning” e “antimicrobial activity”.

O cluster roxo sugere termos relacionados a parte biológica de aplicação desses complexos formados com a ciclodextrina com termos como “in-vitro”, “in vivo”, “dna” e “gene”.

Há ainda um cluster menor formado com termos “nanoparticles”, “cytotoxicity”, “câncer” e “tumor”, ao que indica são termos relacionados ao uso dos complexos formados com a ciclodextrina em ação contra alvos específicos como câncer e tumores.

A análise dos artigos relacionados a ciclodextrinas mostram que, o seu uso utilizando química supramolecular para a formação de complexos, a caracterização, o uso biológico para moléculas hidrofóbicas com potencial uso farmacêutico/medicinal é a principal linha de pesquisa na literatura.

Pode se analisar também quais os países pesquisam por ciclodextrinas, qual a dinâmica, colaboração e correlação entre eles e como essa pesquisa foi feita ao passar do tempo. Essa análise pode ser vista na figuras 13 e 14.

Figura 13 - Análise da base de dados “web of Science” para a pesquisa “cyclodextrin” e “delivery” por países.

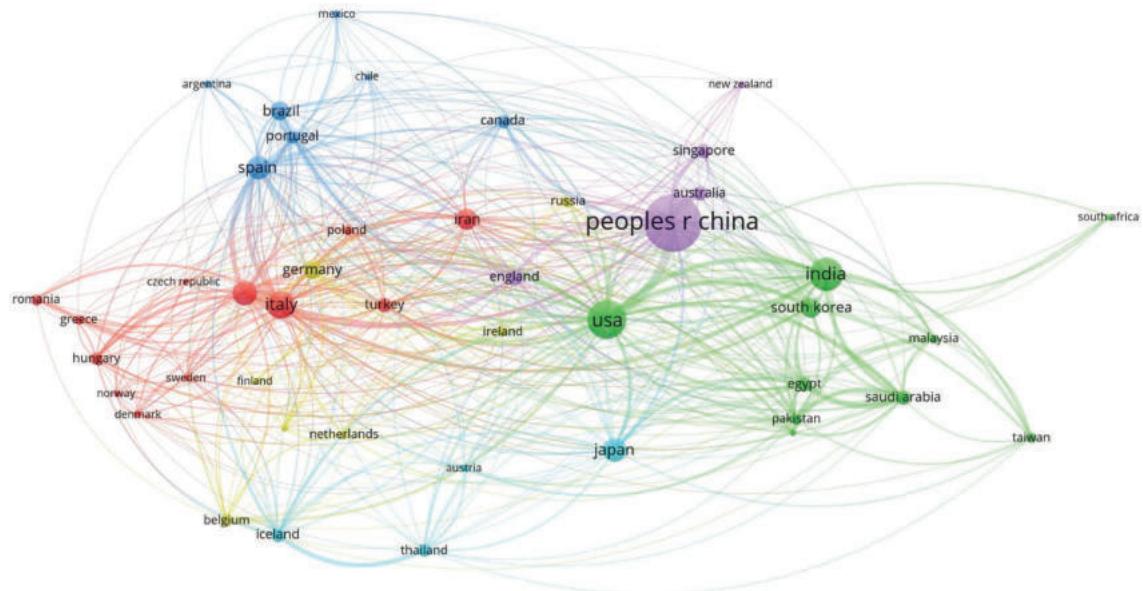


Imagen obtida pelo software *VOS Viewer*. (VOS, 2016)

Figura 14 - Análise da base de dados “web of Science” para a pesquisa “cyclodextrin” e “delivery” por países e por data.

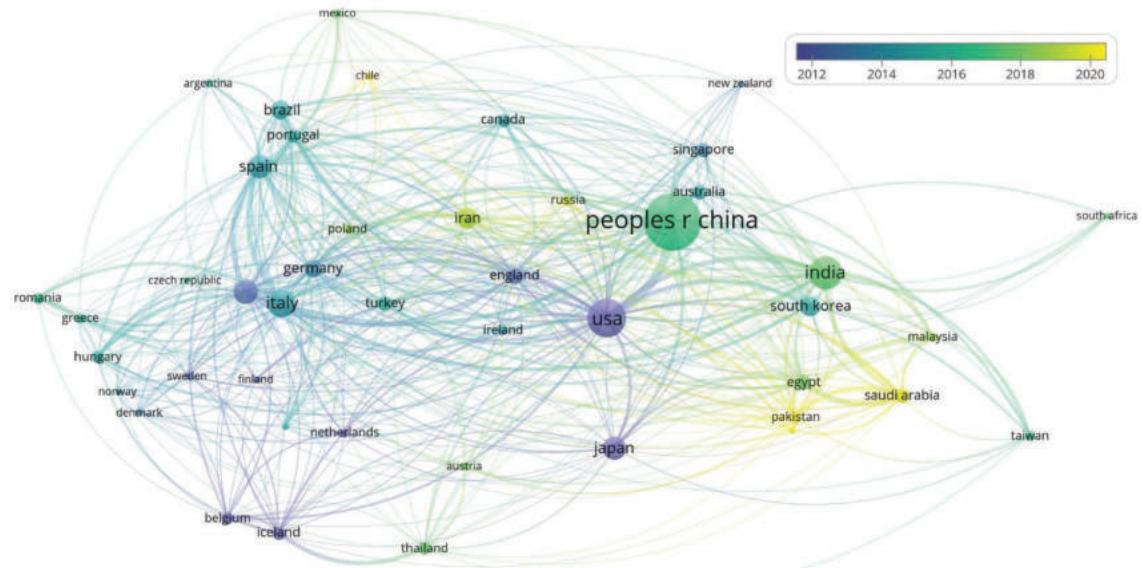


Imagen obtida pelo software *VOS Viewer*. (VOS, 2016)

As figuras 13 e 14, geradas pelo software VOSviewer possui a mesma dinâmica das demais geradas pelo mesmo software. As esferas têm tamanhos variados simbolizando a quantidade de trabalhos oriundos destes países. As linhas curvas indicam a relação desses países na pesquisa.

Na figura 13 também é possível observar a dinâmica de clusters com cores diferentes. Nota-se que países próximos geograficamente estão nos mesmos clusters. A correlação pelas relações internacionais desses países também pode ser observada, como os estados unidos interligado a países como Coréia do Sul e Japão. Os países que mais pesquisaram sobre ciclodextrinas e “delivery” foram a China, os Estados Unidos e a Índia.

Na figura 14 é possível ver a mesma análise da base de dados, porém as cores mostram as pesquisas em relação ao tempo. Quanto mais próximo ao violeta mais trabalhos antigos, quanto mais próximo ao amarelo mais recentes são os trabalhos. Isso dá uma ideia geral também da evolução dos trabalhos em relação a ciclodextrina pelo mundo em relação ao tempo. Os estados unidos, por exemplo, possuem o segundo maior acervo de pesquisas no mundo sobre esse tema, porém, a maior parte dos seus trabalhos são antigos, bem como em países como Japão, Holanda e nos países nórdicos como Suécia, Finlândia e Islandia. No Brasil essas pesquisas estão concentradas em trabalhos de pelo menos 5 anos atrás, assim como na vizinha argentina, em Portugal e na espanha. Os países com o volume de pesquisas mais recentes são o chile, irã, Rússia, Paquistão e a arábia saudita.

Dentre esses trabalhos da literatura que utilizam ciclodextrina para a formação de complexos e de entrega controlada, expõe-se os trabalhos mais recentes como o de Akash e coloaboradores (Akash *et al.* 2024) que utilizando beta-ciclodextrina modificada com grupamentos citrato, obtiveram um complexo com nanopartículas de cobre e com a molécula 5-fluoruracil, um quimioterápico utilizado para o câncer de mama. A utilização da ciclodextrina, segundo o autor, resultou em um controle do tamanho das partículas de cobre e um controle da sua área superficial, o que seria ponto primordial para a captura das moléculas usadas na quimioterapia, melhorando o controle e a entrega dessa molécula.

Augis e colaboradores (Augis *et al.* 2024) utilizaram ciclodextrinas modificadas com cadeias longas contendo grupamentos vinil ésteres com um controle do tamanho dessas cadeias e do grau de substituição das ciclodextrinas para formar uma rede de ciclodextrinas modificadas em forma de suspensão coloidal por nanoprecipitação.

Esses colóides formados por ciclodextrinas seriam capazes de interagir com diversos fármacos devido a interação das cadeias substituintes formando micelas e o seu interior hidrofóbico.

Chen e colaboradores (Chen *et al.* 2024) aumentaram a biodisponibilidade da molécula miricetina, um flavonóide com propriedades antioxidantes, utilizando gama-ciclodextrina em uma estrutura organo metálica (MOF, do inglês Metal organic framework). Os autores afirmaram que essa abordagem melhora o encapsulamento, e biodisponibilidade da molécula e na sua solubilidade. Ainda no mesmo trabalho os pesquisadores mostram, por testes *in vitro* que essa abordagem melhorou o desempenho da própria molécula de ciclodextrina sozinha, o que diz respeito ao encapsulamento e solubilidade da molécula encapsulada.

O trabalho de Cheng e colaboradores (Cheng *et al.* 2024) utilizou a beta-ciclodextrina com cinamaldeído, um óleo essencial, formando uma emulsão. Com as características hidrofílicas da ciclodextrina atreladas a característica hidrofóbica do cinamaldeído, os autores fizeram um compósito que serve como veículo molecular que posso trafegar na interface de fases aquosas e orgânicas. A utilização desse veículo foi feita para o transporte de alfa-tocoferol, a vitamina E. Os autores apontaram que esse tipo de veículo molecular é preciso para levar o fármaco no limite entre tecidos adiposos e fase aquosa.

Para o tratamento de artrite reumatóide utilizando o anti-inflamatório metorexato, Dang e colaboradores (Dang *et al.* 2024) utilizaram o método de encapsulamento para carrear o anti-inflamatório. Foi utilizado um sistema ternário entre micelas poliméricas e beta-ciclodextrina. O sistema foi feito pela técnica sol-gel e o produto final, segundo os autores, possuía toxicidade menor do que o anti-inflamatório livre e, o sistema de entrega controlada levava doses do medicamento parecidas com a do medicamento sozinho.

Ding e colaboradores (Ding *et al.* 2024) utilizaram um MOF nomeado UiO66 em seu trabalho. Formado por 12 unidades de 1,4-benzeno diácido carboxílico, é uma estrutura de grande área superficial utilizada em áreas como catálise, aplicações em biomedicina, adsorção de gás e eletroquímica. Neste trabalho em específico, os pesquisadores utilizaram este MOF junto a ciclodextrina devido a sua capacidade de encapsulamento para uma maior estabilidade química e térmica para utilização em entrega controlada de fármacos.

El-Sayed e colaboradores (El-sayed *et al.* 2024) utilizaram beta-ciclodextrina para o encapsulamento do octadecil propanoato. Utilizando as ciclodextrinas como hidrogel, o autor aponta em seu estudos que a ciclodextrina aumenta a solubilidade da molécula convidada, ajuda na permeabilidade nos testes in vitro e possui ação contra fungos como a *Candida albicans*.

Os estudos de Grygorova e colaboradores (Grygorova *et al.* 2024) utilizaram a beta-ciclodextrina acoplada a nanopartículas de óxido de cério como carreador de moléculas que produzem espécies oxigenadas reativas (EOR). A autora descreveu uma nova rota sintética para a criação desse veículo molecular contendo óxido de cério com ciclodextrinas e afirma que as ciclodextrinas além do seu papel de encapsular as moléculas alvo ainda ajuda na estabilidade para a formação de nanopartículas.

Hermenean e colaboradores (Hermenean *et al.* 2024) utilizaram além da beta-ciclodextrina sulfobutilada o calixareno, um outro macrociclo para o encapsulamento da crisina, um flavonoide com propriedades anti-inflamatórias com promissora atividade para fibrose e diabetes. Os autores utilizaram um sistema ternário com a ciclodextrina e o calixareno sendo ambos utilizados para o encapsulamento da crisina. Os autores indicaram que esse sistema ternário aumenta a solubilidade da crisina e ajuda para a entrega controlada dela em seu uso farmacológico.

Tongsheng Huang e colaboradores (Huang, T. *et al.* 2024) utilizaram a ciclodextrina para o uso em terapia fotodinâmica, mais especificamente para carrear moléculas fotossensibilizadoras que possam ser excitadas em comprimentos de ondas específicos e gerar espécies oxigenadas reativas (EOR) para a destruição das células cancerígenas. A estratégia dos pesquisadores foi a de criar um copolímero entre glicidol e beta-ciclodextrina com um fotossensibilizador enclausurado no tórus das ciclodextrinas. Os autores afirmaram que esse copolímero é biocompatível e que essa estratégia aumenta a solubilidade da espécie convidada e auxilia na entrega dela nas células alvo. Também trabalhando na área da terapia fotodinâmica para a geração de potenciais veículos moleculares para o uso contra tumores,

He e colaboradores (He *et al.* 2024) utilizaram ciclodextrina e cantaridina, uma molécula cíclica que, combinada com beta-ciclodextrina formaram nanopartículas capazes de carrear um peptídeo contendo dissulfeto de amantadina como sensibilizador. Os autores enumeram os benefícios do uso da ciclodextrina como

melhoria da toxicidade e melhora na entrega controlada e retenção do fotossensibilizador no tumor.

Yongpeng Huang (Huang, Y. *et al.* 2024) e colaboradores prepararam um veículo molecular utilizando ciclodextrinas e Polietilenoglicol (PEG) e ciclosporina, um medicamento imunossupressor. Diferentemente de outras abordagens os autores pretendiam nesse trabalho a utilização do complexo formado de forma a ser inalado e não uma formulação oral ou injetável. O veículo molecular usado com gama-ciclodextrina e PEG foi sintetizado pela técnica da difusão de vapores com o encapsulamento da ciclosporina. A ciclodextrina pela sua propriedade de formar complexos de inclusão foi imprescindível segundo os autores para a formulação de um produto para inalação. O autor ainda relata que essa formulação aumenta a biodisponibilidade em relação a formulação oral.

Zhou e colaboradores (Zhou *et al.* 2024) formularam um sistema carreador de moléculas bifuncional, utilizando anidrase carbônica, uma enzima que atua no transporte de CO₂ e beta-ciclodextrina para transportar metotrexato, um agente quimioterápico modificado com adamantano. O processo de auto-montagem foi utilizado para a produção das nanopartículas supramoleculares. O produto final conseguiu, segundo os autores, inibir a proliferação das células tumorais com o adicional de diminuir a toxicidade contra células sadias.

Ainda sobre quimioterápicos Kaur e Jindal (Kaur *et al.* 2024) trabalharam com 5-fluoruracil, utilizado para o tratamento de diferentes tipos de câncer, e beta-ciclodextrina para a formação de complexos de inclusão. O estudo se debruça em mostrar a melhoria para a utilização do fluorouracil quando encapsulado com ciclodextrina. Segundo os autores a constante de solubilidade aumenta quando o medicamento está encapsulado com ciclodextrina e seu valor aumenta em até 250% e ainda conta com vantagens como prevenir fotodegradação e aumentar no controle da entrega do fármaco no organismo.

Manikantan e colaboradores (Manikantan *et al.* 2024) também utilizaram o 5-fluorouracil em seu trabalho, utilizaram nanopartículas de sulfeto de praseodímio revestidas com policiclodextrinas como nano carreador para o 5-fluorouracil. Os autores indicaram pelos testes de IC₅₀ que a ação da molécula convidada aumenta encapsulada em relação a sua ação sozinha.

Junyan Li e colaboradores (Li, J. *et al.* 2024) utilizaram beta-ciclodextrina para o encapsulamento de um peptídeo modificado com adamantano para formar um

complexo para uso anti-cancer. Os autores utilizaram a terapia imunomodulatória com células alvo a serem atacadas para impedir o ciclo do tumor, o que é chamado de imunossupressão de micro eventos. A ciclodextrina é utilizada com nanopartículas de cobre com a abordagem supramolecular para, além de aumentar a solubilidade, ajudar a retenção da molécula convidada nas células tumorais.

Em seu trabalho, Lin e colaboradores (Li *et al.* 2024) estudaram o desenvolvimento de vacinas a partir da beta-ciclodextrina como veículo molecular. Utilizando células contendo antígenos (APCs) para provocar uma resposta imune no organismo encapsuladas em ciclodextrinas os autores afirmaram que ao utilizar essas moléculas encapsuladas em ciclodextrina pode diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficiência da entrega controlada, aumentando também a resposta imune pelo organismo.

1.3.4.3 Ciclodextrinas e a doença de chagas

Como visto no tópico anterior e nas pesquisas transformadas nas figuras 8-11 as ciclodextrinas tem um vasto campo de utilização como carreador de moléculas de baixa solubilidade, principalmente para o uso farmacêutico. Porém, as pesquisas relativas a ciclodextrinas e doença de Chagas são escassas e revelam a necessidade de mais pesquisas no assunto, como este trabalho se propõe.

Consultando a base de dados scopus combinando os termos “cyclodextrin” e “Chagas disease” são encontrados apenas 46 trabalhos nesta área, sendo um deles um artigo que surgiu da presente pesquisa.

Dentre os trabalhos mais recentes desenvolvidos destacam-se os de Alcantara e colaboradores (Alcantara *et al.* 2022) que estudaram um óleo essencial (*Croton rhamnfolioides*) com potencial anti Chagas e anti leishmaniose em um complexo com beta-ciclodextrina. Este óleo essencial, com baixa solubilidade em água foi encapsulado e os testes in vitro mostraram que o complexo formado possui ação contra o parasita da doença de Chagas com a melhor performance em solubilidade.

Barbosa e colaboradores, em seu trabalho (Barbosa *et al.* 2021) utilizaram a beta-lapachona, uma natural naftoquilonina com atividade tripanocida, porém com alta toxicidade e pouca solubilidade em água. Os autores utilizaram a metodologia da liofilização para obter o complexo com beta-lapachona e afirmam, através de testes in vitro que o valor de IC₅₀ do complexo é menor do que o do benznidazol (0,6 e 2,16

$\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente), porém com uma toxicidade mais baixa, segundo os autores.

Nos estudos de Bedogni e colaboradores (Bedogni *et al.* 2023) foram utilizadas duas ciclodextrinas como carreadores do Nifurtimox, um dos dois medicamentos aprovados para o tratamento da doença de Chagas. O autor utilizou as ciclodextrinas beta-ciclodextrina e sulfobutileter-ciclodextrina para aumentar a solubilidade e a taxa de dissolução do fármaco. O autor aponta em seu estudo que a estequiometria formada por ambas ciclodextrina é de 1:1, o complexo formado com sulfobutileter-ciclodextrina funciona melhor do que o complexo com a ciclodextrina nativa devido as modificações na estrutura da ciclodextrina. Além disso, o estudo mostra que a ciclodextrina é um veículo molecular estável para o uso farmacêutico. Os complexos foram guardados por 6 meses a temperaturas entre 25 e 40°C e mostrou a mesma dissolução do fármaco e não alterou sua cristalinidade.

Linciano e colaboradores (Linciano *et al.* 2024) em seu estudo trabalharam com a redutase de pteridina 1 (PTR 1), uma proteína com ação tripanocida e modificada com grupamentos nitro para aumentar a ação antiparasitária. Em seu estudo são testados a farmacocinética e a melhor composição de um complexo com hidroxipropil-beta-ciclodextrina em testes *in vitro*, chegando a conclusão de uma dosagem de 20mg/Kg da proteína encapsulada.

No estudo de Ndayishimiye e colaboradores (Ndayishimiye *et al.* 2021) foi utilizado o benznidazol, já conhecido fármaco para o tratamento da doença de Chagas encapsulado com gama-ciclodextrina para o aumento da solubilidade e da taxa de dissolução. O método de encapsulamento foi uma proposta de dissolver o benznidazol em dióxido de carbono em estado supercrítico e, a partir dessa solubilização, encapsular o benznidazol em ciclodextrina através da dissolução da mesma. Os autores afirmaram que o tempo para o equilíbrio foi alcançado em 10h e que a taxa de dissolução do fármaco aumentou em até 10x quando comparado ao fármaco sozinho.

No trabalho da autora Nicoletti (Nicoletti *et al.* 2023) e colaboradores foi estudado o uso de naftoquinonas com potencial antifúngico e antitrypanossoma. Para aumentar a solubilidade e utilizar um sistema de entrega controlada a autora encapsolou a naftoquinona em hidroxipropil-beta-ciclodextrina por rotas diferentes. Por dispensão ácida e utilizando o método mecanoquímico. A avaliação da autora mostrou que o IC_{50} dessa molécula para as formas epimastigotas e tripomastigotas

passou de 2,4 e 96,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, para 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para ambos os casos. Mostrando que a ciclodextrina além do aumento da solubilidade e da diminuição da toxicidade, através da entrega controlada pode também melhorar a ação da espécie convidada frente ao parasita.

Vasconcelos e colaboradores (Vasconcelos *et al.* 2021) investigaram vesículas extracelulares ligadas ao *Trypanosoma Cruzi*. Analisando os mecanismos intracelulares buscou-se levar azida de sódio encapsulada em metil-beta-ciclodextrina ao interior do parasita causando danos e impedindo a sua replicação. Foi proposto um mecanismo de ação para destruir a estrutura das membranas do parasita.

Assim como o presente estudo o trabalho de Pozo-Martinez e colaboradores (Pozo-Martinez *et al.* 2022) investigou a ação de uma cumarina modificada com potencial tripanocida. O autor sintetizou uma série de cumarinas modificadas sendo a cumarina com maior potencial anti Chagas uma cumarina contendo um anel bromofenil-(3-(4-bromofenil)-6,7-dihidroxicumarina), assim como a cumarina utilizada no presente estudo. A cumarina em questão também sofre com baixa solubilidade para o uso farmacêutico, assim o autor utilizou beta-ciclodextrina para a complexação. O método de co-solventes foi utilizado, onde a ciclodextrina e a molécula convidada são solubilizadas em diferentes solventes e suas soluções são misturadas para promover a inclusão e formação do complexo. O autor também indica que o complexo é ativo contra as formas tripomastigotas do parasita em testes *in vitro* com o valor de IC_{50} de $34\mu\text{mol.L}^{-1}$.

2. SÍNTSE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO DA 2-HIDROXIPROPIL BETACLODEXTRINA COM A E)-3-(4-Bromofenil)-1-(4,8-dimetoxinaftalen-1-il)prop-2-en-1-ona)

2.1 PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1 Materiais

Tabela 1: Reagentes utilizados e suas respectivas marcas

Acetonitrila	TEDIA (99,9%)
DMSO (D6)	Cambridge Isotope laboratories (99,9%)
HpBCD	Sigma Aldrich (99,8%)

2.1.2 Métodos

2.1.2.1 Espectrofotometria na região do UV-vis em solução

Para encontrar a razão estequiométrica entre CHC e HpBCD, foi utilizado o método de variação contínua (método de Job) (Mura, 2014; Collum *et al.* 2013). Usando 1:1 acetonitrila:água como solvente, 11 amostras foram preparadas, cada uma contendo um total de 1×10^{-7} mol em 2mL de solução, variando assim a fração molar de CHC de 0 a 1 sem alterar o número total de mols. O estudo foi feito com amostras duplicadas. Os espectros UV-vis foram obtidos a partir dessas amostras.

A razão estequiométrica do complexo hospedeiro-convidado [HC] também foi obtida a partir do modelo de Benesi-Hillebrand (Tablet; Matei; Hillebrand, 2012) ajustado a dados experimentais. A constante de associação aparente do complexo formado foi calculada usando esta relação gráfica. Neste conjunto de experimentos, a mistura 1:1 acetonitrila:água foi empregada como solvente. Cada amostra continha 2ml de solução. Neste estudo, 20 amostras foram preparadas variando as concentrações de HpBCD de 1×10^{-5} mol/L a $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol/L, com uma concentração

fixa de CHC de 1×10^{-5} mol/L em cada amostra. Os espectros UV-vis foram obtidos das amostras.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) foram obtidos em um espectrômetro Varian modelo Cary 1E. As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico e foram medidas na faixa de 200 a 900 nm.

2.1.2.2 Caracterização por espectroscopia de RMN de hidrogênio

Os espectros de RMN de hidrogênio foram obtidos usando um espectrômetro Bruker 400 MHzXRD-400. As amostras foram preparadas em tubos de RMN utilizando 10 mg de material e 0,6 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSOD6), com tetrametilsilano de padrão interno.

Os espectros de gradiente de campo de pulso (PFG) foram adquiridos usando pulsos de gradiente bipolar para difusão. Os coeficientes de difusão foram medidos aumentando a amplitude dos pulsos de gradiente de campo em oito etapas (0,68 – 13,62 G cm⁻¹). A duração do pulso de gradiente de campo (10 ms) e o tempo de difusão (20 ms) foram constantes.

2.1.2.3 Síntese do complexo hospedeiro-convidado em estado sólido

O complexo hospedeiro-hóspede CHC:HpBCD foi obtido por três diferentes rotas: liofilização, método mecanoquímico e calcinação.

Para liofilização, 10mg de CHC foram adicionados a 50ml de solução aquosa de HpBCD $7,5 \times 10^{-1}$ mol/L sob agitação por 24h a 25°C. A solução foi filtrada, utilizando funil de Buchner, vertida em uma placa de petri de 60 x 15mm e levada ao congelador. Após congelada a amostra foi liofilizada utilizando um liofilizador L101 – Liotop, Nº 91721 a uma temperatura de -54°C e pressão de 52mmHg até restar um pó branco.

No método mecanoquímico, 150 mg de uma mistura de proporção 1:1 CHC:HpBCD foram colocados em um moinho de bolas Vibrator modelo P21 série 798.

Essa mistura permaneceu por 3h no processo de moagem. Após o processo a amostra foi guardada em eppendorf e levada as posteriores caracterizações.

No processo de calcinação, 150mg de uma mistura de proporção 1:1 CHC:HpBCD foram calcinados a 180°C por 3h em uma mufla ZEZIMAG N1040. Após resfriamento até a temperatura ambiente, a amostra foi guardada em eppendorf e levada as caracterizações posteriores.

Cada amostra foi caracterizada por difração de raios X em pó (DRX), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e/ou análise termogravimétrica (TG).

2.1.2.4 Caracterização do complexo em estado sólido

Os espectros de FTIR foram obtidos no espetrômetro Nicolet Magna-IR 760 com 16 acumulações e 4 cm⁻¹ de resolução na região de 4.000-400 cm⁻¹. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr na proporção de 100:1 p/p entre sal e amostra.

Os difratogramas de raios X foram obtidos com um equipamento Rigaku, modelo Ultima IV, com gerador de raios X de alta frequência (3kW), tubo de raios X Cu ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$), foco normal (2kW), Universal Theta- Goniômetro 2Theta com raio de 185 mm, slots fixos e filtro K β Ni, com tensão de 40 kV e corrente de 20 mA. Foram utilizadas faixas de $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$, com etapas de $0,05^\circ$ e tempo por etapa de 1 segundo.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um microscópio JEOL JSM—6510LV (Jeol technics Ltd, Tóquio, Japão) operando com tensão de 5 kV.

As curvas termogravimétricas foram obtidas por um analisador SHIMADZU, modelo DTG60, aquecendo 10-15 mg da amostra em intervalos de temperatura definidos com uma velocidade de aquecimento de $5^\circ \text{ C min}^{-1}$, sob um fluxo de 50 ml min⁻¹ de argônio.

2.1.2.5 Método computacional

A estrutura otimizada e o FTIR teórico de CHC foram obtidos usando o nível de teoria DFT/B3LYP. O método híbrido Becke-3-Parameter-Lee-Yang-Parr (B3LYP) (Lee; Yang; Parr, 1988) com um conjunto de base 6-311G * foi usado no programa *Spartan 10*. (*Spartan 10*)

2.1.2.6 Citotoxicidade para células de mamíferos

A linha celular LLCMK2 (Kidney Epithelial Cells of Macaca mulatta, CCL-7, ATCC, USA) foi mantida em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) e foi suplementada com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen), 2 mM L-glutamina, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL, tilosina 1% e CO₂ 5% a 37 °C. As células de mamíferos, $2,5 \times 10^5$ células/mL, foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h (Mosmann, 1983). As células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS estéril. O meio contendo diferentes concentrações de CHC e os complexos HpBCD:CHC (3,12–400 µg/mL) foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por mais 48 h. Células cultivadas apenas em meio de crescimento foram usadas como controle. A viabilidade celular foi determinada pela redução do sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - MTT (Merck, Alemanha), seguindo a recomendação do fabricante. A concentração (CC50) que corresponde à concentração de compostos necessária para inibir as células viáveis em até 50% foi calculada por análise de regressão. O índice de seletividade (IS) foi calculado usando a equação: IS = CC50/ IC50, onde IC50 corresponde à concentração mínima dos compostos que causam 50% da atividade antitripanossônica. (Mosmann, 1983)

2.1.2.7 Uso do *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y do *Trypanosoma Cruzi* foi utilizada em todos os ensaios. Os epimatiogotas foram mantidos por transferências semanais em meio de infusão hepática de triptose

(LIT) (Camargo, 1964) e suplementados com 10% de FBS inativado pelo calor a 28 °C. As células obtidas de incubações de 4 dias foram utilizadas nos ensaios.

2.2.1.8 Efeito sobre o crescimento de epimastigotas

Epimastigotas ($1,0 \times 10^6$ células/mL) na fase de crescimento exponencial foram inoculados em uma placa de 24 poços contendo meio LIT-FBS com diferentes concentrações de compostos (6,25–100 µg/mL). As culturas foram incubadas a 28 °C e o crescimento celular foi estimado por contagem direta em hemocitômetro (Improved Double Neubauer) após 72h. Os poços contendo apenas meio de crescimento e meio mais 1% de DMSO foram usados como controle. As amostras utilizadas no teste foram CHC e os complexos HpBCD:CHC obtidos por calcinação, liofilização e moagem. As soluções de estoque das respectivas amostras foram preparadas em DMSO com uma concentração inicial de 1000 µg/mL. Os resultados foram expressos como a concentração mínima dos compostos que causam 50% (IC50Epi) de inibição do crescimento em comparação com o controle não tratado.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Caracterização em solução

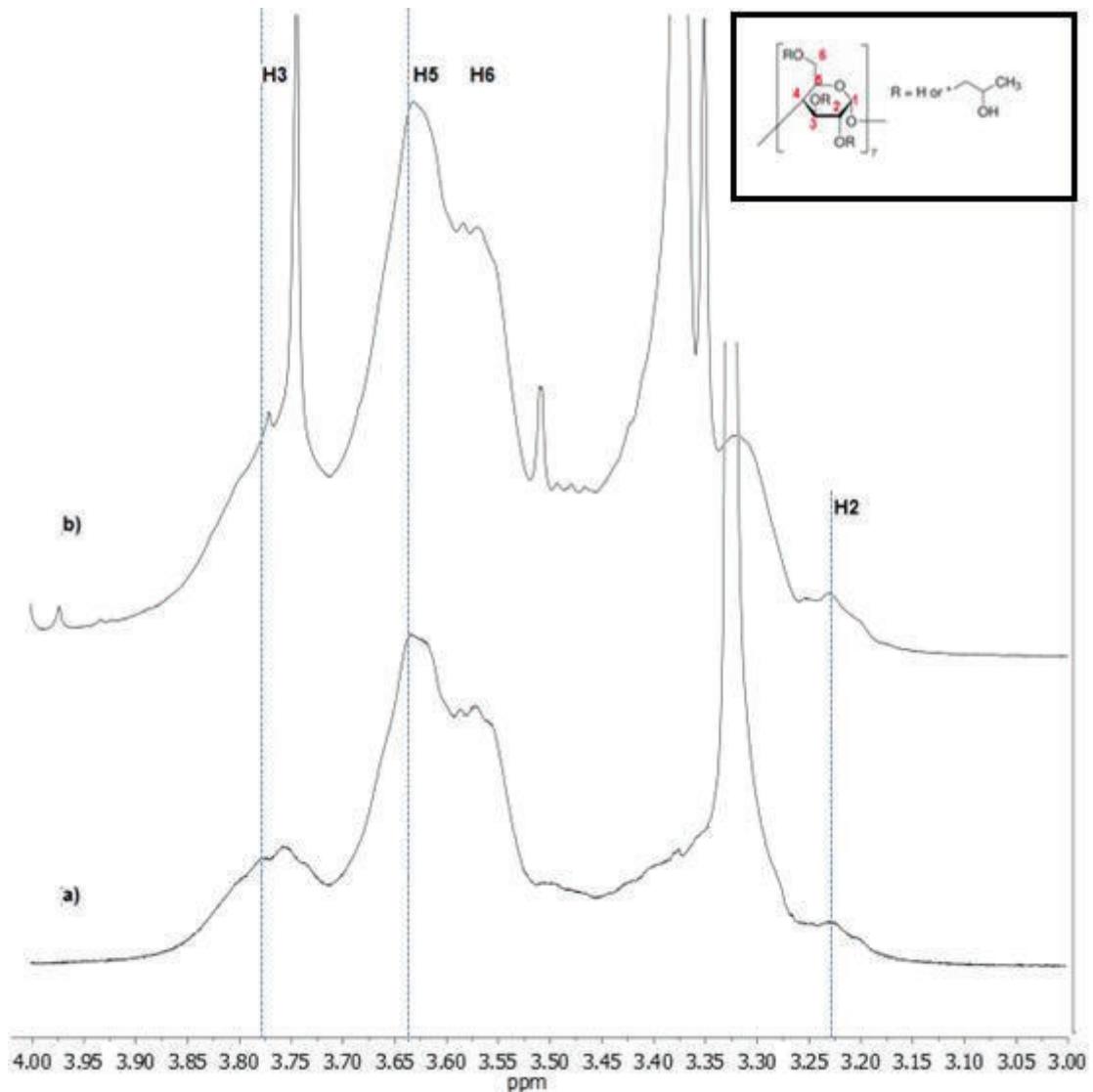
2.2.1.1 *Espectroscopia de RMN de hidrogênio*

A partir das variações de deslocamento químico obtidas no estudo de espectroscopia de RMN de hidrogênio, é possível determinar os hidrogênios mais afetados entre as duas espécies na formação do complexo hospedeiro-convidado e entender a topologia dessa inclusão.

Foram preparadas amostras considerando relações HpBCD:CHC de 1:0,2 para sondagem de distúrbios dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de HpBCD; e amostras considerando as razões HpBCD:CHC de 5:1 e 10:1 para monitorar os deslocamentos químicos dos hidrogênios do CHC. Mudanças de deslocamentos químicos para essas amostras foram consideradas em relação ao HpBCD e CHC puros.

Os sinais ^1H referentes a HpBCD, mostrados na Fig. 15, evidenciaram que na complexação com CHC há um deslocamento dos sinais de Hidrogênio dentro da cavidade (H3 e H5), enquanto o mesmo efeito não é observado para outros hidrogênios HpBCD (Fig. 15; Tabela 2). Este resultado pode ser atribuído ao fenômeno de anisotropia magnética do anel aromático de CHC aplicado aos prótons H3 e H5 do HpBCD. A anisotropia magnética ocorre com a aproximação de grupos ricos em elétrons π , como os anéis aromáticos, originados das espécies convidadas. A ressonância desses anéis induz um efeito de blindagem nos hidrogênios internos do HpBCD e este resultado sugere a inclusão da molécula convidada. (Inoue, 1993; Nogueiras-Nieto *et al.* 2012; Bensouiki *et al.* 2022)

Figura 15 - Espectros RMN ^1H RMN de: a) HpBCD; b) solução contendo HpBCD:CHC na proporção de 1:0,2. No inset: molécula e numeração dos hidrogênios do HpBCD



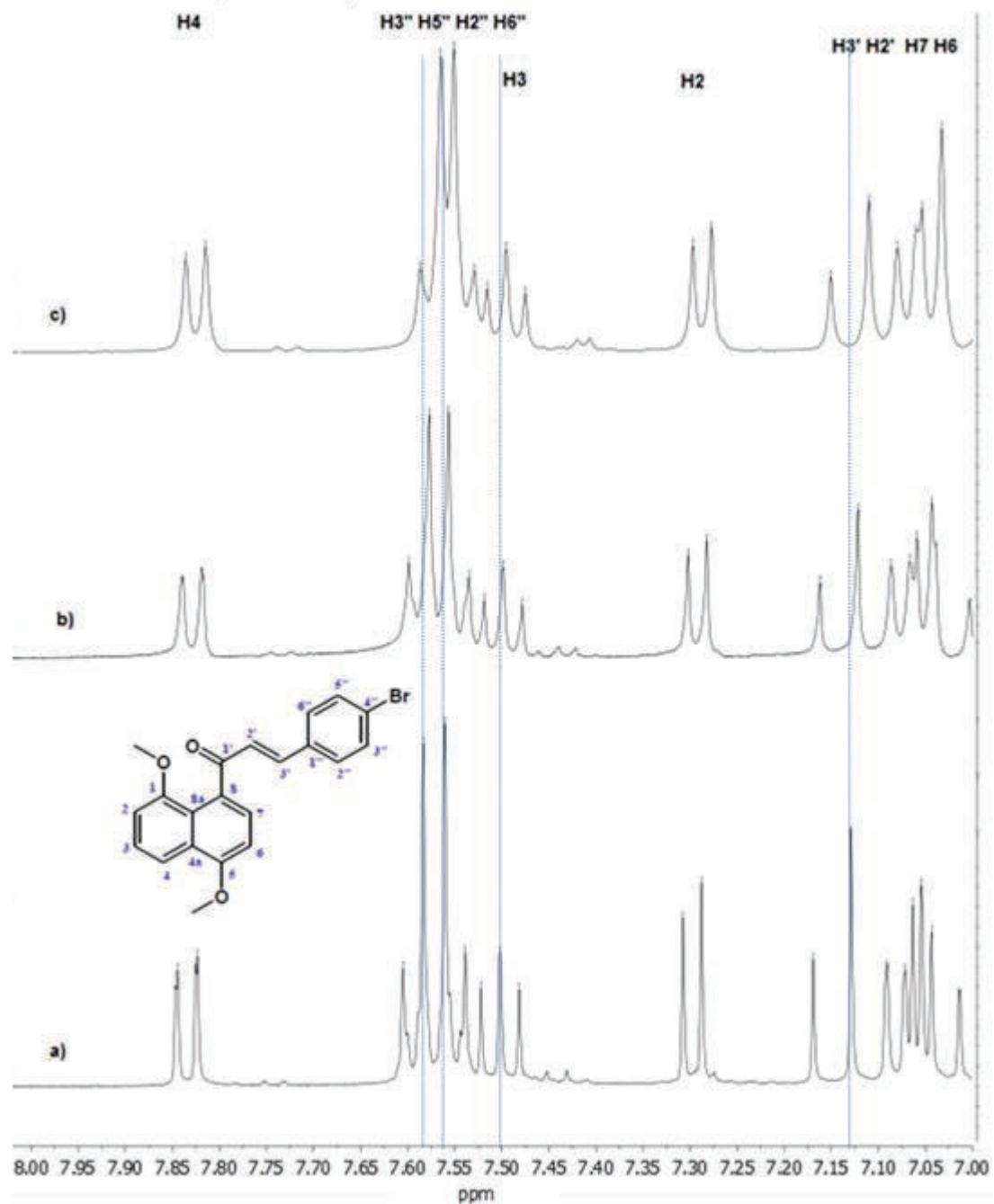
Fonte: O autor

Os espectros de RMN ^1H da CHC “livre” e complexada (Fig. 16, Tabela 3) mostram que todos os prótons de CHC sofreram um efeito de blindagem na presença de HpBCD. Porém, os sinais mais afetados com a presença da ciclodextrina foram os hidrogênios da porção bromofenil (H3"; H5"; H2"; H6") e os hidrogênios olefínicos próximos a este anel aromático (H2'; H3'). Esse resultado sugere que a inclusão da molécula ocorre por essa parte da estrutura. Este resultado é apoiado pela literatura. Tohng Liu *et al* (Liu, T. *et al.* 2021) estudaram a formação de um complexo entre

cyclodextrinas e cavacol, um potente antibacteriano. A análise dos espectros de RMN de hidrogênio mostra uma blindagem dos sinais de prótons das espécies convidadas com ênfase nos sinais de Hidrogênio do anel aromático incluído na cavidade da cyclodextrina.

Assim, os resultados da espectroscopia de RMN de hidrogênio sugeriram que ocorreu a interação hospedeiro-convidado que está relacionada à blindagem dos hidrogênios do bromofenil pertencentes a CHC, bem como dos prótons internos na cavidade do HpBCD (Bramhane *et al.* 2016; Deng *et al.* 2022; Sun *et al.* 2021)

Figura 16 - Espectros de RMN ^1H de: a) CHC; b) solução contendo HpBCD:CHC na proporção de 5:1 e c) solução contendo HpBCD:CHC na proporção de 10:1. Atribuição dos hidrogênios da região aromática de CHC também constam na figura.



Fonte: O autor

Tabela 2: Mudanças químicas dos prótons de HpBCD livre e em HpBCD:CHC. (Hidrogênios indicados na Fig. 15)

H atribuído	δ HpBCD _{livre}	δ HpBCD 1:0.2 CHC	$\Delta\delta^a$
H3	3,774	3,765	-0,009
H5	3,631	3,628	-0,003
H6	3,375	-	-
H2	3,231	3,231	0

Tabela 3: Mudanças químicas dos prótons de CHC livre e em HpBCD:CHC.(Hidrogênios indicados na Fig. 16)

H atribuído	δ CHC _{livre}	δ HpBCD 5:1 CHC	$\Delta\delta^a$	δ HpBCD 10:1 CHC	$\Delta\delta^a$
H4	7,833	7,827	-0,006	7,825	-0,008
H3"; H5"	7,594	7,588	-0,006	7,576	-0,018
H2"; H6"	7,550	7,546	-0,004	7,540	-0,01
H3	7,502	7,499	-0,003	7,496	-0,006
H2	7,298	7,292	-0,006	7,287	-0,010
H3'; H2'	7,130	7,123	-0,007	7,112	-0,018
H7	7,068	7,063	-0,005	7,057	-0,011
H6	7,049	7,041	-0,008	-	-
OCH ₃	3,885	3,878	-0,007	3,873	-0,012
OCH ₃					

^a $\Delta\delta = \delta(\text{complexo}) - \delta(\text{livre})$

2.2.1.2 Espectroscopia UV-vis

Para a determinação da relação estequiométrica hospedeiro convidado (HC) foi utilizado o método de Job, (Fig. 17) conforme procedimento da seção experimental 2.1.2.1, monitorando a banda UV em 295nm designada como a banda de transição $\pi-\pi^*$ da molécula CHC. (Ekbote *et al.* 2017) Na Fig. 17, é possível observar que o ponto máximo da curva foi relativo à fração molar 0,5 de CHC. Este resultado está relacionado com uma proporção molar de HC de 1:1, pois a fração molar da espécie convidada é dada pela média das concentrações da espécie convidada e do hospedeiro com o resultados no centro dos extremos .

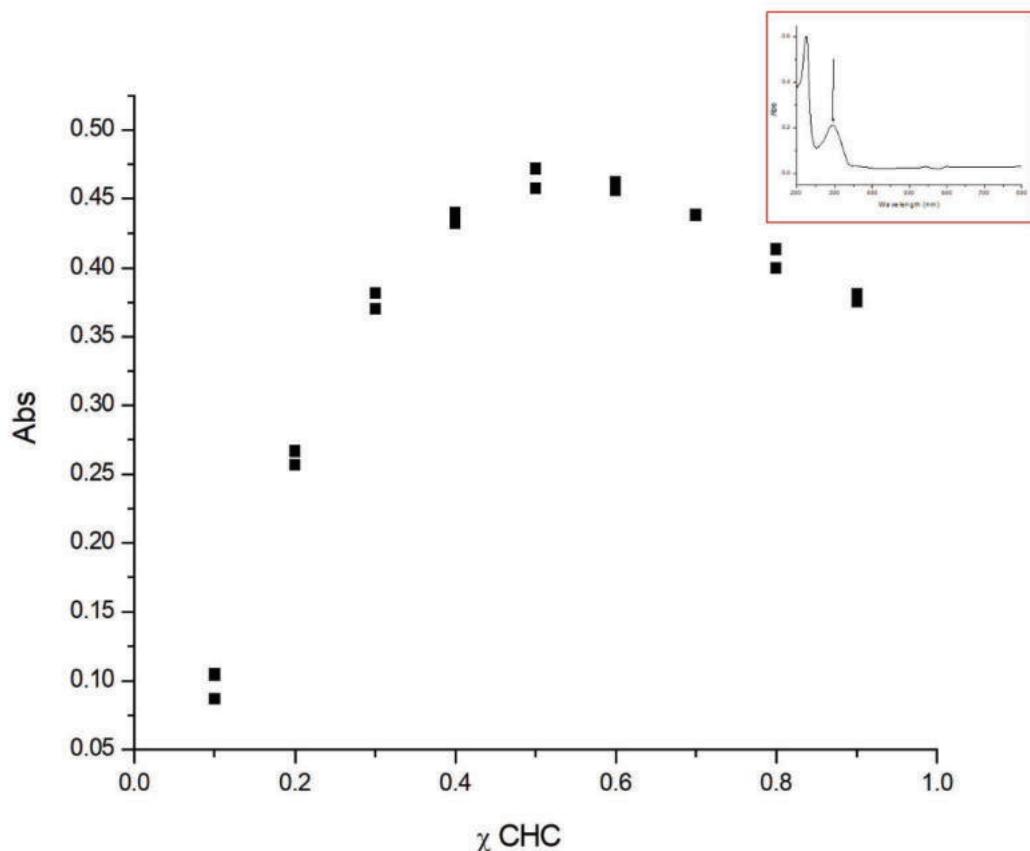
Para obter a constante de associação por titulação espectrofotométrica na região do UV-vis, a banda de transição $\pi-\pi^*$ em 295 nm também foi sondada. O modelo de Benesi-Hildebrand foi aplicado considerando dois modelos relacionados a interações 1:1 e 1:2 CHC:HpBCD. (Figura 18 e 19)

Os modelos utilizados levam em consideração as equações 1 e 2, onde Δabs é a subtração da absorbância de CHC livre da absorbância observada; $abs_{CHC:CD}$ é a absorbância do complexo hospedeiro-convidado; abs_{CHC_0} é a absorbância de CHC livre; $[CD]$ é a concentração molar de HpBCD; K_{11} e K_{12} são as constantes de associação para uma estequiometria 1:1 e 1:2, respectivamente.

$$\frac{1}{\Deltaabs} = \frac{1}{(abs_{CHC:CD} - abs_{CHC_0})K_{11}[CD]} + \frac{1}{(abs_{CHC:CD} - abs_{CHC_0})} \quad \text{Eq. 1}$$

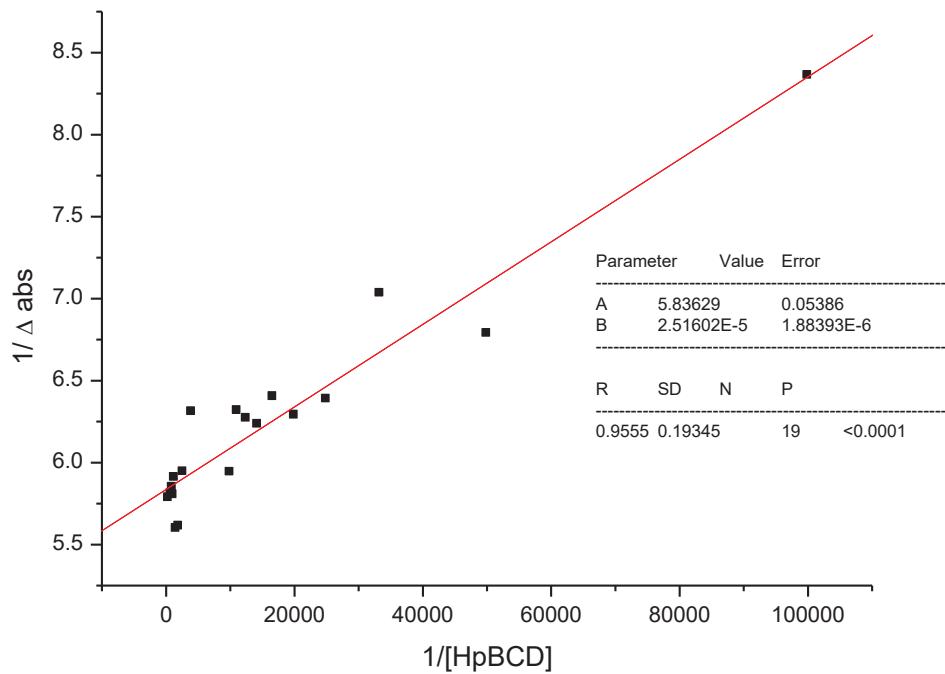
$$\frac{1}{\Deltaabs} = \frac{1}{(abs_{CHC:CD} - abs_{CHC_0})K_{12}[CD]^2} + \frac{1}{(abs_{CHC:CD} - abs_{CHC_0})} \quad \text{Eq. 2}$$

Figura 17 - Método de Job para a interação entre HpBCD e CHC. No detalhe, o espectro de UV-vis de CHC.



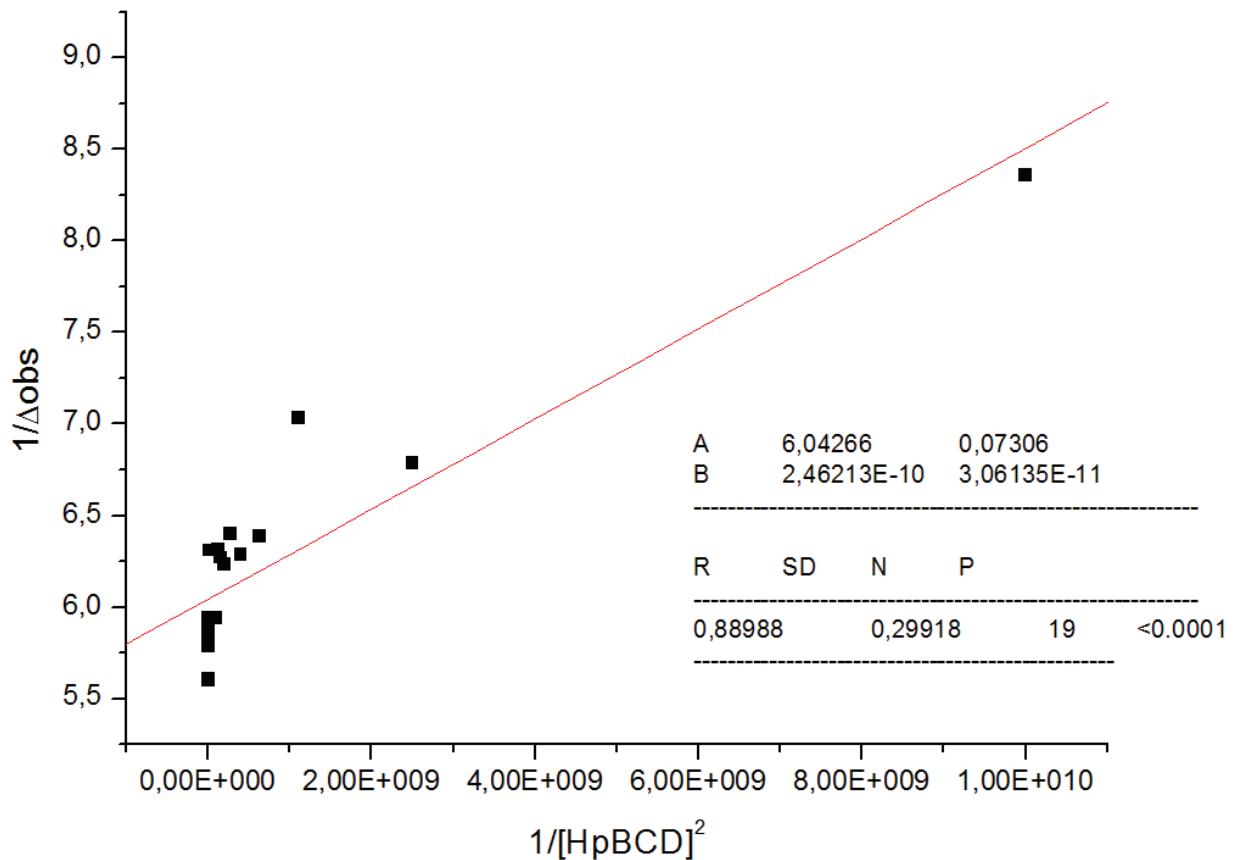
Fonte: O autor

Figura 18 - Gráfico de Benesi–Hildebrand para a associação entre CHC:HpBCD na razão estequiométrica de 1:1.



Fonte: O autor

Figura 19 - Gráfico de Benesi–Hildebrand para a associação entre CHC:HpBCD na razão estequiométrica de 1:2.



Fonte: O autor

O ajuste linear considerando a razão molar 1:1 forneceu o maior valor de R^2 ($R^2 = 0,9555$) corroborando o método de Job. Porém, a constante calculada, apresentou um valor de $\pm 2,3 \cdot 10^5$. Este valor, face às perturbações verificadas no RMN de hidrogênio, pareceu incoerente. No entanto, deve-se ter em mente que esses experimentos foram realizados em água:acetonitrila, um solvente no qual o CHC não apresenta boa solubilidade. Por outro lado, os experimentos de RMN de hidrogênio foram realizados em DMSOD6, um solvente no qual o CHC é muito mais solúvel, o que enfraquece a interação hospedeiro-convidado.

2.2.1.3 Espectroscopia Ordenada por Difusão (DOSY)

Desta forma, experimentos DOSY foram realizados como forma de calcular os coeficientes de difusão (D) do complexo e do CHC “livre” e assim obter a constante de associação utilizando o mesmo solvente usado nas medidas de RMN ¹H. Este cálculo foi realizado conforme relatado por Malta, *et al.* (Malta *et al.* 2008)

O coeficiente de difusão observado para o complexo (D_{obs}) é uma média ponderada dos coeficientes de difusão CHC livre (D_{liv}) e encapsulado (D_{enc}).

$$D_{obs} = X_{liv}D_{liv} + X_{enc}D_{enc} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde as frações molares de CHC livre e encapsulado são X_{liv} e X_{enc}, respectivamente, e X_{liv} + X_{enc} = 1. Considerando uma estequiometria 1:1:

$$K = \frac{[\text{complexo}]}{[\text{HpBCD}] [\text{CHC}]} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde [complexo], [HpBCD] e [CHC] são as concentrações do complexo formado, HpBCD e CHC no equilíbrio, respectivamente. Pode-se deduzir que as concentrações de HpBCD e CHC são iguais no equilíbrio, então:

$$K = \frac{[\text{complexo}]}{[\text{CHC}]^2} \quad \text{Eq. 5}$$

Uma vez que [complexo] = X_{enc}[CHC]₀ e [CHC] = X_{liv}[CHC]₀, onde [CHC]₀ é a concentração inicial de CHC (2,43 . 10⁻³ mol/L) pode-se modificar a Eq. 5 para:

$$K = \frac{10^5 X_{enc}}{243 X_{liv}^2} \quad \text{Eq. 6}$$

Da Eq. 6 e com os dados de D da tabela 4 é possível chegar ao valor da constante de associação para este complexo de 61.

Tabela 4: Coeficientes de difusão (D) e valor da constante de estabilidade (K) para o complexo de inclusão.

	D (x 10 ⁻¹⁰ m ² s ⁻¹)	K
CHC	2,26 (D _{liv})	-
HpBCD	0,885 (D _{enc})	61
HpBCD:CHC		
CHC em HpBCD:CHC	2,1 (D _{obs})	

Como pode ser visto, o valor da constante obtido nos experimentos DOSY é 3 ordens de grandeza menor que o valor obtido na espectroscopia UV-Vis. Deve-se notar que segundo esta última técnica foi avaliado apenas um comprimento de onda, o que leva em conta apenas a perturbação que uma parte da molécula de CHC sofre com a complexação com a ciclodextrina; ao contrário dos experimentos DOSY em que a propriedade medida leva em conta as modificações não covalentes sofridas por toda a molécula de CHC. Além disso, as diferenças de sistema de solventes e de princípios físicos das técnicas utilizadas na determinação da constante de associação também ajudam a explicar a discrepância entre os valores.

2.2.2 Caracterização em estado sólido do complexo hospedeiro-convidado

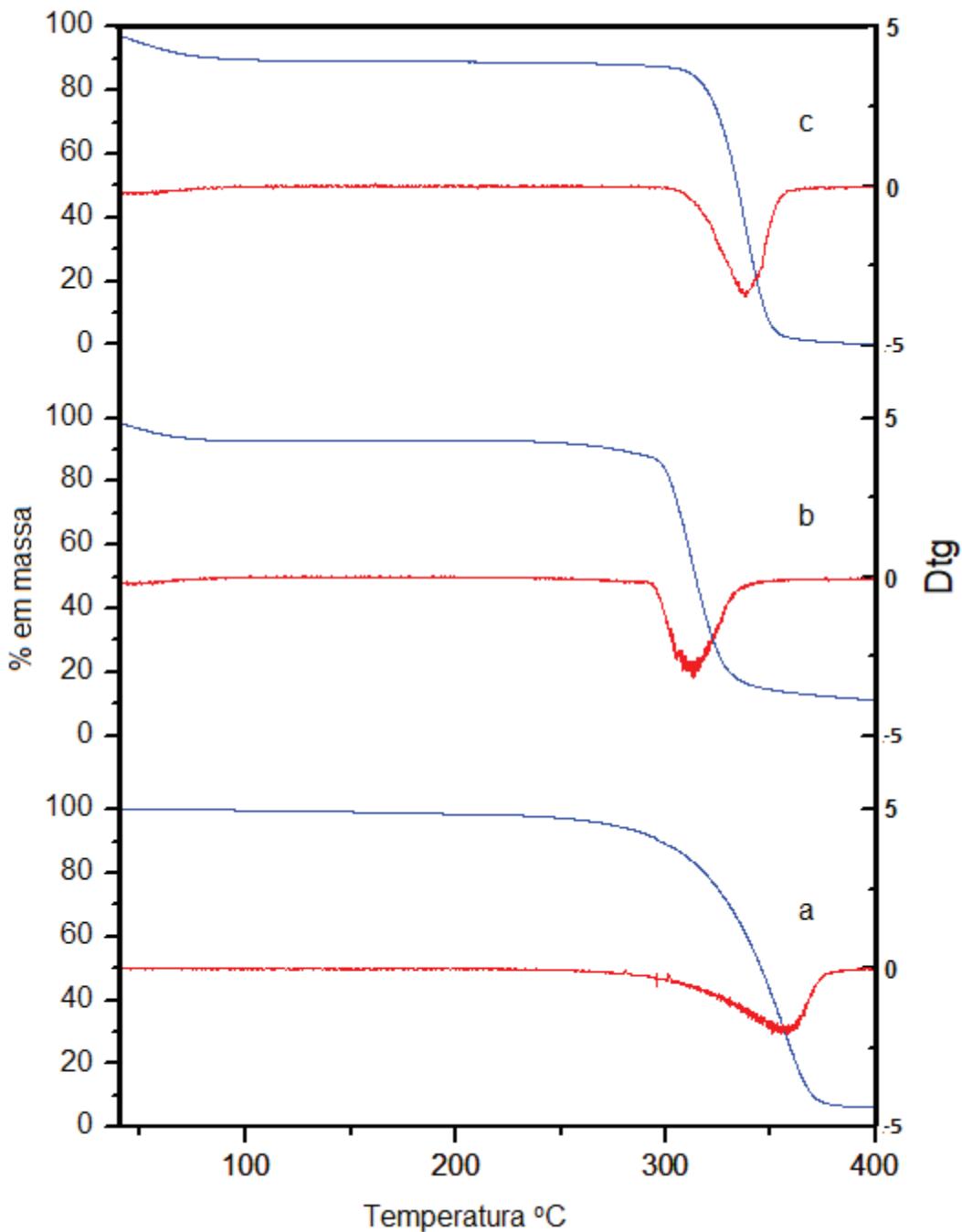
2.2.2.1 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica é uma ferramenta importante para o entendimento e caracterização do complexo obtido. Inicialmente as curvas de termogravimetria e termogravimetria derivada (TG;DTG. Fig. 20) foram obtidas para três amostras: CHC, HpBCD e a mistura mecânica (MM). Pode-se observar para temperaturas abaixo de 100°C, uma perda de massa para amostras de HpBCD e MM designada como perda de água (Zoppetti *et al.* 2007). Essas moléculas de água são

aquelas dentro da cavidade de HpBCD, que está presente em ambas as amostras. As amostras de CHC e HpBCD tiveram, cada uma, sua maior perda de massa nos intervalos de temperatura de 280°C – 375°C e 300°C – 360°C, respectivamente. A amostra MM teve um perfil de perda de massa diferente, perdendo teor significativo em temperaturas mais baixas do que as outras amostras, entre 280°C – 350°C. Essas perdas de massa são principalmente relativas à liberação de compostos orgânicos voláteis da estrutura das ciclodextrinas (Udrescu *et al.* 2015). Uma explicação para esse resultado pode ser dada pela formação *in situ* do complexo de inclusão entre CHC e HpBCD, presente na MM: Ao aquecer, ocorre primeiramente a fusão do CHC a 162°C (Albuquerque *et al.* 2021) seguida do contato entre os reagentes antes da decomposição tanto do hospedeiro quanto do hóspede, possibilitando a formação do complexo CHC:HpBCD, que teria um perfil TG/DTG diferente dos perfis de HpBCD e CHC livres.

Esses resultados da análise de TG/DTG permitiram a proposta de preparação do complexo de inclusão usando a via térmica por calcinação.

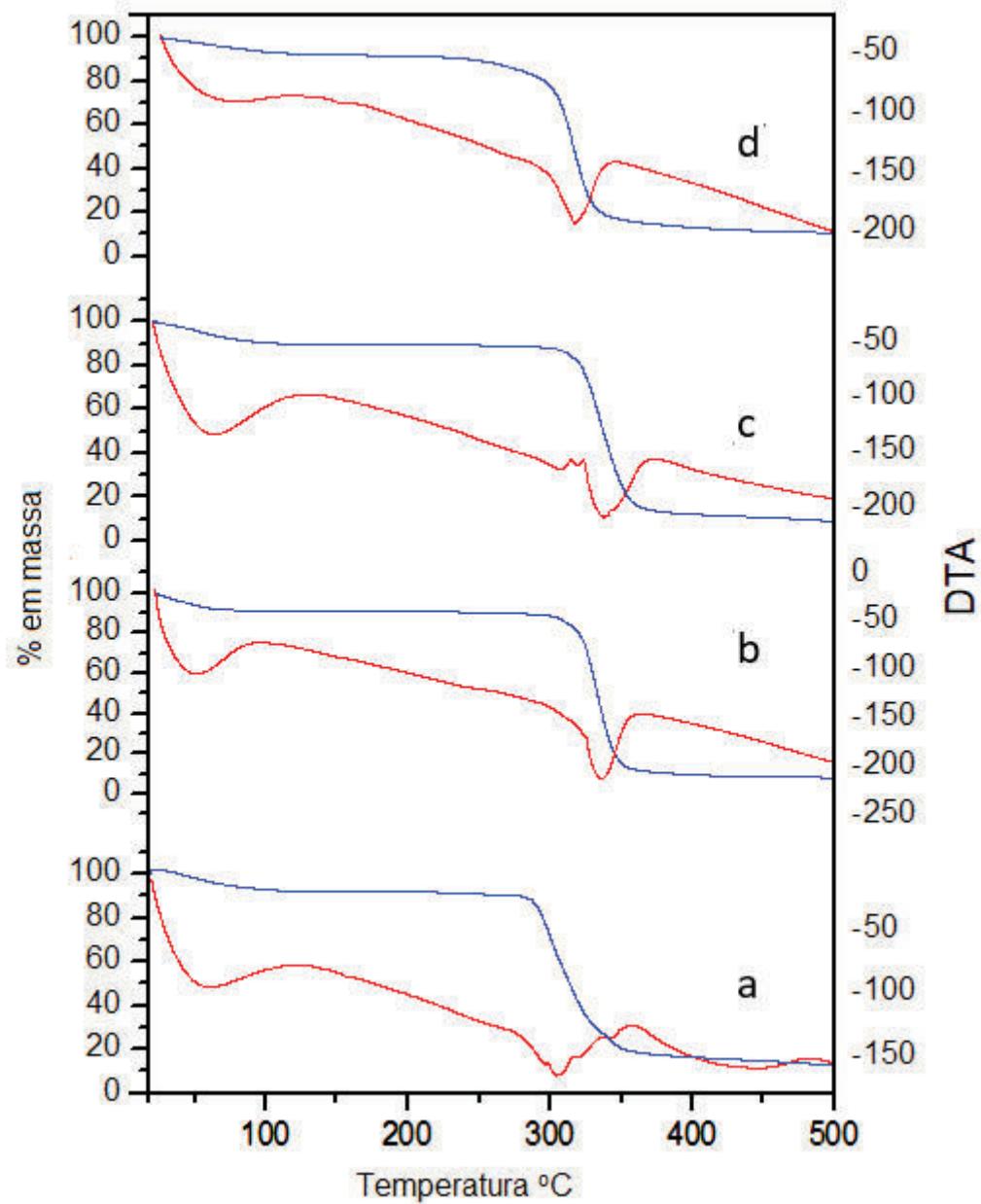
Figura 20 Curvas TG (azul) e DTG (vermelho) para as amostras: a) CHC; b) MM e c) HpBCD



Fonte: O autor.

Complementarmente, foram realizadas análises termogravimétricas (TG) e termodiferenciais (DTA) das amostras com possíveis complexos de inclusão. (Fig. 21)

Figura 21 Curvas TG (azul) e DTA (vermelho) para as amostras: a) MM; b) Produto moído; c) produto liofilizado; e d) produto calcinado



Fonte: O autor

Tabela 5: Temperaturas do processo de perda de massa e pico de decomposição.

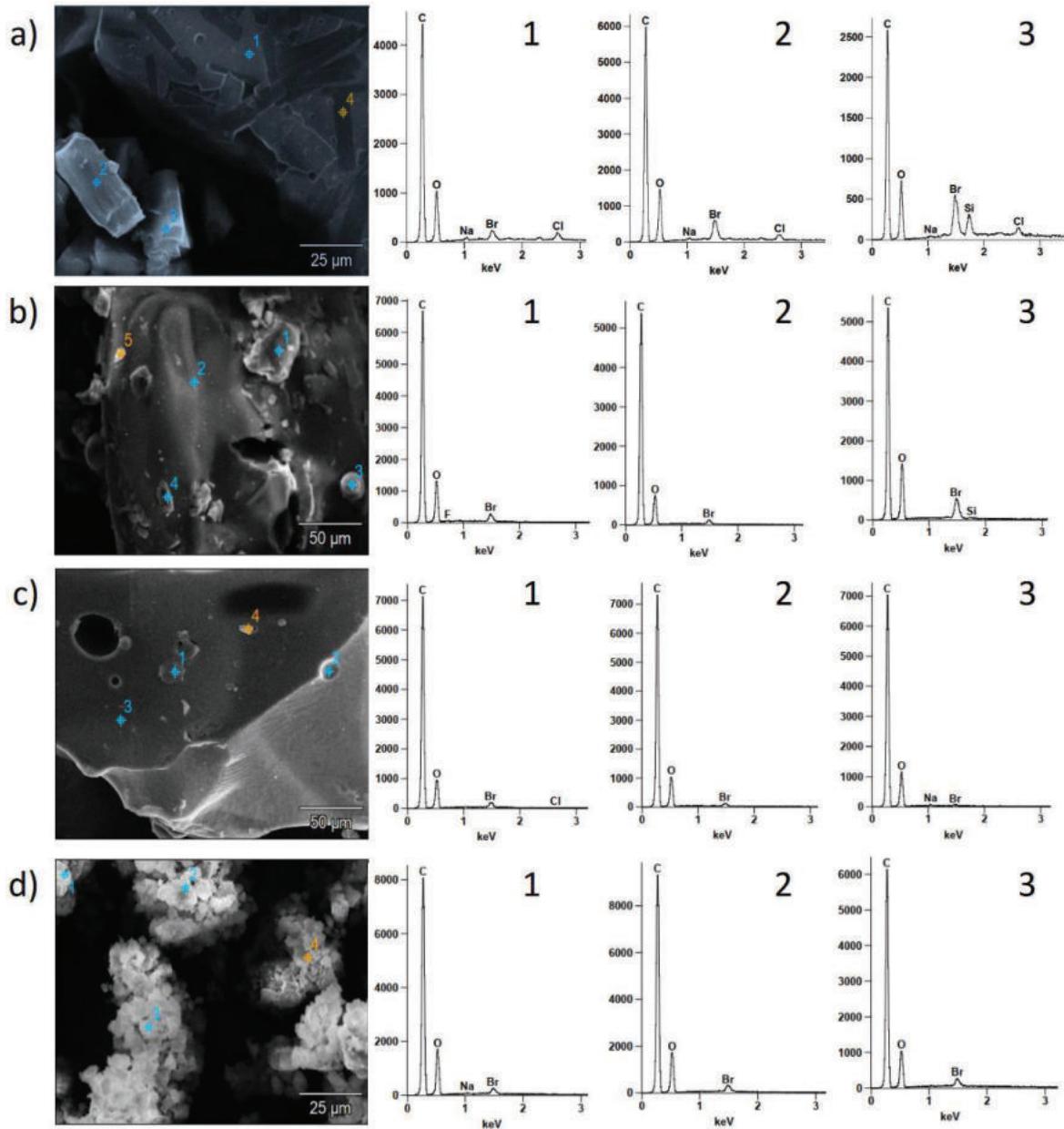
	T_{inicial} (°C)	T_{final} (°C)	ΔT (°C)	Pico de Decomposição (°C)
Produto calcinado	292	346	54	317
Produto liofilizado	322	368	46	337
Produto moído	320	363	43	336
Mistura mecânica (MM)	280	350	70	305

O pico referente à decomposição do material liofilizado e moído é deslocado para valores de temperatura mais elevados (337° e 336°C, respectivamente, Tabela 5) em relação a mistura mecânica e produto calcinado (305° e 317°C, respectivamente, Tabela 5). Em relação à faixa de temperatura do evento, há uma amplitude maior para a MM ($\Delta T = 70^\circ\text{C}$, Tabela 5), pois, em grande parte, é a decomposição do CHC somada à decomposição do HpBCD. O produto calcinado também apresenta comportamento semelhante em relação a este evento térmico ($\Delta T = 54^\circ\text{C}$, Tabela 5). Já os materiais liofilizado e moído apresentam um evento de decomposição térmica com uma faixa de temperatura menor (46° e 43°C, respectivamente). Esse resultado, somado ao deslocamento dos picos, conforme mencionado anteriormente, permite classificar esses últimos materiais como mais promissores para a formação do complexo de inclusão.

2.2.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As visualizações de MEV (Fig. 22) foram realizadas para obter a microanálise das radiografias características em diferentes pontos da amostra. Os espectros de EDS foram obtidos com o objetivo de pesquisar o elemento bromo por estar presente na estrutura do CHC. A partir da comparação de diferentes regiões pôde-se verificar a homogeneidade da amostra e inferir sobre a formação de compostos de inclusão.

Figura 22 - Visualizações de MEV e espectros EDS nos pontos 1, 2 e 3 para a)MM; b) produto calcinado; c) produto liofilizado; d) produto moído.



Fonte: O autor

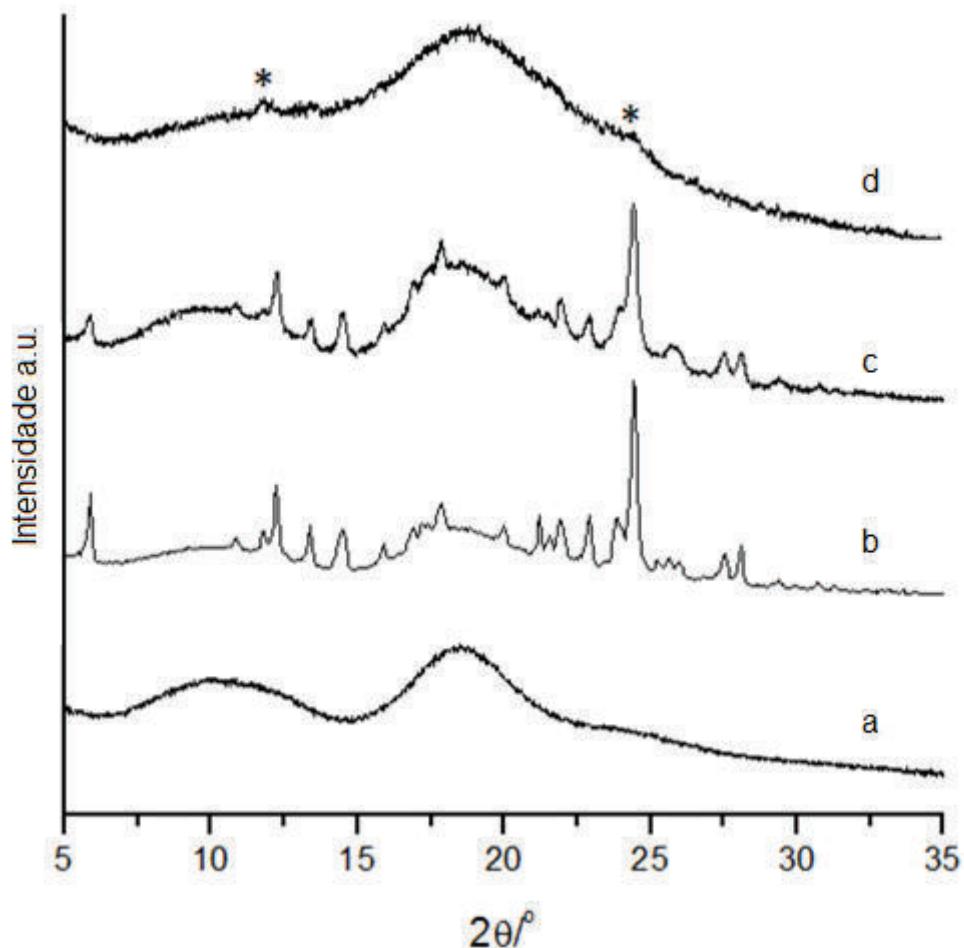
Foi verificado para a fig. 22a, referente a MM, que existe heterogeneidade quanto à distribuição do bromo, conferida pelas diferentes intensidades de pico relacionadas a esse elemento no espectro de EDS nos três diferentes pontos da amostra. Isso foi verificado na Fig. 22b, para a amostra calcinada, e na Fig. 22c, para

a amostra liofilizada. Entretanto, para a amostra moída (Fig. 22d) foi observado um espectro com intensidades próximas ao sinal do bromo nos três pontos pesquisados, permitindo dizer que, para esta amostra, há maior homogeneidade. A presença de heterogeneidade quanto à distribuição do elemento bromo observada para as amostras anteriores possivelmente está relacionada à segregação da fase CHC, o que permite deduzir que a inclusão não foi tão efetiva quanto na amostra moída que apresentou uma homogeneidade que permite dizer que a formação de composto de inclusão foi mais efetiva para esta amostra.

2.2.2.3 Difractometria de raios X em pó (DRX)

Difractogramas de raios X em pó foram adquiridos para HpBCD; a mistura mecânica MM; o produto moído e o produto calcinado. (Fig. 23) De natureza amorfa, o padrão de difração do HpBCD mostra dois arcos largos com máximo em $2\Theta = 10,2^\circ$ e $18,5^\circ$ (Trandafirescu *et al.* 2019). O padrão MM contém picos definidos e intensos em $2\Theta = 5-30^\circ$ correspondentes as Reflexões de CHC. O produto calcinado tem um padrão amorfo semelhante ao difratograma HpBCD, mas com picos de intensidade muito baixa em $2\Theta = 11,78^\circ$ e $24,44^\circ$ (indicado na Fig. 23d). Esses picos de baixa cristalinidade são relativos a CHC. O produto moído tem um padrão semelhante ao difratograma da MM. Entretanto, as reflexões em $2\Theta = 21,2^\circ$; $21h56$; 23.96° ; $25,34^\circ$ referentes a CHC foram bastante atenuados e picos em $2\Theta = 10,94^\circ$; $25,7^\circ$; 26.0° não são mais visíveis. Esses resultados sugerem que o complexo hospedeiro-convidado entre CHC e HpBCD foi parcialmente formado pelo método mecanoquímico. Para o produto calcinado a etapa de fusão de CHC pode ter induzido uma amorfização desta fase junto com HpBCD o que provavelmente não levou a nenhum pico. No que diz respeito ao processo de liofilização, este método não forneceu material suficiente para ser caracterizado por DRX.

Figura 23 - Difratogramas de raios X em pó das amostras: a) HpBCD; b) MM; c) Produto moído; d) produto calcinado. * Picos relativos a CHC.



Fonte: O autor

2.2.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Usando o programa SPARTAN 10, um espectro de FTIR da CHC foi simulado para encontrar uma correlação dos sinais obtidos com o espectro experimental. Com base no confôrmero de menor energia, foi utilizado o método de correlação Lee-Yang-Par (B3LYP) da teoria do funcional da densidade (DFT) com o conjunto de base 6-

311G *, conforme relatado na literatura para espectros simulados de chalconas. (Sbârcea *et al.* 2019; Kahraman; Saçan, 2019; Thirunavukkarasu *et al.* 2021)

O espectro simulado mostra uma boa correspondência com os sinais do espectro obtidos experimentalmente. A Tabela 5 mostra a comparação entre os sinais teóricos e experimentais.

Este método está de acordo com o resultado previamente descrito por Albuquerque e colaboradores (Albuquerque *et al.* 2021) para a CHC. Em seu trabalho, o espectro de infravermelho teórico foi obtido pelo método de correlação Lee-Yang-Par (B3LYP) da teoria funcional da densidade (DFT), o conjunto de base DGTZVP foi usado. Os efeitos do solvente foram considerados usando o Método do Contínuo Polarizado (PCM)

Tabela 6: FTIR simulado e experimental de CHC

Modos vibracionais	Número de onda simulado (cm ⁻¹)	Número de onda experimental (cm ⁻¹)
u C=O	1668	1672
u C=C	1600	1604
def C=C fora do plano	1386	1389

Espectros experimentais de FTIR foram obtidos para as amostras: mistura mecânica (MM); produto liofilizado; produto moído e produto calcinado. Os resultados obtidos foram submetidos a uma operação de subtração matemática dos espectros de HpBCD usando o software OMNIC (FIGURA 24) (OMNIC)

Os espectros de CHC e MM são muito semelhantes (Fig. 24a e 24b), uma vez que MM é apenas uma mistura física dos dois componentes do complexo. Portanto, sem interação íntima entre esses componentes, na subtração pelo espectro HpBCD (Fig. 24c) o resultado é o próprio espectro da CHC. Este resultado mostra que a operação de subtração foi bem-sucedida em recriar o espectro CHC a partir da mistura mecânica, permitindo sua aplicação para os espectros dos complexos obtidos.

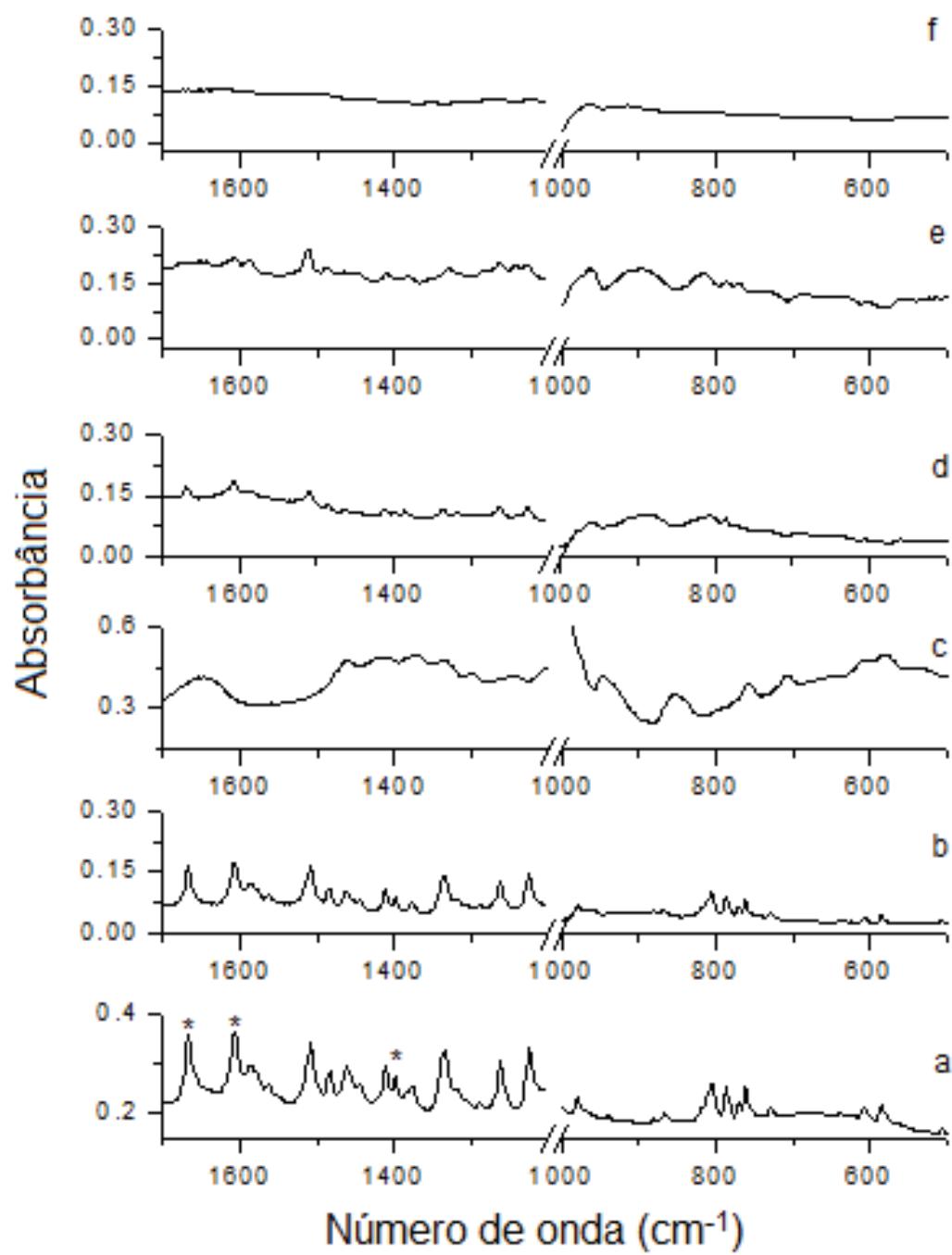
O espectro da amostra liofilizada (Fig. 24f) apresenta sinais fortemente atenuados, relacionados à inclusão da CHC na cavidade do HpBCD, pois o

encapsulamento traz restrição para os graus de liberdade do hóspede. (Le-Deygen *et al.* 2017; Fini *et al.* 2008)

O produto calcinado e o produto moído (Fig. 24e e 24d, respectivamente) apresentam seus sinais atenuados quando comparados com o espectro da CHC, permanecendo, porém, com sinais de CHC visíveis.

Para ambas as amostras, a banda em 1604 cm^{-1} associada à vibração de estiramento C=C também apresenta uma perda significativa de intensidade. A banda em 1672cm^{-1} designada como a vibração de estiramento C=O é atenuada no espectro do produto moído, mas não visível no espectro do produto via térmica. A perda de intensidade dos sinais relativos à molécula CHC após as subtrações dos espectros sugere que o complexo de inclusão foi formado nessas amostras, mesmo que de forma parcial.

Figura 24 - Subtração dos espectros FTIR das amostras: a) CHC; b) MM c) HpBCD d) produto moído; e) produto calcinado; f) produto lyophilizado. (*) sinais de CHC analisados.



Fonte: O autor

2.2.2.4 Avaliação da atividade anti-epimastigota e citotoxicidade *in vitro* de CHC e complexos hospedeiro-convidado.

As amostras CHC e os complexos CHC:HpBCD obtidos pelos métodos de calcinação, liofilização e mecanoquímico foram avaliados sobre o crescimento de formas epimastigotas do *Trypanosoma Cruzi* e a viabilidade de células LLCMK2. Os valores de IC50 e CC50 dos compostos variaram de 19,4 a 1386 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e 206,4 a 706,9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade antitripanossômica sobre formas epimastigotas de *T. Cruzi* (IC50), toxicidade (CC50) para células LLCMK22 e índice de seletividade (IS) de CHC e dos complexos HpBCD:CHC.

Amostras	CC ₅₀ ^a ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	IC ₅₀ ^b ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	IS ^c	IC ₅₀ relativo ^d ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	IS Relativo ^e	% em massa de CHC ^f
CHC	206,4	19,4	10,63	-	-	100
Complexo calcinado HpBCD 1 : 1 CHC	304,1	37,08	8,2	8,19	37,11	22,1
Complexo liofilizado HpBCD 5 : 1 CHC	706,9	1386	0,51	74,84	9,44	5,4
Complexo moído HpBCD 1 : 1 CHC	419,2	81,92	5,11	18,10	23,16	22,1

^a Valores de concentração de citotoxicidade de 50% para células LLCMK22; ^b Valores de concentração inibitória de 50% de parasitas; ^c IS = índice de seletividade (CC50/IC50). ^d Calculado por IC50 x % em massa de CHC/100. ^e Calculado por CC50 / IC50 relativo. ^f % em massa de CHC presente em cada amostra

Conforme mostrado na tabela 7, todos os complexos CHC:HpBCD mostraram um perfil de citotoxicidade mais baixo em células de mamíferos do que a CHC livre,

enquanto a atividade anti-epimastigota dos complexos foi menor do que da CHC livre. Em relação aos valores de IS, o CHC livre, o complexo calcinado e o complexo moído foram relativamente seletivos para as formas epimastigotas do *T. Cruzi* do que para as células de mamíferos, pois , possuem um índice de seletividade maior do que 4, o que, segundo a literatura, mostra que o composto em questão é seletivo contra o parasita alvo. (Barros *et al.* 2010; Tsuchiya *et al.* 1985; Amoros *et al.* 1992)

No entanto, esses resultados podem ser analisados de forma mais adequada se considerarmos os percentuais de CHC em massa em cada amostra, uma vez que possuem uma proporção em massa diferente de ciclodextrina. Considerando isso, calculamos o valor de IC_{50} relativo a % de CHC em cada amostra ($IC_{50} \times \% \text{ CHC massa}/100$), bem como o IS relativo (CC_{50} / IC_{50} relativo), conforme a Tabela 6.

Assim, a análise dos valores relativos de IC_{50} revelou que o complexo calcinado era cerca de duas vezes mais ativo que o CHC livre. O mesmo aconteceu com os demais complexos, sendo quase 4x mais ativos que o CHC. Em relação aos índices relativos de seletividade dos complexos, os valores de IS aumentaram cerca de 4,5x para os complexos calcinados e moídos e 18x para o complexo liofilizado. No entanto, este último continua a apresentar um SI inferior ao do CHC. Esses resultados indicaram que a atividade anti-epimastigota é diretamente proporcional à % da massa de CHC do complexo, o que consequentemente impacta os valores de IS.

Esses resultados corroboram aos encontrados em estudos anteriores que demonstraram que os complexos do tipo hospedeiro-convidado utilizando ciclodextrinas proporcionaram melhorias na atividade anti-tripanossômica. Nicoletti e colaboradores (Nicoletti *et al.* 2020) descreveram que a β -lapachona tem seu potencial tripanocida melhorado quando associada ao HpBCD em um complexo hospedeiro-convidado. Contra a forma tripomastigota do parasito, a β -lapachona livre apresentou valores de IC_{50} e IS de 2,1 μM e 0,05, respectivamente. Em contraste, seu complexo com ciclodextrina apresentou valores de IC_{50} e IS de 0,7 μM e 10,9, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Barbosa e colaboradores (Barbosa *et al.* 2021), que demonstraram que os valores de IC_{50} foram 0,6 μM e 2,21 μM para o complexo e a β -lapachona livre, respectivamente.

Além disso, alguns autores também investigaram e comprovaram a atividade antiparasitária de outros complexos do tipo hospedeiro-convidado contra o *T. Cruzi*,

como o sistema de liberação de fármacos antiChagas relatado por Alcântara e colaboradores (Alcantara *et al.* 2021) utilizando óleos essenciais e ciclodextrina. Xiaomo Li e colaboradores (Li, X. *et al.* 2021) utilizaram um sistema de liberação de fármacos contendo nanocarreadores à base de polímeros e benznidazol no tratamento contra o *T. Cruzi*. Eles demonstraram a eficácia da técnica de complexação, pois o IC₅₀ contra formas amastigotas foi de 3,51 µM e 33,07 µM para o benznidazol complexado e sua forma livre, respectivamente. Além disso, Rial e colaboradores (Rial *et al.* 2011) demonstraram que o benznidazol associado a um nanocarreador à base de copolímeros derivados do éster do ácido acrílico forneceu efeitos benéficos, como menor toxicidade, maior solubilidade em água e melhor biodisponibilidade oral. Por fim, Braga e colaboradores (Braga *et al.* 2016) relataram a abordagem de complexação do anestésico local clonidina com HpBCD, indicando que essa estratégia aumentou seu potencial clínico, além de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade.

Todos esses dados sugerem um ótimo desempenho dos complexos obtidos entre CHC:HpBCD contra o parasita e células hospedeiras em comparação com CHC livre. Além desses resultados, os complexos com ciclodextrina têm a vantagem de aumentar a solubilidade das moléculas hóspedes e melhorar sua biodisponibilidade. (Bensouiki *et al.* 2022; Brillas, 2022; Swain *et al.* 2022)

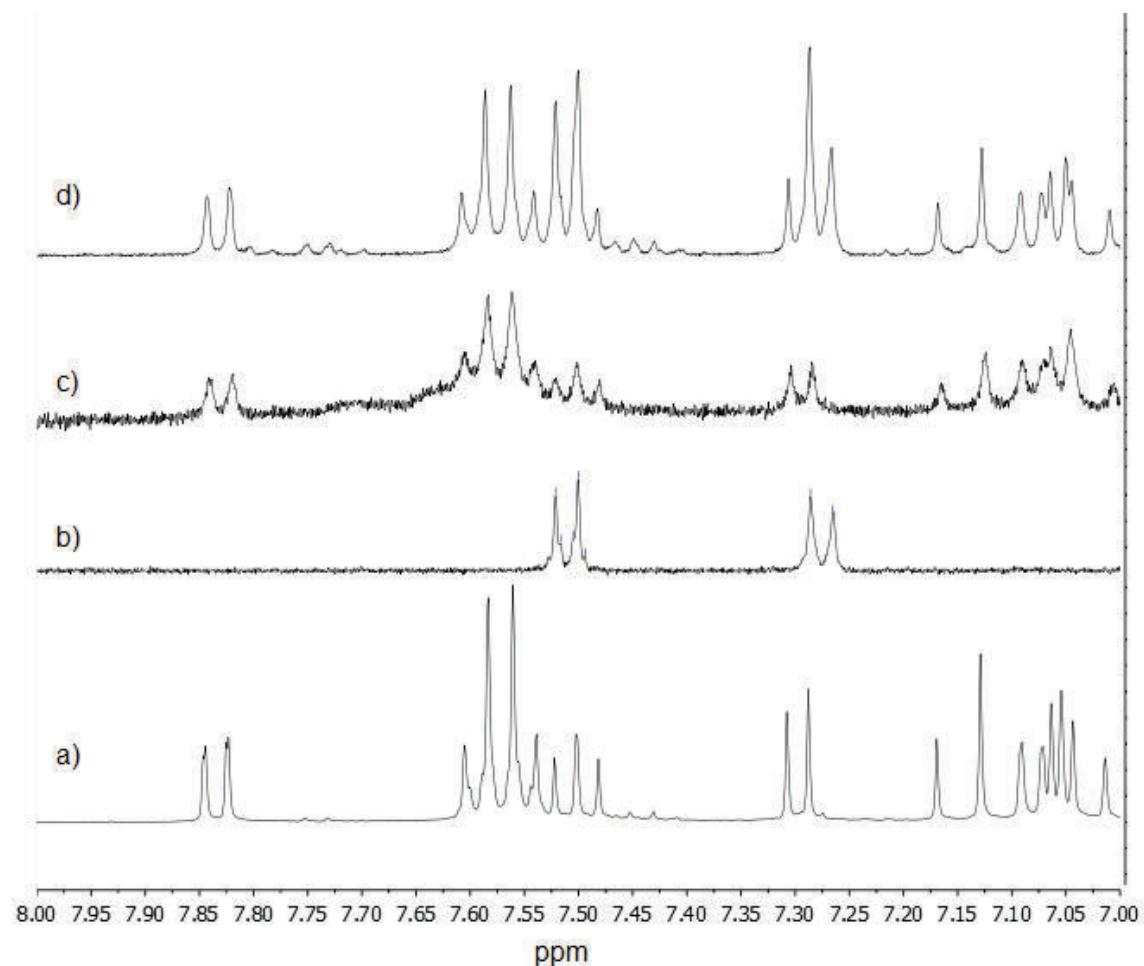
2.2.2.5 Espectroscopia de RMN de hidrogênio

A partir dos resultados dos testes biológicos, tendo em vista que a amostra liofilizada apresentou o pior resultado (IC₅₀ = 1386µg.mL⁻¹; CC₅₀ = 706,9 µg.mL⁻¹), procedeu-se então a realização de novas caracterizações de RMN¹H, dessa vez utilizando os complexos em estado sólido já preparados. Os resultados estão na figura 25.

Verifica-se que, para os complexos moído e calcinado os sinais da região aromática entre 7,00 a 8,00 ppm da chalcona estão presentes, com pequenas modificações em torno dos sinais em 7,30 ppm, que na chalcona se apresenta como um duplet e na amostra moída como um triplete. Entretanto, para a amostra liofilizada, verificou-se um completo desaparecimento desses sinais da chalcona. Isso explica o resultado do teste biológico relacionado a essa amostra, ou seja, não havia

a presença de Chalcona na amostra liofilizada. Observando-se o espectro de RMN correspondente, verificam-se apenas dois sinais dubletos em 7,52 e 7,28 ppm que não são referentes a chalcona, mas, provavelmente, a um produto de degradação. Infere-se que provavelmente na amostra moída, este produto de degradação está presente, pois um sinal triploto na região de 7,30 ppm e o aumento na intensidade dos sinais em 7,50 ppm coincidem com aqueles presentes no espectro da amostra liofilizada podendo estes, terem sido adicionados àqueles da chalcona.

Figura 25: Espectros de RMN¹H adquiridos em DMSOD6 para a) CHC; b) complexo liofilizado; c) complexo calcinada; d) complexo moído.



Fonte: O autor

3. SÍNTSE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO DA N-(2-BROMOFENIL)-3-CARBOXIAMIDA-CUMARINA COM A 2-HIDROXIPROPIL ALFACICLODEXTRINA; 2-HIDROXIPROPIL BETACICLODEXTRINA E 2-HIDROXIPROPIL GAMACICLODEXTRINA

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 Materiais

Tabela 8: Reagentes utilizados e suas respectivas marcas

Acetonitrila	TEDIA (99,9%)
DMSO (D6)	Cambridge Isotope laboratories (99,9%)
HpaCD	Sigma Aldrich (99,8%)
HpBCD	Sigma Aldrich (99,8%)
HpYCD	Sigma Aldrich (99,8%)

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Síntese do complexo com alfa, beta e gama hidroxipropil ciclodextrinas (HpaCD; HpBCD; HpYCD) via lyophilização

150mg de uma mistura 1:1 entre PCUM e HpaCD foram solubilizados em 150ml de água miliQ, a mistura foi adicionada a balão de fundo redondo de 500mL e deixada sob agitação em placa de agitação magnética por 24h. O mesmo procedimento foi adotado para misturas 1:1 com HpBCD e HpYCD. A mistura com HpYCD continuou sob agitação por mais 24h totalizando 48h sob agitação. Após esse tempo as misturas foram filtradas. As soluções foram filtradas utilizando funil de Buchner, vertidas placas de petri de 60 x 15mm e levadas ao congelador. Após congelada as amostras foram lyophilizadas a uma temperatura de -54°C e pressão de 52mmHg até restar um pó branco.

3.1.2.2 Síntese do complexo com alfa, beta e gama hidroxipropil ciclodextrinas (HpaCD; HpBCD; HpYCD) via método mecanoquímico

150 mg de uma mistura de proporção 1:1 PCUM:HpaCD foram colocados em um moinho de bolas. Essa mistura permaneceu em processo de moagem por períodos de 3 e 12h. o mesmo processo foi feito para misturas com HpBCD e HpYCD

3.1.2.3 Caracterização por espectroscopia de RMN de hidrogênio

Os espectros de RMN de hidrogênio foram obtidos usando um espectrômetro Bruker 400 MHzXRD-400. As amostras foram preparadas em tubos de vidro utilizando 10 mg de material e 0,6 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSOD6), com tetrametilsilano de padrão interno.

3.1.2.4 Espectrometria de massas

As amostras foram solubilizadas em 500 μ L de solução de água/acetonitrila 1:1 (v/v) e diluídas na mesma solução para a concentração final de 4 μ g/mL. As análises foram feitas em equipamento: Maxis Impact, configuração ESI-Q-TOF (Bruker Daltonics), calibração externa com solução de trifluoroacetato de sódio 10 μ M em água/acetonitrila 1:1 (v/v). A Fonte de Ionização foi por Electrospray e a polaridade: positiva. A faixa de varredura foi de 100 - 6000 m/z e o modo de aquisição foi o FullScan (MS1)

3.1.2.5 Caracterização do complexo em estado sólido

Os difratogramas de raios-X foram obtidos com um equipamento Rigaku, modelo Ultima IV, com gerador de raios X de alta frequência (3kW), tubo de raios X Cu ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$), foco normal (2kW), Universal Theta- Goniômetro 2Theta com raio de 185 mm, slots fixos e filtro K β Ni, com tensão de 40 kV e corrente de 20 mA. Foram utilizadas faixas de $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$, com etapas de $0,05^\circ$ e tempo por etapa de 1 segundo.

As curvas termogravimétricas foram obtidas por um analisador SHIMADZU, modelo DTG60, aquecendo 10-15 mg da amostra em intervalos de temperatura definidos com uma velocidade de aquecimento de $5^\circ\text{ C min}^{-1}$, sob um fluxo de 50 ml min^{-1} de argônio.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Caracterização em solução

3.2.1.1 Espectroscopia RMN 1H

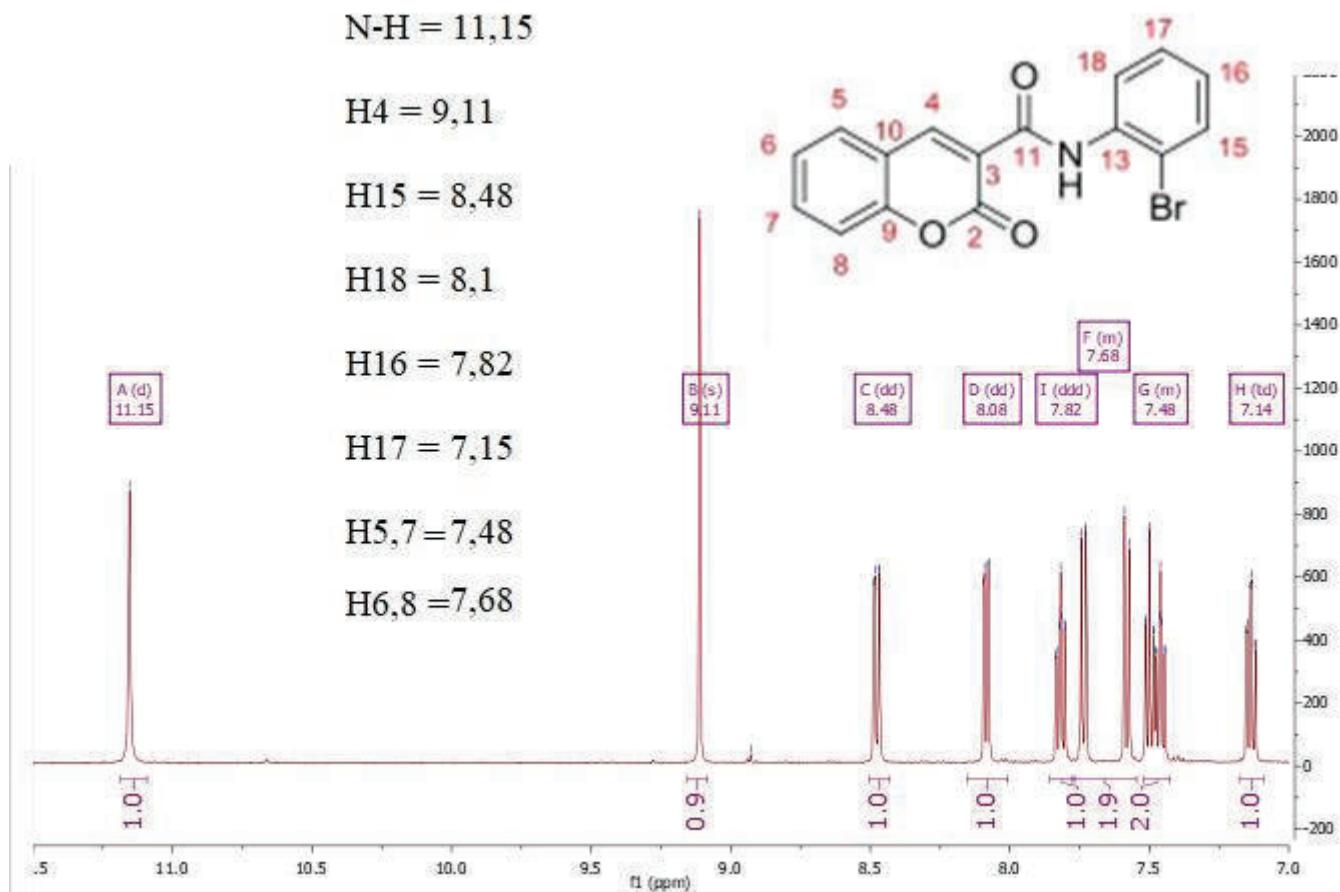
Os complexos entre PCUM e as ciclodextrinas alfa, beta e gama hidroxipropil foram obtidos a partir da síntese por liofilização. Nesse procedimento as três misturas entre o PCUM e as ciclodextrinas foram deixados por 24h em agitação a temperatura ambiente. Verificou-se que para as misturas com alfa e beta hidroxipropil ciclodextrinas a solução se encontrava límpida; porém, a solução com gama hidroxipropil ciclodextrina ainda se encontrava turva. Assim, essa solução foi deixada em agitação por mais 24h e apresentou um aspecto mais límpido após esse tempo. Ao final desse processo a mistura com gama hidroxipropil ciclodextrina foi filtrada e o sobrenadante liofilizado assim como para as demais misturas.

A partir das amostras liofilizadas foram realizados experimentos de RMN de hidrogênio de forma a verificar as modificações ocorridas principalmente no espectro do PCUM a partir das possíveis complexações com as ciclodextrinas.

O espectro de RMN de hidrogênio do PCUM encontra-se na figura 26. A descrição desse espectro encontra-se na referência (Fabris, 2019). A atribuição do espectro encontra-se na própria figura 26.

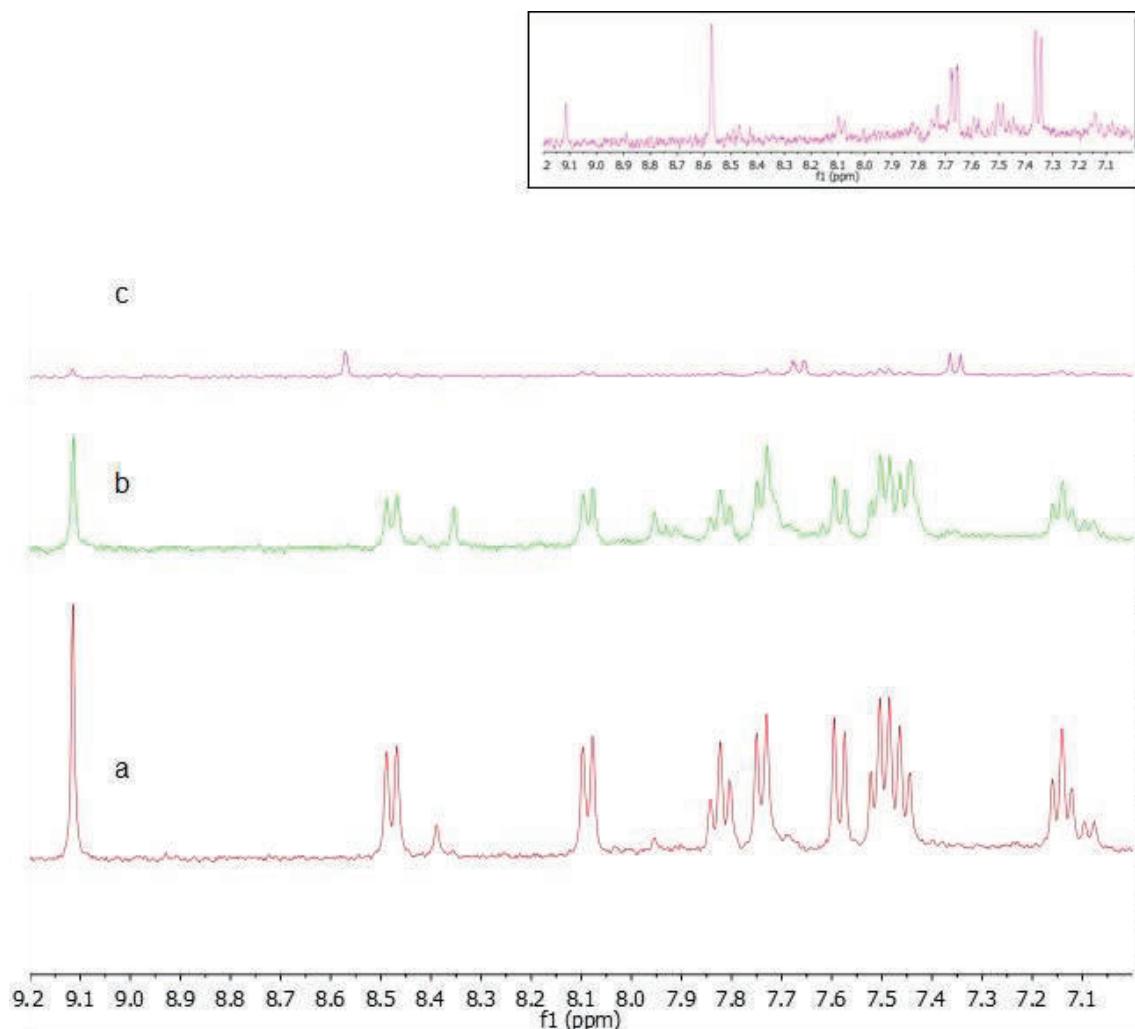
Os espectros de hidrogênio para as misturas liofilizadas na região do aromático, acima de 7,0 ppm, encontram-se na figura 27.

Figura 26 - Espectro de ^1H RMN para o PCUM e atribuição dos hidrogênios



Fonte: O autor

Figura 27 - Espectros de ^1H RMN para mistura liofilizada entre: a) HpaCD e PCUM; b) HpBCD e PCUM; c) HpYCD e PCUM. No detalhe o espectro de “c” ampliado.

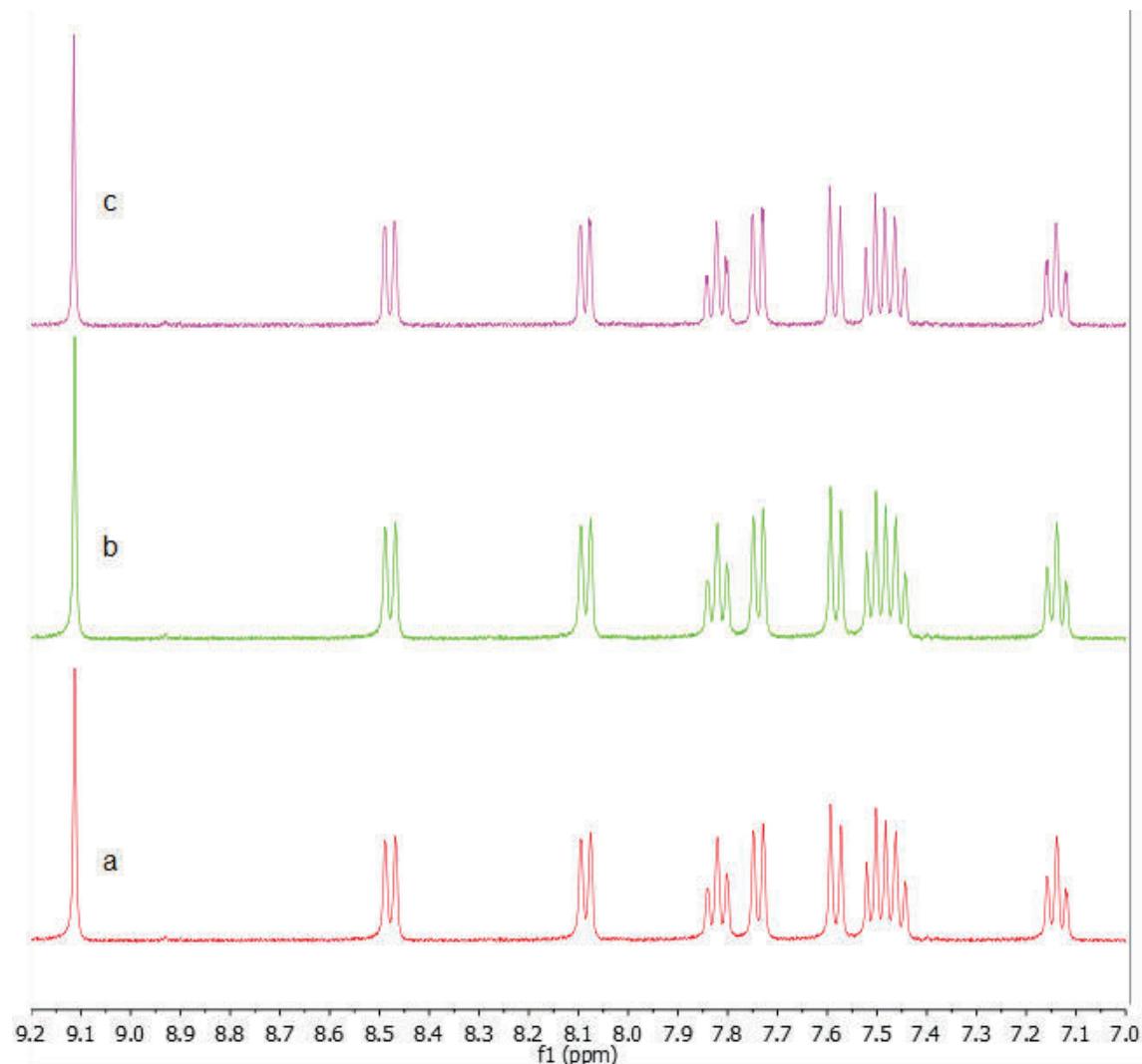


Fonte: O autor

Primeiramente verifica-se pela figura 27 em comparação com a figura 26 a presença de picos não referentes ao espectro do PCUM nos espectros alfaHpBCD e betaHpBCD (fig 27a e 27b respectivamente). São eles: um dubbleto em 7,09 ppm, um dubbleto em 7,92 ppm, um singlet em 7,95 ppm e um singlet em 8,36 ppm. Trata-se de sinais relativos a algum tipo de agregação do PCUM. Verifica-se também que os sinais do PCUM são menos intensos na mistura com HpBCD do que na HpaCD, ao mesmo tempo em que os sinais desse(s) produto(s) são mais intensos, o que parece indicar que a agregação é maior em presença de HpBCD. Observando o espectro da

mistura do PCUM com hpYCD tanto os sinais dessa agregação quanto os sinais do PCUM são residuais. Ao mesmo tempo em que outros sinais não referentes ao PCUM aparecem com maior intensidade. São eles: um dubbleto em 7,35ppm, um dubbleto em 7,66ppm e um singlet em 8,57 ppm. Estes resultados apontam para um efeito proporcionado pelas ciclodextrinas na seguinte ordem de intensidade HpaCD < HpBCD < HpYCD, permitindo dizer que há uma influência do tamanho da cavidade. Desta forma pode se dizer que a forma alfa é a que melhor consegue encapsular o PCUM. Tendo em vista que esse processo de agregação pode ter ocorrido durante o processo de agitação da mistura aquosa em temperatura ambiente ou durante o processo de liofilização procedeu-se a obtenção desses mesmos complexos via síntese mecanoquímica. Os espectros de RMN de hidrogênio da região aromática, acima de 7,0 ppm encontram-se na figura 28. Para esses espectros observou-se todos os sinais relativos ao PCUM em cada uma das amostras. Não foram observados quaisquer sinais relativos a agregação. Desta forma verifica-se que para a síntese mecanoquímica não ocorre a agregação do PCUM, inclusive quando a HpYCD é utilizada para a formação do complexo. Portanto, conclui-se que, de fato, a realização do processo de complexação em meio aquoso com posterior liofilização leva a agregação da molécula convidada, o que é mais acentuado quando HpBCD e HpYCD são utilizadas.

Figura 28 - Espectros de ^1H RMN para mistura moída entre: a) HpaCD e PCUM; b) HpBCD e PCUM; c) HpYCD e PCUM.



Fonte: O autor

TABELA 9: Deslocamentos químicos δ referentes aos sinais do PCUM nas amostras do PCUM puro e associado a HpaCD, HpBCD e HpYCD obtidas por liofilização e síntese mecanoquímica e seus respectivos $\Delta\delta$ ($\delta_{\text{PCUM}} - \delta_{\text{amostra}}$).

Pcum	HpaCD Lio	$\Delta\delta$	HpBCD Lio	$\Delta\delta$	HpYCD Lio	$\Delta\delta$	HpaCD moída	$\Delta\delta$	HpBCD moída	$\Delta\delta$	HpYCD moída	$\Delta\delta$
9.11	9.11	0	9.11	0	9.11	0	9.11	0	9.11	0	9.11	0
8.48	8.48	0	8.48	0	8.48	0	8.48	0	8.48	0	8.48	0
8.1	8.1	0	8.1	0	8.1	0	8.09	0.01	8.09	0.01	8.09	0.01
7.82	7.82	0	7.82	0	-	-	7.82	0	7.82	0	7.82	0
7.68	7.69	-0.01	7.69	-0.01	7.69	-0.01	7.69	-0.01	7.69	-0.01	7.69	-0.01
7.48	7.48	0	7.48	0	7.48	0	7.48	0	7.48	0	7.48	0
7.15	7.16	-0.01	7.16	-0.01	-	-	7.16	-0.01	7.16	-0.01	7.16	-0.01

Fonte: O autor

Verifica-se que não há diferença significativa entre os valores de deslocamento dos sinais do PCUM e das ciclodextrinas nas amostras puras ou dos complexos, sejam estes obtidos por liofilização ou síntese mecanoquímica (Tabela 9). Assim não há evidencia por parte dos espectros de RMN de hidrogênio da formação dos complexos em solução. Entretanto, deve se salientar, que foram utilizados nas obtenções desses espectros proporções 1:1, CD:PCUM. Dependendo dos valores de constante de associação desses complexos constatar qualquer modificação no espectro de RMN de hidrogênio pode ser uma tarefa difícil: se a constante for muito baixa, em torno de 10, então praticamente não haverá modificação na propriedade observada no espectro, no caso o deslocamento químico. Com isso em mente procedeu-se a realização de experimentos RMN DOSY 2D utilizando amostras liofilizadas do PCUM com HpaCD e HpBCD como forma de se obter os coeficientes de difusão para calculo da constante de associação. Considerou-se, inicialmente, a razão estequiométrica 1:1 nos complexos. O desenvolvimento teórico para a obtenção da constante de associação a partir dos coeficientes de difusão está descrito previamente no capítulo 2.3.1.3, na seção de resultados e discussão sobre o RMN DOSY. Os valores de coeficiente de difusão e constante de associação são apresentados na tabela 10. Verificaram-se valores na ordem de 10, o que segundo a literatura (Hirose, 2012) necessitaria uma razão de 1:10 entre [convidado]:[hospedeiro] para verificar modificações no espectro de RMN. Adicionalmente salienta-se que o complexo com a alfa ciclodextrina apresentou

constante de associação menor do que com a beta ciclodextrina. (6,54 e 16,59). Esses valores podem ser comparados com valores que constam em uma base de dados criada a partir de *machine learning* (Tahil *et al.* 2023) que relaciona valores de constante de equilíbrio de complexos com ciclodextrinas em meio aquoso. Considerando a estrutura de PCUM os valores para alfa e beta ciclodextrina são de 34,63 e 466,42, respectivamente. Verifica-se, portanto, correspondência entre os valores experimentais e previstos por *machine learning*, uma vez que a betaciclodextrina apresenta valor de constante de equilíbrio maior que a da alfa ciclodextrina. Por outro lado, os valores absolutos apresentam grandes diferenças entre si: isso pode ser explicado pelo fato do solvente utilizado experimentalmente (DMSOD6) ter sido diferente do que está na base de dados (água). Neste último esperava-se um valor maior, uma vez que o PCUM é muito menos solúvel em água do que em DMSO. Além disso, essas ciclodextrinas que constam na base de dados não são hidroxipropiladas. Quando pesquisada na base o valor da constante de equilíbrio entre a ciclodextrina HpBCD e o PCUM obtém-se o valor de 321,17 que ainda assim é significativamente discrepante do valor experimental de 16,59. Novamente essa diferença se atribui aos diferentes solventes (DMSO x água).

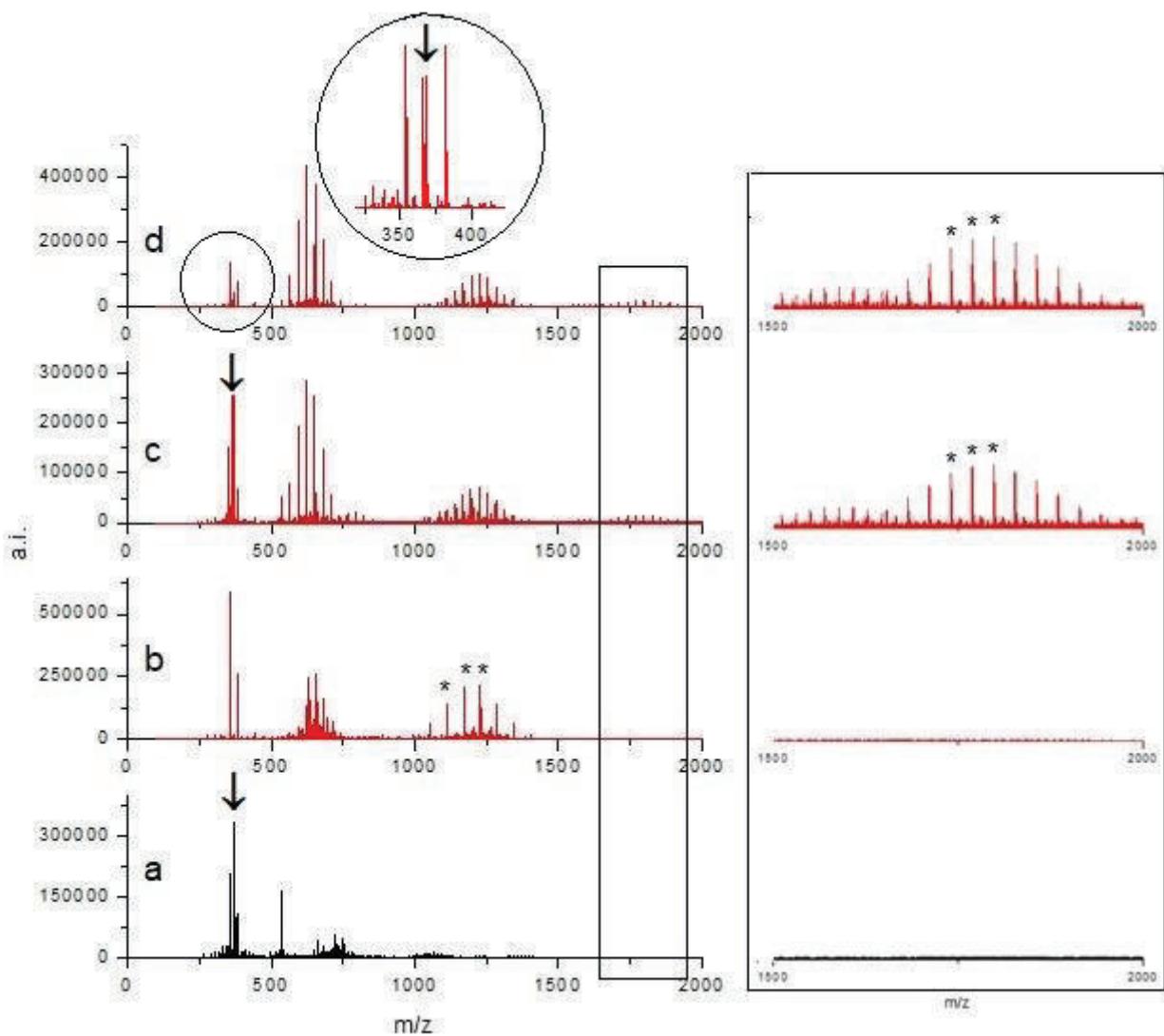
Tabela 10 - Coeficientes de difusão (D) e valor da constante de estabilidade (K) para os complexos obtidos por liofilização envolvendo as ciclodextrinas HpaCD e HpBCD.

	D ($\times 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$)	K
PCUM	2,59 (D_{livre})	-
HpaCD em HpaCD:PCUM	0,95 (D_{enc})	6,54
PCUM em HpaCD:PCUM	2,39 (D_{obs})	
HpBCD em HpBCD:PCUM	0,89 (D_{enc})	16,59
PCUM em HpBCD:PCUM	2,16 (D_{obs})	

3.2.1.2 Espectrometria de massas

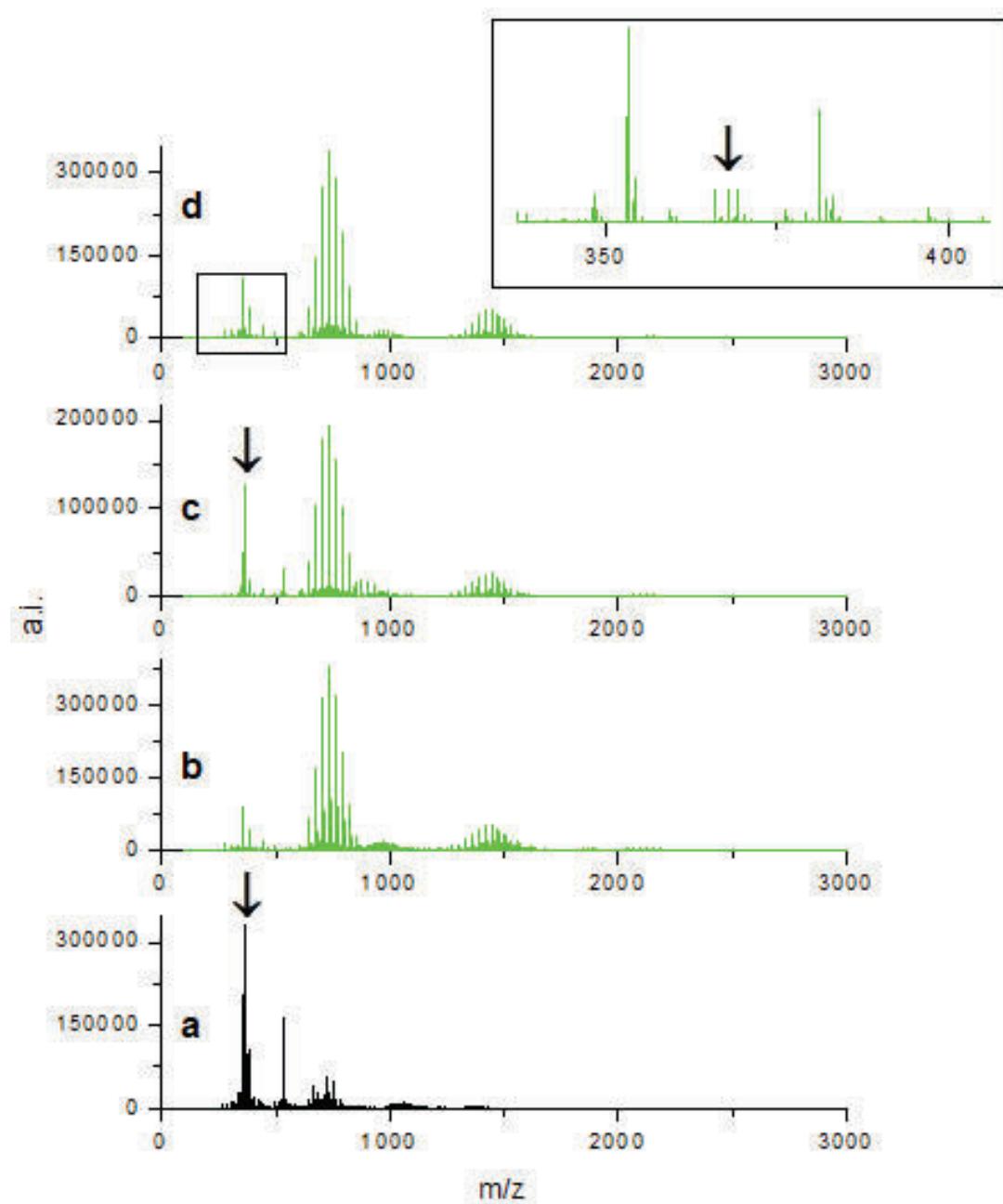
No cálculo da constante de equilíbrio a partir dos coeficientes de difusão obtidos no experimento DOSY foi considerado a razão estequiométrica hospedeiro:convidado de 1:1, entretanto, não havia comprovação experimental para tal. Dessa forma, procedeu-se a obtenção de espectros de massas com ionização por eletrospray. Foram analisadas as amostras: PCUM, as ciclodextrinas hidroxipropiladas individualmente, as amostras liofilizadas e as amostras moídas por 3h. (Fig 29 – 31)

Figura 29 - Espectro de massas para as amostras a) PCUM; b) HpaCD; c) Composto de inclusão com HpaCD moído; d) Composto de inclusão com HpaCD liofilizado. Setas indicam o íon molecular do PCUM em 366 m/z. asteriscos indicam os picos relacionados a HpaCD com o íon molecular. Insets: a região do íon molecular para o produto liofilizado e a região compreendida entre 1500 e 2000 m/z.



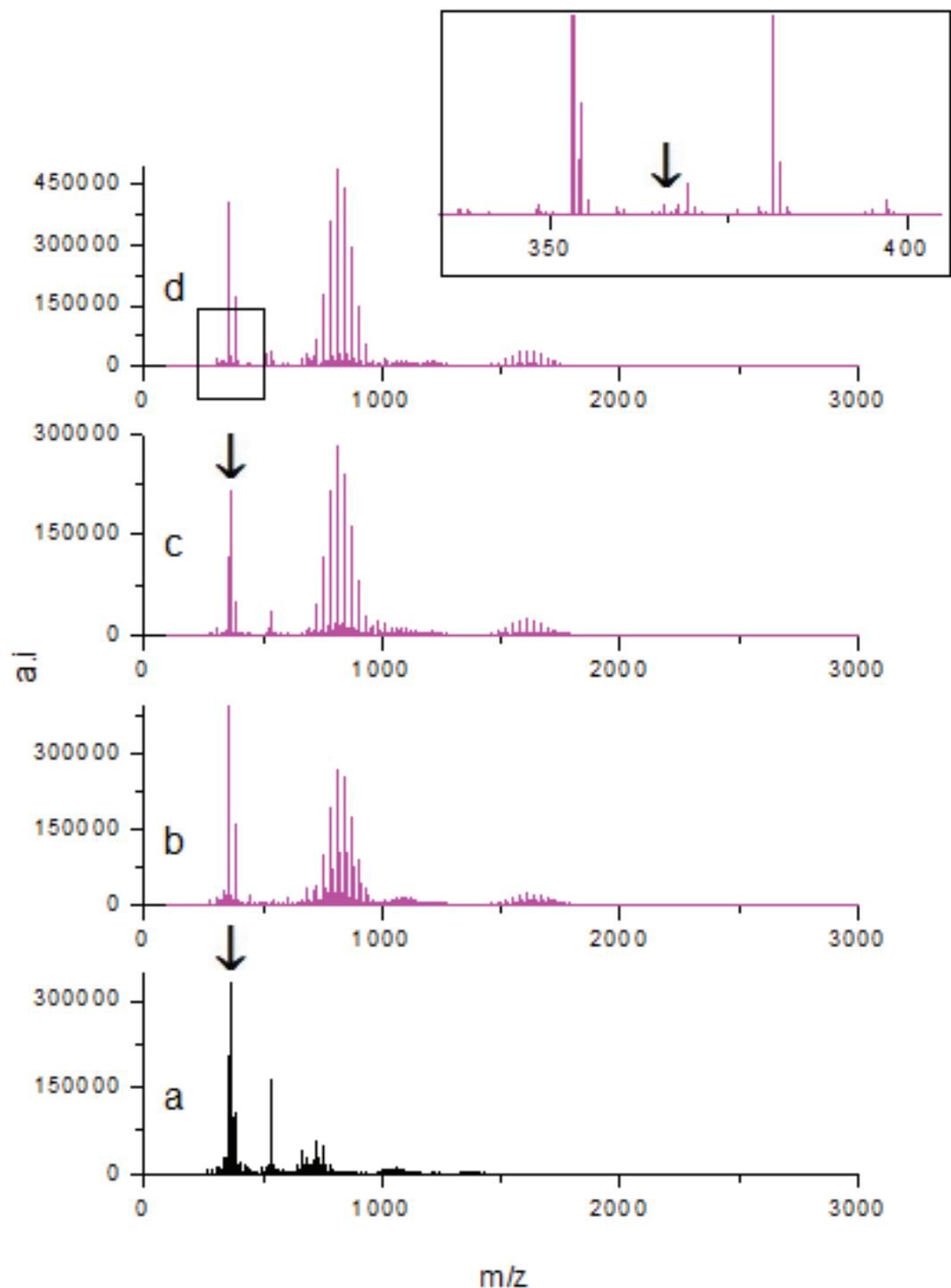
Fonte: O autor

Figura 30 - Espectro de massas para as amostras a) PCUM; b) HpBCD; c) Composto de inclusão com HpBCD moído; d) Composto de inclusão com HpBCD liofilizado. Setas indicam o íon molecular do PCUM em 366 m/z. Inset: a região do íon molecular para o produto liofilizado



Fonte: O autor

Figura 31 - Espectro de massas para as amostras a) PCUM; b) HpYCD; c) Composto de inclusão com HpYCD moído; d) Composto de inclusão com HpYCD liofilizado. Setas indicam o íon molecular do PCUM em 366 m/z. Inset: a região do íon molecular para o produto liofilizado



Fonte: O autor

Na figura 29a verifica-se no espectro do PCUM a presença do íon molecular associada a Na^+ em $m/z = 366$. Na figura 29b verifica-se os picos relativos a HpaCD com diferentes substituições, cujos sinais mais intensos estão em $m/z = 1169,38; 1227,69$ e $1285,89$. Por outro lado, na figura 29c relativo a amostra moída, além dos picos do PCUM e da HpaCD aparecem picos na região de $m/z = 1500 – 2000$, com uma distribuição de picos de forma semelhante a da HpaCD pura e com picos mais intensos em $m/z = 1512,39; 1570,59$ e $1628,69$. Verifica-se em relação aos picos correspondente da ciclodextrina pura uma diferença de massa de aproximadamente 343, o que corresponde a massa molecular do PCUM. Portanto, os picos entre $m/z = 1500 – 2000$ observados na figura 29c são relativos ao complexo HpaCD-PCUM com razão estequiométrica 1:1. O mesmo verifica-se para a figura 29d, relativa a amostra liofilizada. A tabela 9 mostra a relação desses picos conjugados ao íon molecular e suas respectivas intensidades. Por fim, verifica-se que tanto na figura 29c quanto na figura 29d a presença do pico em $m/z = 366$ relativo ao PCUM.

Tabela 11: Picos relativos a HpaCD e conjugados ao íon molecular do PCUM para as moléculas HpaCD; complexo obtido por liofilização com HpaCD; complexo obtido por moagem com HpaCD.

Amostra	picos (m/z)	Intensidad e	picos (m/z)	Intensidade	picos (m/z)	Intensidade
HpaCD	1169,38	213784	1227,69	216381	1285,89	136299
Complexo Liofilizado	1512,39	3660	1570,59	4772	1628,89	4564
Complexo Moído	1512,39	3010	1570,6	4660	1628,9	4225

Na figura 30b verifica-se os picos relativos a HpBCD com diferentes graus de substituição em $m/z = 1200-1700$. Na figura 30c relativo à amostra moída verifica-se os picos do PCUM e da HpBCD, porém, não há qualquer indício de picos relativos ao complexo hospedeiro-convidado. Na figura 30d, tem-se analogamente, o mesmo resultado da figura 29c. Verifica-se para a amostra liofilizada, figura 30d, a presença do pico em $m/z = 366$, relativo ao PCUM com intensidade bem menor do que na amostra liofilizada com HpaCD. Isso está em consonância com o fato de, na presença

de HpBCD, ocorrer a agregação do PCUM em maior extensão, conforme indicado pelos resultados de RMN ¹H. Não há indícios por esta técnica da formação do complexo HpBCD-PCUM.

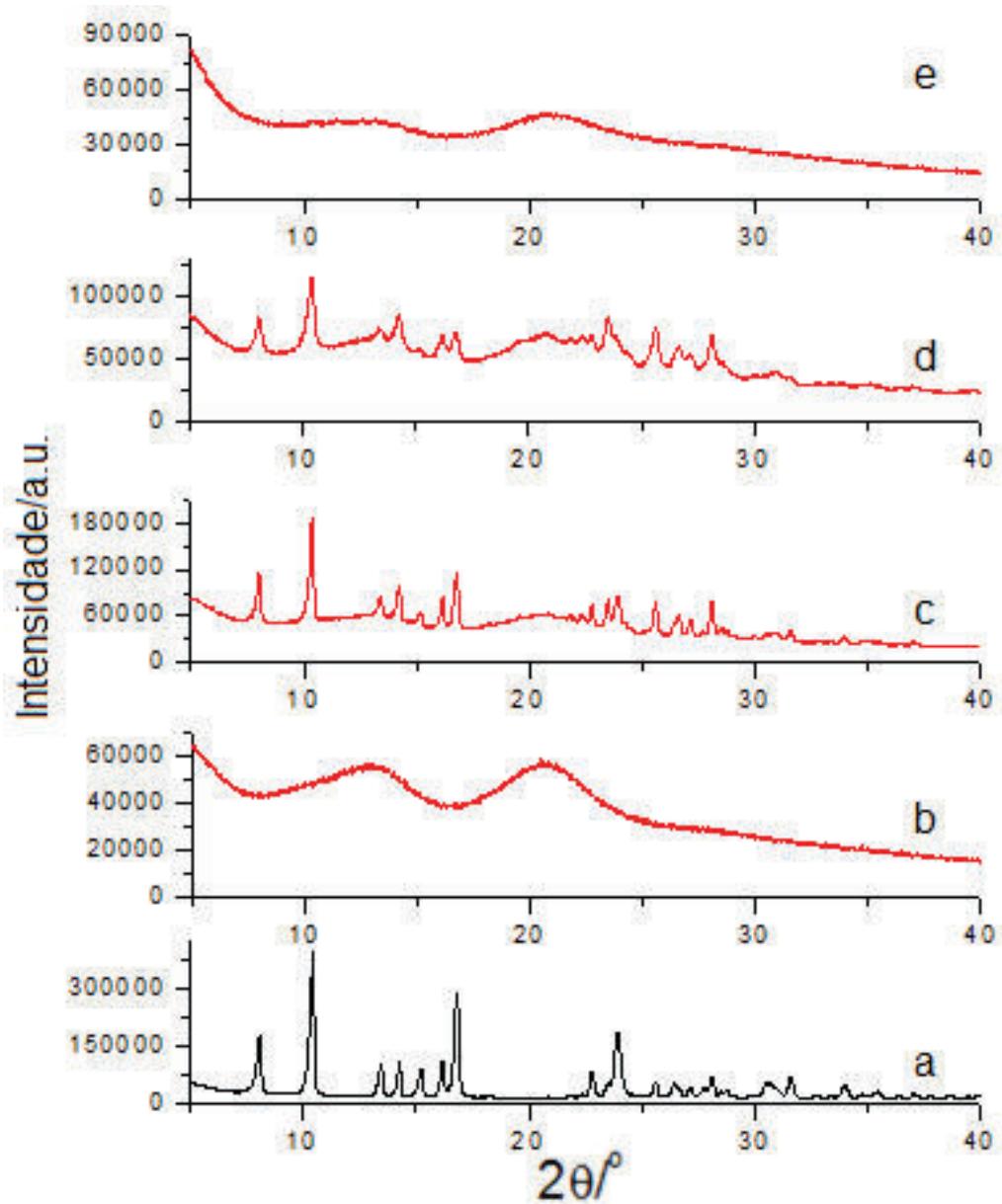
Na figura 31b verifica-se os picos relativos a HpYCD com diferentes graus de substituição em m/z = 1400- 1900. Na figura 31c verificam-se sinais do PCUM e da HpYCD, porém, da mesma forma que nas figuras 31c e 31d, não se observou nenhum sinal relativo ao complexo hospedeiro-convidado. A figura 30d, tem-se analogamente, o mesmo resultado que o obtido na figura 31c. Verifica-se para a amostra liofilizada, figura 31d, a presença do pico em m/z = 366 relativo ao PCUM, porém, com uma intensidade ainda menor do que a verificada para a amostra liofilizada com HpBCD, na figura 30d. Isso também corrobora o resultado observado no espectro de RMN de hidrogênio onde, a associação do PCUM com HpYCD provoca uma maior possível agregação da molécula do que a observada com HpBCD. Não há indícios por esta técnica da formação do complexo HpYCD-PCUM.

3.2.2 Caracterização em fase sólida

As amostras obtidas via liofilização e moagem por 3h foram primeiramente caracterizadas por difratometria de raio-x método do pó. (Fig.32 – 34)

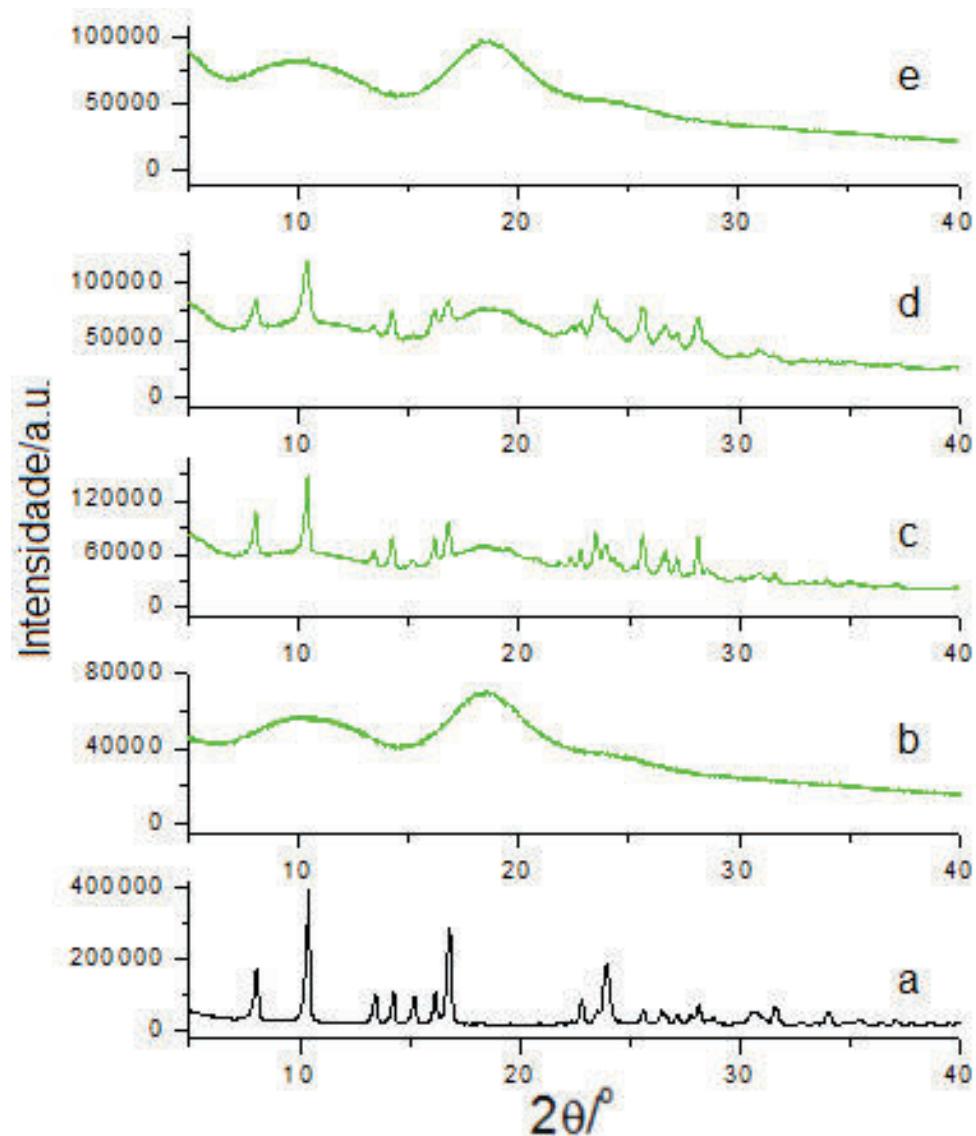
Como forma de melhor concluir a partir dos resultados as análises dessas amostras foram comparadas com amostras controle, neste casos perfis do pcum, das ciclodextrinas alfa beta e gama hidroxipropiladas e das respectivas misturas mecânicas cotendo ciclodextrina e PCUM (1:1).

Figura 32 - Difratogramas de raios X em pó das amostras: a) PCUM; b) HpaCD; c) Mistura mecânica; d) produto moído com HpaCD; e) produto lyofilizado com HpaCD



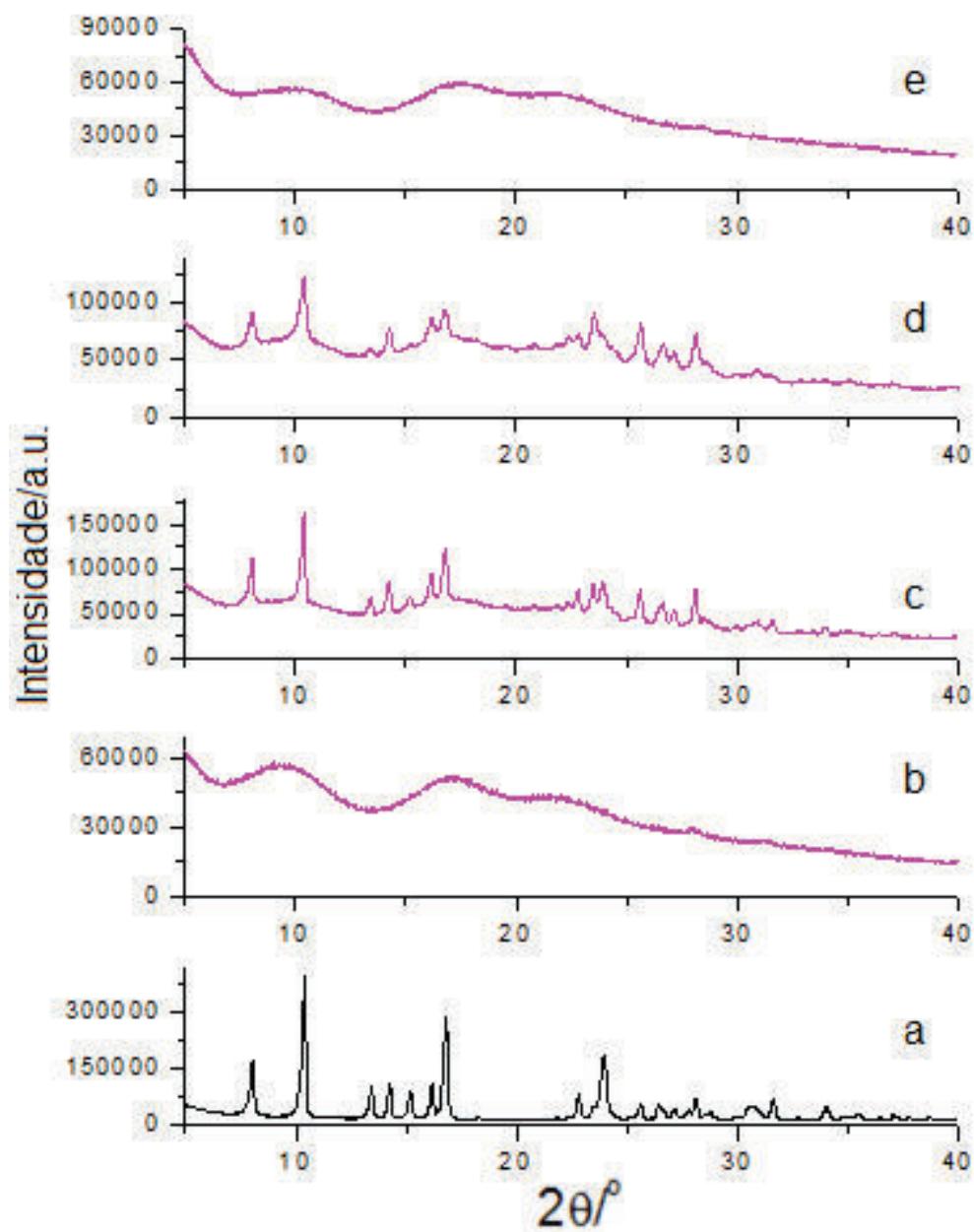
Fonte: O autor

Figura 33 - difratogramas de raios X em pó das amostras: a) PCUM; b) HpBCD; c) Mistura mecânica; d) produto moído com HpBCD; e) produto lyofilizado com HpBCD



Fonte: O autor

Figura 34 - Difratogramas de raios X em pó das amostras: a) PCUM; b) HpYCD; c) Mistura mecânica; d) produto moído com HpYCD; e) produto lyophilizado com HpYCD



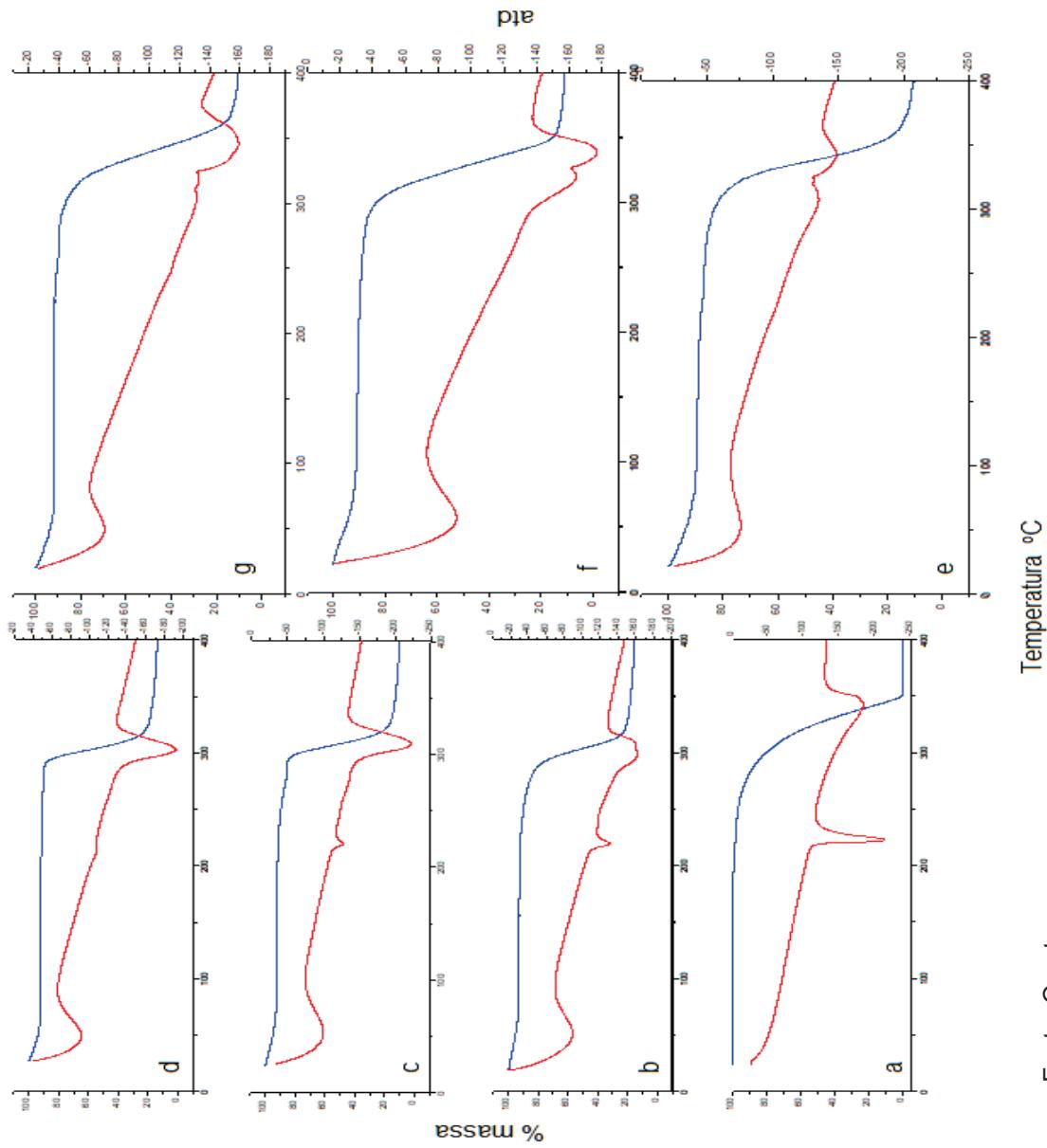
Fonte: O autor

Nas figuras 32b, 33b e 34b verifica-se os perfis de difração das ciclodextrinas HpaCD, HpBCD e HpYCD respectivamente. Nesses perfis verificam-se apenas arcos amorfos relativos a essas ciclodextrinas derivatizadas. Nas figuras 32c, 33c e 34c, observa-se os perfis de difração das misturas mecânicas contendo PCUM e HpaCD,

HpBCD e HpYCD, respectivamente. Nesses perfis é possível observar os arcos amorfos relativos as ciclodextrinas e também as reflexões do PCUM presentes. Nas figuras 32d, 33d e 34d, dos perfis de difração das amostras moídas com HpaCD, HpBCD e HpYCD observa-se um perfil de difração bem semelhante com os das respectivas misturas mecânicas, com os arcos amorfos das ciclodextrinas e os picos relativos ao PCUM presentes, porém, estes último com intensidades mais baixas e mais largos. Esse fato se deve a natureza da obtenção dessas amostras, uma extensiva moagem que leva a uma amorfização desses sinais. Nas figuras 32e, 33e e 34e, relativas aos perfis de difração das amostras liofilizadas com HpaCD, HpBCD e HpYCD, respectivamente, nota-se perfis de difração semelhantes ao das ciclodextrinas sozinhas, contendo apenas os arcos amorfos e sem a presença das reflexões relativas ao PCUM. Isso é um sinal da obtenção dos complexos por esse método, com a ressalva de que, pelos ensaios em fase líquida, constatou-se que para os produtos com as ciclodextrinas HpBCD e HpYCD houve uma possível agregação do PCUM e, portanto, a ausência das reflexões do PCUM verificada pela técnica DRX não seria uma comprovação da formação do complexo com essas ciclodextrinas.

Foram realizadas análises termogravimétricas (TG) e termodiferenciais (ATD) como parte da caracterização em fase sólida. A figura 35 mostra as curvas para as amostras liofilizadas e para os controles: o PCUM e as misturas mecânicas. A tabela 10 relaciona os valores de temperatura relativo aos processos e as respectivas perdas de massas.

Figura 35 - Curvas ATG (azul) e ATD (vermelho) para as amostras: a) PCUM; b) Mistura mecânica com HpaCD; c) Mistura mecânica com HpBCD; d) Mistura mecânica com HpYCD; e) produto lyophilizado com HpaCD; f) produto lyophilizado com HpBCD; g) produto lyophilizado com HpYCD



Fonte: O autor

Tabela 12 - Temperaturas e % em massa do processo de perda de massa para as amostras liofilizadas e seus controles.

Amostra	ΔT (°C)	Perda de massa (%)
PCUM	248,72 – 368,97	95,82
MM HpaCD	242,68 – 353,87	73,55
MM HpBCD	244,36 – 292,66	4,34
	292,66 – 348,85	71,47
MM HpYCD	280,75 – 347,84	73,54
Liofilizado HpaCD	181,59 – 286,84	4,31
	286,84 – 378,20	72,81
Liofilizado HpBCD	228,50 – 375,21	77,68
Liofilizado HpYCD	235,11 – 390,11	80,75

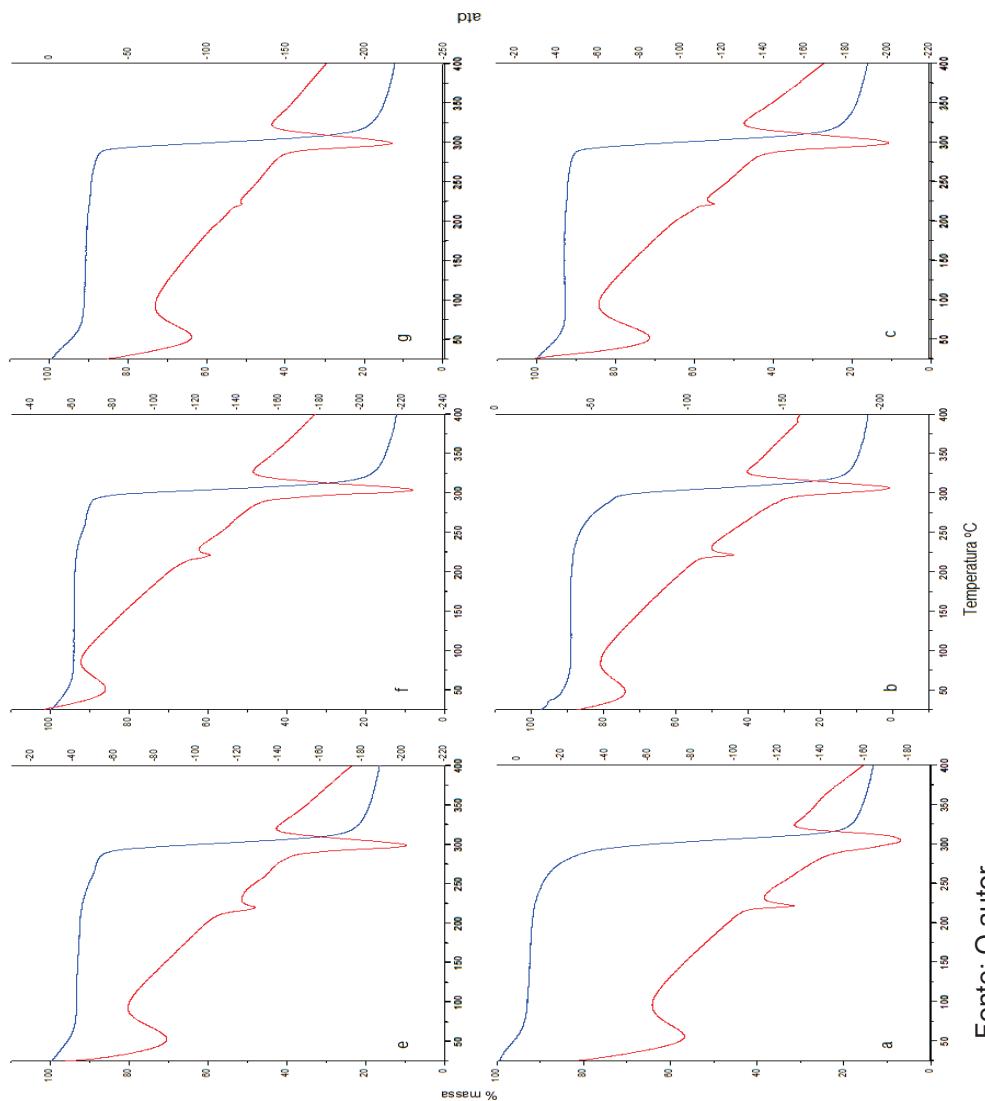
A partir da curva de ATD do PCUM verifica-se um pico endotérmico relativo ao processo de fusão em 223,22°C. Esse sinal também se encontra presente nas curvas de ATD da mistura mecânica com a HpaCD e HpBCD, porém, com menores intensidades do que para o pcum. Por outro lado, para a mistura mecânica com a HpYCD não se verifica sinal algum. A ausência de sinal relativo ao processo de fusão da molécula convidada pode ser um sinal de que houve o processo de inclusão. (Zanetti *et al.* 2023; Udrescu *et al.* 2015). Isso pode ser verificado para a amostra liofilizada com HpaCD e HpBCD, entretanto para a amostra liofilizada com HpYCD conforme já discutido anteriormente, não há a presença significativa do PCUM, além de estar presente o produto de degradação. Em contraste na mistura mecânica com essa ciclodextrina pode ter sido formado o composto de inclusão. Uma vez que, como afirmado acima, houve o desaparecimento do pico de fusão do PCUM.

Com relação as curvas de TG (todos os dados de temperaturas e perdas de massa se encontram na tabela 12), o PCUM apresenta perda de massa de 95,82% entre 248,72 °C e 368,97 °C. Para a mistura mecânica com HpaCD verifica-se uma perda de massa de 73,55% entre 242,68 °C e 353,87 °C. Esta perda de massa está associada a dois picos endotérmicos na curva de ATD localizados em 296, 85 °C e 310,44 °C. paralelamente, a amostra liofilizada com HpaCD, o perfil de perda de massa é diferente: nesse caso houve uma primeira perda de massa de 4,31% entre as temperaturas 181,59 °C a 286,84 °C, e uma segunda perda de massa de 72,81%

entre as temperaturas 286,84 °C a 378,20 °C. As perdas de massa estão associadas a dois picos na curva de ATD localizados em 308,68 °C e 343,88 °C. verifica-se q as curvas de TG e ATD nesse intervalo de temperatura para essas amostras são diferentes, o que significa dizer que a amostra liofilizada não reproduz a mistura mecânica. Para a mistura mecânica com a HpBCD verifica-se uma perda de massa de 71,47% entre as temperaturas de 244,36 °C a 292,66 °C. A perda de massa está associada a um pico na curva de ATD localizado em 309,93 °C. Por outro lado a amostra liofilizada com HpBCD há uma perda de massa de 77,68% entre as temperaturas de 228,50 °C e 375,21 °C . Esta perda de massa está associada a dois picos na curva de ATD localizados em 317,61 °C e 339,33 °C , o que faz com que o comportamento térmico seja diferente em relação a mistura mecânica. Estes resultados também levam a conclusão análoga que a para a amostra liofilizada com HpaCD, ou seja, não se trata de uma mistura mecânica. Por fim, para a mistura mecânica com HpYCD verifica-se uma perda de massa de 73,54% entre as temperaturas de 280,75 °C a 347,84 °C, está perda de massa está associada a um pico na curva de ATD em 303,23 °C. Para a amostra liofilizada com HpYCD verifica-se uma perda de massa de 80,75% entre as temperaturas de 235,11 °C a 390,21 °C. na curva de ATD se encontram dois picos relativos a essa perda de massa localizados em 317,99 °C e 345,47 °C. As curvas de TG e ATD para a amostra liofilizada com HpYCD mostram que essa amostra é diferente da mistura mecânica, porém, o comportamento térmico se assemelha ao da HpYCD pura, pois, como visto anteriormente, a quantidade de PCUM restante nessa amostra é, possivelmente, bem baixa e a amostra majoritariamente tem HpYCD na sua composição.

Como já discutido em outras técnicas, também foram sintetizadas amostras moídas e a formação dos compostos de inclusão foi avaliada para os tempos de moagem de 3h e 12h pelas técnicas de TG e ATD. As curvas estão presentes na figura 36 e os dados de perdas de massa e temperaturas se encontram na tabela 13.

Figura 36 - Curvas TG (azul) e ATD (vermelho) para as amostras: a) produto moído por 3h com HpaCD; b) produto moído por 3h com HpBCD; c) produto moído por 3h com HpYCD; d) produto moído por 12h com HpaCD; e) produto moído por 12h com HpBCD; f) produto moído por 12h com HpYCD.



Fonte: O autor

Tabela 13 - Temperaturas e % em massa do processo de perda de massa para as amostras moídas.

Amostra	ΔT (°C)	Perda de massa (%)
Moído HpaCD 3h	242,06 – 376,35	75,70
Moído HpaCD 12h	242,37 – 274,13	1,77
	274,13 – 375,34	71,18
Moído HpBCD 3h	242,86 – 376,95	79,55
Moído HpBCD 12h	237,05 – 272,43	2,14
	272,43 – 375,75	78,18
Moído HpYCD 3h	255,09 – 380,16	75,29
Moído HpYCD 12h	268,92 – 379,76	75,52

De forma geral, verifica-se nas curvas de ATD que o pico de fusão do PCUM em ~223 °C sofre perda de intensidade a medida que o tempo de moagem aumenta de 3 para 12 horas para todas a ciclodextrinas. Especificamente para HpYCD verifica-se que somente para 12h de moagem o pico relativo a fusão do PCUM desaparece, conforme mostrado na mistura mecânica (Fig. 36d). Com relação as curvas de TG verifica-se que a curva para a amostra moída 3h com HpaCD é análoga a da sua mistura mecânica correspondente (Fig. 36b); a evolução para 12h provoca uma mudança no perfil de perda de massas conforme verificado na tabela 11. Por outro lado, para a HpBCD, verifica-se que a amostra moída por 12h tem o perfil análogo a da sua mistura mecânica correspondente (Fig. 36c). Por fim, para HpYCD, verifica-se que a curva de TG mantém a forma tanto para a moagem de 3h quanto para a moagem de 12h, que por sua vez, é análoga a da sua mistura mecânica correspondente. Como o preparo das misturas mecânicas foi diferente do preparo das amostras moídas, uma vez que o primeiro se deu de forma manual em almofariz de ágata e a moagem se deu em um moinho de bolas, verifica-se que este segundo processo pode ter sido mais brando do que a simples mistura mecânica. Por exemplo, os dados evidenciaram que para a HpBCD e HpYCD é necessário um tempo de 12h de moagem para que as curvas de TG e ATD tivessem perfis semelhantes aos das suas misturas mecânicas (Fig. 36c e 36d).

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1 CONCLUSÕES

A espectroscopia de RMN de hidrogênio aponta para a formação do complexo com a inclusão da porção bromofenil de CHC na cavidade da ciclodextrina.

Estudos de espectroscopia UV-Vis usando o método de Job, e o método de Benesi-Hildebrand mostraram que a razão molar da interação entre CHC:HpBCD é 1:1. Experimentos DOSY mostraram que a constante de associação é 61.

As análises de TG e ATD sugeriram maior eficiência para formação do complexo pelo método mecanoquímico e liofilização. As caracterizações dos produtos sólidos por DRX e FTIR corroboraram que a inclusão ocorreu, ainda que parcialmente, pelas três rotas sintéticas. As visualizações de MEV mostraram homogeneidade para a distribuição do elemento Br apenas para a amostra moída.

Os ensaios biológicos anti-epimastigota mostraram uma eficácia superior dos complexos CHC:HpBCD em comparação com o CHC isolado. Neste aspecto a melhor amostra foi o complexo calcinado. A utilização de menor quantidade de CHC foi proporcionada a partir da complexação com ciclodextrina, através da melhoria da solubilidade do CHC.

Os espectros de RMN de hidrogênio apontam para a constante de formação entre o produto formado entre PCUM e HpaCD e HpBCD como sendo 6,54 e 16,59, respectivamente. Embora os valores sejam significativamente diferentes daqueles obtidos via *machine learning* os dois conjuntos convergem no sentido de mostrar a interação com a forma beta como a mais efetiva.

Esses ensaios de RMN de hidrogênio também apontaram uma modificação química do PCUM a partir da interação com as ciclodextrinas que possivelmente é oriunda de uma agregação dessa molécula. Esse efeito está diretamente ligado ao tamanho do tórus das ciclodextrinas. Este efeito não foi verificado para as amostras moídas.

Os ensaios de espectrometria de massas mostraram sinais da HpaCD e vinculados ao íon molecular do PCUM para as amostras moída e liofilizada. Este resultado sugere a formação do complexo somente com esta ciclodextrina.

Os difratogramas apontam para a formação do complexo para os produtos liofilizados (HPaCD e HPbCD) e a formação parcial do complexo para os produtos moídos.

A análise térmica mostrou diferenças entre as curvas ATD dos complexos liofilizados utilizando HpaCD e HpBCD; e as das respectivas misturas mecânicas. Nesse sentido verificou-se a diminuição/desaparecimento do pico de fusão do PCUM com a complexação. No caso do complexo liofilizado utilizando HpYCD não se verificou o pico de fusão do PCUM devido ao fato de muito pouco dessa molécula ter sido associada a ciclodextrina. Para as amostras moídas utilizando HpaCD; HpBCD e HpYCD as análises de ATD mostraram que um maior tempo de moagem leva a uma diminuição do pico de fusão do PCUM, o que leva a crer que, para estas amostras um maior tempo de moagem leva a uma complexação mais efetiva.

4.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Obtenção de compostos de inclusão com outras ciclodextrinas com diferentes substituintes como as ciclodextrinas metiladas ($R=CH_3$), ciclodextrinas sulfatadas ($R=SO_3^-Na^+$) e as ciclodextrinas nativas.

Testar outros veículos moleculares para essas mesmas moléculas como argilas aniónicas.

Realização de testes biológicos nos compostos de inclusão com a cumarina modificada (PCUM).

Obtenção e caracterização de compostos de inclusão do Benznidazol com ciclodextrinas e realização posterior dos testes biológicos, como forma de comparar com os dados obtidos na presente tese.

REFERENCIAS

- ADAMIAK, N *et al.* Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. *Front. Immunol.* v. 12, p. 746235, 2021
- AKASH, B. A. *et al.* Cytotoxicity of 5-Fluorouracil-Loaded, β -Cyclodextrin-Tethered Metallic Copper Nanoparticles on Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Molecular Structure*, v. 1295, p. 136530, 2024.
- ALBUQUERQUE, M. G. *et al.* Crystal structures, DFT calculations and Hirshfeld surface analysis of two (E)-3-(aryl)-1-(naphthalen-1-yl)prop-2-en-1-one chalcone derivatives, potential *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl ACP reductase (InhA) inhibitors and optical materials: conformational differences within the prop-2-en-1-one unit. *Journal of Molecular Structure*, v. 1246, n. 131091, 2021.
- ALCÂNTARA, I.S. *et al.* Cytotoxic potential and antiparasitic activity of the *Croton rhamnifolioides* Pax leaves. & K. Hoffm essential oil and its inclusion complex (EOCr/ β -CD). *Polymer Bulletin*, v. 79, n.2, p. 1175–1185, 2022.
- ALEMANHA, IFA - Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. **Registo de CAS RN 91-64-5**. Base de Dados de Substâncias GESTIS . 2019. Disponível em: <https://gestis.dguv.de/data?name=490110&lang=en>. Acesso em: 20 Ago 2023
- AMARAL B.R. *et al.* Development and characterization of thermopressed polyvinyl alcohol films for buccal delivery of benznidazole, *Materials Science & Engineering C* v. 119, n. 111546, Fev. 2021.
- AMOROS, M. *et al.* Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 12, p. 1732-1740, 1992.
- AREE, T. How cyclodextrin encapsulation improves molecular stability of apple polyphenols phloretin, phlorizin, and ferulic acid: Atomistic insights through structural chemistry. *Food Chemistry*, v. 409, p. 135326, 2023
- ARRUÁ, E. C. *et al.* Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. *Acta Tropica*, v. 198, p. 105080, 2019.
- AUGIS, L. *et al.* Development of nanoparticles based on amphiphilic cyclodextrins for the delivery of active substances. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 651, p. 123723, 2024.
- ÁVILA, H. P. *et al.* Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 9794, 2008.
- BARBOSA, J. M. C. *et al.* Characterization and trypanocidal activity of a β -lapachone-containing drug carrier. *PLoS ONE*, v. 16, n. 3, p. e0246811, 2021.

BARCELLOS, J. P. A. *et al.* Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. **Materials Science & Engineering C**, v. 2017, n. 79, p. 932-941, 2017.

BARROS, A.V. *et al.* Mechanisms of antiviral action of seeds from *Guettarda angelica* Mart. against bovine and swine herpesviruses in vitro. **Virus Reviews and Research**, v. 15, p. 78-91, 2010.

BATISTA, M.F. *et al.* The Parasitic Intracellular lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 396, 2020.

BEDOGNI, G. *et al.* Elucidating the complexation of nifurtimox with cyclodextrins. **Journal of Molecular Liquids**, v. 382, p. 121852, 2023.

BENSOUIKI, S. *et al.* Synthesis of cyclodextrins-metronidazole inclusion complexes and incorporation of metronidazole - 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 1247, p. 131298, 2022.

BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, Abr. 2016 doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017.

BERN C.M.D. Chagas' Disease. **N Engl J Med**. v. 373, n. 5, p. 456-466, Jul., 2015.

BEZERRA, B.P. *et al.* Cocrystal polymorphs and solvates of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole with improved dissolution performance. **Crystal Growth & Design**. v. 20, n.7, p. 4707-4718, 2020

BLANCO, Z. *et al.* Synthesis, Leishmanicidal, Trypanocidal, Antiproliferative Assay and Apoptotic Induction of (2-Phenoxypyridin-3-yl)naphthalene-1(2H)-one Derivatives. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5626, 2022.

BORTOLUZZI, A.A.M. *et al.* Determination of chemical structure and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of extracts from the roots of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, jan. 2021.

BRAGA, M.A. *et al.* Clonidine complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: From physico-chemical characterization to in vivo adjuvant effect in local anesthesia. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p. 27-36, 2016.

BRAMHANE, D.M. *et al.* Characterization of pioglitazone cyclodextrin complexes: Molecular modeling to in vivo evaluation. **J Pharm Bioall Sci**, v. 8, p. 161-169, 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. Doença de chagas aguda. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, Goiânia, v. 36, n. 3, 2010 Disponível em: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/10738>. Acesso em: 20 Ago. 2023.

BRILLAS, E. A critical review on ibuprofen removal from synthetic waters, natural waters, and real wastewaters by advanced oxidation processes. **Chemosphere**, v. 286, p. 131849, 2022.

BUDZIAK, I.; ARCZEWSKA, M.; KAMIŃSKI, D. M. Structure and Physical Properties of Cardamonin: A Spectroscopic and Computational Approach. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4070, Sep. 2020.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 6, p. 93–100, 1964

CASTRO, J.A.; DE MECCA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American tripanosomiasis). **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 25, p. 471-479, 2006.

CAVALCANTE, C.H.L. *et al.* Antichagasic evaluation, molecular docking and ADMET properties of the chalcone (2E)-3-(2-fluorophenyl)-1-(2-hydroxy- 3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 15, p. 7463-7479, 2023.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention**. American Trypanosomiasis. DPDx – Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Jun, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>. Acesso em: 20 Ago 2023

CHANDRAKANTH, M. *et al.* Coumarin–1,2,4-triazole hybrids: Recent advances in synthesis and medicinal applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1299, p. 137197, 2024.

CHEN, Y. *et al.* Sonochemical synthesis of γ -CD-MOFs microcapsule for myricetin delivery: Study of adsorption mechanism, molecular simulation, solubility, antioxidation, biocompatibility, and in vitro digestion. **Food Hydrocolloids**, v. 147, p. 109318, 2024.

CHENG, C. *et al.* β -Cyclodextrin based Pickering emulsions for α -tocopherol delivery: Antioxidation stability and bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 438, p. 138000, 2024.

COA, J. C. *et al.* Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of quinoline-chalcone and quinoline-chromone hybrids. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 7, 2017.

COLLUM, D.B. *et al.* Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 52, p. 11998 – 12013, 2013.

COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 642-645, 2010.

CUELLAR, J.E. *et al.* Coumoro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. **Heliyon**, v. 8, p. e08939, 2022.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; SÁ-BARRETO, L.C.L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28, n.1, p.1-9, 2007.

DA SILVA, A.A. *et al.* Synthesis, characterization and antichagasic evaluation of thiosemicarbazones prepared from chalcones and dibenzalacetones. **Journal of Molecular Structure**, v. 1232, p. 130014, 2021.

Da SILVA, F. L. O. *et al.* Encapsulation of benznidazole in nanostructured lipid carriers and increased trypanocidal activity in a resistant Trypanosoma cruzi strain. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, p. e22111, 2023.

DANG, L. H. *et al.* Syringeable hydrogel based β -cyclodextrin and mixed micelles for methotrexate delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 92, p. 105299, 2024.

DE OLIVEIRA, O.V.; VIEGAS, R.G. Cucurbit[7]uril as a possible nanocarrier for the antichagasic benznidazole: a computational approach. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**. v. 98, n. 1-2, p 93-103. 2020.

DENG, C. *et al.* Formation and stabilization mechanism of β -cyclodextrin inclusion complex with C10 aroma molecules. **Food Hydrocolloids**, v. 123, p. 107013, 2022.

DING, M. *et al.* An in-depth physicochemical investigation of drug-loaded core–shell UiO66 nanoMOFs†. **RSC Adv.**, v. 14, p. 1676, 2024.

EKBOTE, A. *et al.* Structure and nonlinear optical properties of (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(3-chlorophenyl) prop-2-en-1-one: A promising new D- π -A- π -D type chalcone derivative crystal for nonlinear optical devices. **Journal of Molecular Structure**, v. 1129, p. 239-247, 2017.

EL-SAYED, S. E. *et al.* Nanosponge hydrogel of octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propanoate of *Alcaligenes faecalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 100, 2024.

ESPINOZA-HICKS, J.C. *et al.* Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 402-413, 2019.

FABRIS, Marciéli. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA DE DERIVADOS CUMARÍNICOS FUNCIONALIZADOS**. 133f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas. Londrina, 2019.

FERRAZ, L. R. M. *et al.* Benznidazole in vitro dissolution release from a pH-sensitive drug delivery system using Zif-8 as a carrier. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 59, 2021.

FERRAZ, L. R. M., *et al.* ZIF-8 as a promising drug delivery system for benznidazole: development, characterization, in vitro dialysis release and cytotoxicity. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 16815, 2020.

FINI, A. *et al.* ATR/Raman and Fractal Characterization of HPBCD/Progesterone Complex Solid Particles. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, September 2008.

FRANCO, D.P. *et al.* A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Quim. Nova**, v. 44, n. 2, p. 180-197, 2021.

FRENCH, D. The Schardinger dextrans. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 12, p. 189–260, 1957.

FREUDENBERG, K.; MEYER-DELIUS, M. Über die Schardinger-dextrine aus Starke. **Ber. Chem.**, v. 71, p. 1596–1600, 1938.

GOMES, K.S. *et al.* Structure-activity relationship study of antitrypanosomal chalcone derivatives using multivariate analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 29, n. 12, p. 1459 - 1462, 2019.

GONZÁLEZ, L.A. *et al.* Synthesis and evaluation of trypanocidal activity of chromane-type compounds and acetophenones. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7067, 2021.

GRYGOROVA, G. *et al.* Stable nanometer-size beta-cyclodextrin – CeO₂-x colloidal nanoparticles with high free radical scavenging activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 396, p. 124091, 2024.

HE, S. *et al.* Dual-responsive supramolecular photodynamic nanomedicine with activatable immunomodulation for enhanced antitumor therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 14, n. 2, p. 765-780, 2024.

HERMEAN, A. *et al.* Chrysin Directing an Enhanced Solubility through the Formation of a Supramolecular Cyclodextrin–Calixarene Drug Delivery System: A Potential Strategy in Antifibrotic Diabetes Therapeutics. **Pharmaceutics**, v. 17, p. 107, 2024.

HIROSE, K. Quantitative Analysis of Binding Properties. In: **Analytical Methods in Supramolecular Chemistry**, 1&2, Second Edition. Chapter 2. SCHALLEY, C.A. (Ed.), 2012.

HOTEZ, P.J. *et al.* Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 2016.

HUANG, T. *et al.* One-step synthesis of cyclodextrin-based fluorescent hyperbranched polymer as type I photosensitizer for effective photodynamic therapy. **Dyes and Pigments**, v. 223, p. 111928, 2024.

HUANG, Y. *et al.* γ -Cyclodextrin metal-organic frameworks as the promising carrier for pulmonary delivery of cyclosporine A. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 171, p. 116174, 2024.

INOUE, Y. NMR Studies of the Structure and Properties of cyclodextrins and Their Inclusion Complexes. **Annual reports on nmr spectroscopy**, v. 27, p. 1993, 1993.

JESUS, M. B.; PINTO, L.M. A.; FRACETO, L. F. Ciclodextrinas: Aspectos Históricos e Características Químicas. **Química no Brasil**, v. 3, n. 2, p. 133-144, 2009.

KAHRAMAN, E.N.; SAÇAN, M. T. Predicting Cytotoxicity and Enzymatic Activity of Diverse Chemicals Using Goldfish Scale Tissue and Topminnow Hepatoma Cell Line-based Data. **Mol. Inf.**, v. 38, p. 1800127, 2019.

KALI, G.; HADDADZADEGAN, S.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: New developments, relevant clinical trials, and advanced products. **Carbohydrate Polymers**, vol. 324, p. 121500, 2024.

KAUR, K.; JINDAL, R. A comparative study of the interactions of 5-fluorouracil and Amlodipine Besylate in aqueous β -cyclodextrin solution and drug release studies. **Polymer Bulletin**, v. 81, p. 2719–2740, 2024.

LE-DEYGEN, I. *et al.* Thermodynamics and molecular insight in guest–host complexes of fluoroquinolones with β -cyclodextrin derivatives, as revealed by ATR-FTIR spectroscopy and molecular modeling experiments. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 409, p. 6451–6462, 2017.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R.G. **Phys. Rev. B**, v. 37, p. 785-789, 1988.

LI, J.; DING, Y.-F.; WANG, Z.; CHENG, Q.; WEI, J.; YANG, Z.; WANG, R. TAM-preferential nanoparticles intracellularly self-assembled for enhanced macrophage repolarization and cancer immunotherapy. **Nano Today**, v. 54, p. 102104, 2024

LI, X. *et al.* Nanocarrier-enhanced intracellular delivery of benznidazole for treatment of *Trypanosoma cruzi* infection. **JCI Insight**, v. 6, n. 9, 2021, e145523.

LIDANI, K.C.F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 166, Jul., 2019.

BONNEY, K.M. *et al.* Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 14, p. 421-447, 2019.

LIN, H. *et al.* Supramolecular complex glycoconjugate vaccine generates self-enhancement effects for carbohydrate antigen delivery. **Chinese Chemical Letters**, v. 35, p. 108670, 2024

- LINCIANO, P. *et al.* The discovery of aryl-2-nitroethyl triamino pyrimidines as anti-*Trypanosoma brucei* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 264, p. 115946, 2024.
- LIU, H. *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclodextrin-based oral drug delivery formulations for disease therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 329, p. 121763, 2024.
- LIU, T. *et al.* Efficient formation of carvacrol inclusion complexes during β -cyclodextrin glycosyltransferase-catalyzed cyclodextrin synthesis. **Food Control**, v. 130, p. 108296, 2021.
- LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, 2007.
- MALANGA, M. *et al.* "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-11, 2016.
- MALTA, L. F. B. *et al.* Recognition mechanism of D- and L-tryptophan enantiomers using 2-hydroxypropyl- α - or β -cyclodextrins as chiral selectors. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 1182–1188, 2008.
- MACHADO, V.G. *et al.* Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p.360-368, 2008
- MANIKANTAN, V. *et al.* Engineered praseodymium sulfide nanocarrier and supramolecular association of anticancer drug for effective delivery to breast cancer cells. **Journal of Biotechnology**, v. 381, p. 100–108, 2024.
- MATADA, B. S.; PATTANASHETTAR, R.; YERNALE, N. G. A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 32, p. 115973, 2021.
- MAZZETI, A.L. *et al.* Benznidazole self-emulsifying delivery system: A novel alternative dosage form for Chagas disease treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 145, n. 105234, 2020.
- MEMARIANI, H., MEMARIANI, M. Melittin as a promising anti-protozoan peptide: current knowledge and future prospects. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 69, 2021.
- MORILLO, C.A. *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939-947, 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

- MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 238–250, 2014.
- MURACA, G. et al. Nanostructured lipid carriers containing benznidazole: physicochemical, biopharmaceutical and cellular in vitro studies. **Beilstein J. Nanotechnol.**, v. 14, p. 804–818, 2023.
- QUIJIA, C. R. et al. Liposomes Composed by Membrane Lipid Extracts from Macrophage Cell Line as a Delivery of the Trypanocidal N,N'-Squaramide 17 towards *Trypanosoma cruzi*. **Materials**, v. 13, p. 5505, 2020.
- NDAYISHIMIYE, J. et al. Supercritical carbon dioxide assisted complexation of benznidazole: γ -cyclodextrin for improved dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 596, p. 120240, 2021.
- NHAVENE, E. P. F. et al. Chitosan grafted into mesoporous silica nanoparticles as benznidazole carrier for Chagas diseases treatment. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 272, p. 265–275, 2018.
- NICOLETTI, C. D. et al. Inclusion complex of O-allyl-lawsone with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation, physical characterization, antiparasitic and antifungal activity. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 55, p. 233–248, 2023.
- NICOLETTI, C.D. et al. Synthesis and biological evaluation of β -lapachone and nor- β -lapachone complexes with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as trypanocidal agents. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 52, p. 185–197, 2020.
- NOGUEIRAS-NIETO, L. et al. Competitive displacement of drugs from cyclodextrin inclusion complex by polypseudorotaxane formation with poloxamer: Implications in drug solubilization and delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 585–595, 2012.
- NOUR, S. et al. *Severinia buxifolia* Leaves: Isolation, Characterization of Major Metabolites from the Bioactive Fractions and their Antiprotozoal Activity. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 18, 2023.
- NUNES, J.A. et al. Coumarin-based derivatives targeting *Trypanosoma cruzi* cruzain and *Trypanosoma brucei* cathepsin L-like proteases. **New Journal of Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 10127–10146, 2023.
- OLIVEIRA, V.S. et al. Therapeutic Applications of Solid Dispersions for Drugs and New Molecules: In Vitro and In Vivo Activities. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 933, 2020.

OMS, Organização Mundial da Saúde. (2020). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1. Acesso em: 20 ago 2023

OMS, Organização Mundial da Saúde. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Geneva: World Health Organization. Abr. 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 20 Ago. 2023.

PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**. n. 391, p. 82–94, 2018.

BOCCHI, E.A. *et al.* Chronic Chagas Heart Disease Management From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 70, n.12, 2017.

PISE, A. G., PISE, S. A. Archaeosomes for both cell-based delivery applications and drug-based delivery applications. **Journal of Microbiology, Pathology and Advanced Sciences**, v. 11, n. 3, 2021.

PITASSE-SANTOS, P. *et al.* A Novel Protocol for the Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles Active against Trypanosomatids and Drug-Resistant Leukemia Cell Lines. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 403, 2022.

POZO-MARTÍNEZ, J. *et al.* Synthesis and study of the trypanocidal activity of catechol-containing 3-arylcoumarins, inclusion in β -cyclodextrin complexes and combination with benznidazole. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, p. 103641, 2022.

PRINGSHEIM, H. Chemistry of the Saccharides. **McGraw-Hill**, New York, p. 280, 1932

RASSI Jr, A.; NETO, J.A.M.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the benznidazole evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 112, n. 3,p. 224-235. 2017

REIGADA, C. *et al.* Trypanocidal activity of liposomal isotretinoin and loratadine formulations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, p. 105241, 2024

RIAL, M.S. *et al.* In vitro studies and preclinical evaluation of benznidazole microparticles in the acute *Trypanosoma cruzi* murine model. **Parasitology**, v. 148, p. 566–575, 2011.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, K.D. *et al.* Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. **Bioorganic Chemistry**, v. 100, p. 103894, 2020.

ROLON, M. *et al.* Solid Nanomedicines of Nifurtimox and Benznidazole for the Oral Treatment of Chagas Disease. **Pharmaceutics**, v. 14, p. 1822, 2022.

SALES JUNIOR, P.A. *et al.* Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the benznidazole evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303. 2017.

SBÂRCEA, L. *et al.* Betulonic acid—cyclodextrins inclusion complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, p. 2787-2797, 2019.

SCHARDINGER, F. Über Thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährösungen, darunter krystallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Starke. **Z. Untersuch. Nahr. u. Genusssm.**, v. 6, p. 865–880, 1903

SI, Y. *et al.* CD-MOFs: From preparation to drug delivery and therapeutic application. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, p. 121424, 2024.

SOUZA, D. S. M.; POVOA, R. M. S. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA NO BRASIL E NA AMÉRICA LATINA. **Rev Soc Cardiol.** São Paulo, v. 26, n. 4, p. 222-229, 2016.

SPARTAN 10. Wave Function, Inc., Irvine, CA, USA.

STRECK, L. *et al.* Tailoring microstructural, drug release properties, and antichagasic efficacy of biocompatible oil-in-water benznidazol-loaded nanoemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 555, p. 36–48, 2019.

SUN, C. *et al.* Ultrasound-mediated molecular self-assemble of thymol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for fruit preservation. **Food Chemistry**, v. 363, p. 130327, 2021.

SWAIN, S.K. *et al.* Effect of β -cyclodextrin decoration on structural, optical and magnetic properties of luminescent magnetic nanoparticles and its application as a drug carrier. **Journal of Molecular Structure**, v. 1247, p. 131330, 2022.

SYCHROVÁ, A. *et al.* Natural compounds with dual antimicrobial and antiinflammatory effects. **Phytochem Rev**, 2020.

TABLET, C.; MATEI, I.; HILLEBRAND, M. The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations, Stoichiometry and Research - **The Importance of Quantity in Biomedicine**, Dr Alessio Innocenti (Ed.), ISBN: 978-953-51-0198-7, InTech, 2012.

TAHIL, G. *et al.* Curated dataset of association constants between a cyclodextrin and a guest for machine learning. **Chemical Data Collections**, v. 45, p. 101022, 2023.

THIRUNAVUKKARASU, M. *et al.* Computational spectroscopic investigations on structural validation with IR and Raman experimental evidence, projection of ultraviolet-visible excitations, natural bond orbital interpretations, and molecular docking studies under the biological investigation on N-Benzylloxycarbonyl-L-Aspartic acid 1-Benzyl ester. **Chemical Data Collections**, v. 31, p. 100622, 2021

TORRICO, F. *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **Lancet Infect Dis.** v. 18, p. 258-267, 2018.

TRANDAFIRESCU, C. *et al.* Albendazole-cyclodextrins binary systems Thermal and spectral investigation on drug-excipient interaction. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, p. 3039–3054, 2019.

TSUCHIYA, Y. *et al.* Antiviral activity of natural occurring flavonoids in vitro. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 3381-3386, 1985.

UDRESCU, L. *et al.* Physicochemical characterization of zofenopril inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 80, n. 4, p. 485–497, 2015.

VASCONCELOS, C. I. *et al.* Stress Induces Release of Extracellular Vesicles by Trypanosoma cruzi Trypomastigotes. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, Article ID 2939693, 12 pages, 2021.

VENTURINI, C. *et al.* Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VILLIERS, A. Sur la transformation de la féculle en dextrine par le ferment butyrique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, p. 435, 1891

VOS, VOSviewer, Software (Versão 1.6.19). desenvolvido por Nees Jan van Eck e Ludo Waltman, **Centre for Science and Technology Studies (CWTS)**, Universidade de Leiden, Holanda, 2016.

WANG, Y. *et al.* Recent advance of nanoparticle-based topical drug delivery to the posterior segment of the eye. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 7, p. 687-701, 2018.

ZANETTI, I. *et al.* Cyclodextrin-encapsulated new drug with promising anti-Trypanosoma cruzi activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 148, p. 10821-10834, 2023.

ZEKI, N.M.; MUSTAFA, Y.F.(a) 6,7-Coumarin-heterocyclic hybrids: A comprehensive review of their natural sources, synthetic approaches, and bioactivity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1303, p. 137601, 2024(a)

ZEKI, N.M.; MUSTAFA, Y.F.(b) Coumarin hybrids for targeted therapies: A promising approach for potential drug candidates. **Phytochemistry Letters**, v. 60, p. 117–133, 2024(b)

ZHOU, J. *et al.* Bifunctional drug delivery system with carbonic anhydrase IX targeting and glutathione-responsivity driven by host-guest amphiphiles for effective tumor therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 326, p. 121577, 2024.

ZOPPETTI, G. *et al.* Solid State Characterization of Progesterone in a Freeze Dried 1:2 Progesterone/HPBCD Mixture. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 7, p. 2007, 2007.

APÊNDICE

Apêndice A - Artigo publicado intitulado: Cyclodextrin-encapsulated new drug with promising anti-*Trypanosoma cruzi* activity.

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry
<https://doi.org/10.1007/s10973-023-12403-x>



Cyclodextrin-encapsulated new drug with promising anti-*Trypanosoma cruzi* activity

Igor Zanetti¹ · Laudicéa do Nascimento Oliveira¹ · Fernanda Lima de Azevedo Maia¹ · Kaio Maciel de Santiago-Silva² · Patricia M. L. Pereira³ · Magaly Girão Albuquerque¹ · Raoni Schroeder Borges Gonçalves¹ · Marcelle de Lima Ferreira Bispo¹ · Sueli F. Yamada-Ogatta³ · Alvíclér Magalhães¹ · Camilo Henrique da Silva Lima¹ · Luiz Fernando Brum Malta¹

Received: 22 December 2022 / Accepted: 13 July 2023
 © Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2023

Abstract

In the present study, a host–guest complex was obtained between a modified Chalcone (CHC) with anti *T. cruzi* activity and hydroxypropyl beta-cyclodextrin (HpBCD). This approach was chosen due to the low water solubility of CHC, in a drug delivery approach against Chagas disease. The complexes CHC:HpBCD were obtained by three synthetic routes: lyophilization, grinding method and calcinated method. TG assays point to the formation of an in situ complex of CHC with HpBCD. The ¹H NMR assays give an idea of how the inclusion of CHC in HpBCD occurs and give the association constant of these species, that is around 60. UV–vis measurements demonstrate that the stoichiometry of complexation is 1:1. The FTIR and PXRD results show that solid state complex formation was successfully formed. Biological assays were carried out and demonstrate that the obtained complexes have antiparasitic activity against *T. cruzi*, having the advantage of a better water solubility and requiring a smaller mass amount of CHC to work.

Keywords Chagas disease · Modified chalcone · Cyclodextrin · Host–guest complex

Introduction

Tropical neglected diseases are a group of diseases with few drugs developed to fight against them and few resources devoted to the development of new drugs. In this group, there are diseases such as leprosy, leishmaniasis, sleeping sickness, and Chagas disease [1].

It is estimated that 8 million people around the world live with the Chagas disease and more than 10,000 deaths

are registered each year. It is a health problem that presents high economical and human challenge to the country, either considering the efficient treatment of patients or considering their disablement of the sick for the work tasks [2–4]. Chagas disease is an endemic disease in South and Central America, but it also affects people from other locations. Around 400,000 people with the disease live in non-endemic countries, mainly in the USA and Europe [5].

Chagas disease is transmitted by the kissing bug insect (*triatominae*), which excretes the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) when biting humans [6].

The protozoan that causes Chagas disease enters the bloodstream, lodges, and replicates in tissues of organs such as the heart. Chagas disease manifests itself in two phases: the acute phase, shortly after infection with symptoms such as fever, nausea; and the chronic phase that can be developed after years of the inoculation and that bring problems such as heart disease, and swelling of the affected organs [7, 8].

There are only two drugs available to the Chagas disease treatment, produced in the 1970s: Benzimidazole and Nifurtimox. Both are heterocyclic molecules that, through nitroreduction, generate reactive oxygenated species (ROS)

Igor Zanetti
 igorzanetti@ufrj.br

¹ Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CT, Block A, 6th Floor, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil

² Departamento de Química, Centro de Ciencias Exactas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná 86065-970, Brazil

³ Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná 86057-970, Brazil

inside the parasite causing its death [6]. These drugs, however, have adverse effects, high toxicity, low bioavailability, low solubility, and, in the chronic phase of the disease, present low efficacy against the parasite. Therefore, there is a need for studies of new molecules [4, 9].

Chalcones, open-chain flavonoids naturally occurring in several plants, are known for their anti-inflammatory, antioxidant, and even antiparasitic action. For this reason, are the target of studies in the search of a possible new molecule with activity against *T. cruzi* [10–13]. The drug candidate molecule present in this work is a modified chalcone (Fig. 1) with anti-*T. cruzi* activity.

In addition to the design of new molecules, it is also necessary to consider strategies such as drug delivery systems, whereas around 40% of drugs are insoluble [14].

There are several strategies used in drug delivery systems in the literature. Vital de Oliveira et al. [3] describe the use of Curcubit [7] uril, a macrocycle with capacity for encapsulation of neutral and cationic species as an alternative to the low solubility of Benznidazole. Barcellos et al. [15] use nanoprecipitation in their work to encapsulate ursolic acid in poly- ϵ -caprolactone to combat chagas disease. Mazzetti et al. [2] cited self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) as a mean of circumventing the solubility problem of the Benznidazole. Amaral et al. [16] used polyvinyl alcohol films as a molecular vehicle for benznidazole. Bezerra et al. [17], in his work, used cocrystals of salicylic acid as a mean of improving the solubility of drugs. Arrua et al. [18] cited the solubility difficulties of benznidazole and nifurtimox and reinforced the important role of the encapsulation of these molecules, with highlights for molecular vehicles based on lipids and cyclodextrins.

Cyclodextrins, oligosaccharides composed of α -(1,4) glucopyranose, are macrocycles widely used for the formation of host–guest complexes with lipophilic drugs due to its toroidal shape and hydrophobic interior thereby increasing the solubility of encapsulated due to its hydrophilic environment outside cavity [19–21]. Cyclodextrins are

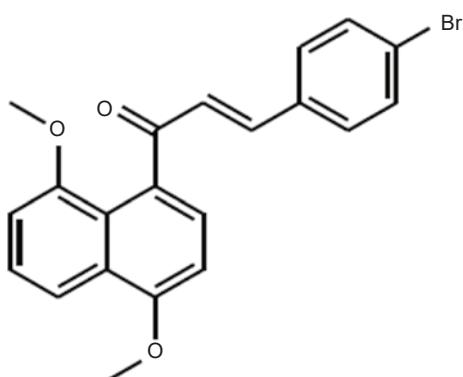


Fig. 1 Modified chalcone (CHC)

used extensively as a molecular vehicle for insoluble drugs, including for Chagas diseases treatment [22–24].

The present work presents a study of the encapsulation of the anti-Chagas drug (CHC) in 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HpBCD). The objective of this work is to obtain this host–guest complex by three different synthetic routes and characterize the possible inclusion complexes formed using techniques such as powder X-rays diffraction (PXRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), UV electronic spectroscopy (UV–vis) and ^1H NMR spectroscopy. Also biological tests toward anti-parasitic activity involving the application of inclusion complexes are also reported.

Materials and methods

In-solution UV–vis spectrophotometry characterization

To find the stoichiometric ratio between CHC (G) and HpBCD (H), the continuous variation method (Job's plot) was used [25, 26]. Using 1:1 acetonitrile/water as solvent, 11 samples were prepared, each one containing a total H+G of 1×10^{-7} mol in 2 mL of solution hence varying the molar fraction of CHC from 0 to 1 without changing the total number of moles. The study was made in duplicate samples. UV–vis spectra were obtained from them.

The host–guest (HG) stoichiometry ratio was also obtained from the Benesi–Hildebrand model [27] adjusted to experimental data. The apparent association constant between HG species was calculated using this graphical relationship. In this set of experiments, 1:1 acetonitrile: water was employed as solvent. Each sample had 2 mL of the solution. In this study, 20 samples were prepared varying the concentrations of HpBCD from 1×10^{-5} mol L^{-1} to 2.5×10^{-3} mol L^{-1} , with a fixed concentration of CHC of 1×10^{-5} mol L^{-1} in each sample. UV–vis spectra were obtained from the samples.

The electronic spectra of ultraviolet–visible absorption (UV–vis) were obtained by spectrometer Varian model Cary 1E. The samples were analyzed in quartz cuvettes with 1 cm of the optical path and were measured in the 200 to 900 nm range.

^1H -NMR spectroscopy characterization

The ^1H NMR spectra were obtained using a Bruker 400 MHzXRD-400 spectrometer. The samples were prepared in glass tubes using 10 mg of material and 0.6 mL of deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO), with tetramethylsilane of internal standard.

Pulse field gradient (PFG) NMR spectra were acquired using a pulse gradient stimulated echo using bipolar gradient pulses for diffusion. Diffusion coefficients were measured by incrementing the amplitude of the field gradient pulses in eight steps (0.68–13.62 G cm^{−1}). The duration of the field gradient pulse (10 ms) and the diffusion time (20 ms) were constant.

Solid-state host–guest complex synthesis

The host–guest complex CHC:HpBCD was obtained by three different routes: lyophilization, grinding method, and calcination method.

For lyophilization, 10 mg of CHC were added to a 50 mL of 7.5×10^{-1} mol L^{−1} HpBCD aqueous solution under stirring for 24 h at 25 °C. The solution was then lyophilized until a white powder remained.

In the grinding method, 150 mg of a 1:1 CHC:HpBCD ratio mixture was placed in a ball mill. This mixture remained for 3 h in the grinding process.

In the calcination method process, 150 mg of a 1:1 CHC:HpBCD was calcinated at 180 °C for 3 h. Each sample was characterized by powder X-rays diffraction (PXRD), Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and/or differential thermogravimetric (DTG) analysis.

Solid-state complex characterization

The FTIR spectra were obtained in spectrometer Nicolet Magna-IR 760 with 16 accumulations and 4 cm^{−1} of resolution in the region of 4,000–400 cm^{−1}. The samples were prepared in KBr tablets in a proportion of 100:1 w/w between salt and sample.

The powder x-rays diffractograms were obtained with an equipment Rigaku, model Ultima IV, with high-frequency X-ray generator (3 kW), Cu X-ray tube ($\lambda = 1.5418\text{ \AA}$), normal focus (2 kW), Universal Theta-2Theta goniometer with 185 mm radius, fixed slots, and K β Ni Filter, with a voltage of 40 kV and a current of 20 mA. Ranges from 5° < 2 θ < 80°, with 0.05° step and time per step of 1 s, were used.

The images of scanning electron microscopy (SEM) were obtained in a JEOL JSM—6510LV microscope (Jeol techniques Ltd, Tokyo, Japan) operating at a voltage of 5 kV.

The thermogravimetric curves were obtained by a SHIMADZU analyzer, model DTG60, heating 10–15 mg of the sample at defined temperature intervals with a heating speed of 5° C min^{−1}, under a flow of 50 mL min^{−1} of argon.

Computational method

The optimized structure and the theoretical FTIR of CHC were obtained using DFT/B3LYP level of theory. The hybrid method Becke- 3-Parameter-Lee–Yang–Parr (B3LYP) [28]

with a 6-311G * basis set was used in the *Spartan 10 program* [29].

Biological assays

Cytotoxicity to mammalian cells

LLCMK2 (Kidney Epithelial Cells of Macaca mulatta, CCL-7, ATCC, USA) cell line was maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), and it was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 100 IU mL^{−1} penicillin, 100 µg mL^{−1} streptomycin, 1% tylosin and 5% CO₂ at 37 °C. The mammalian cells, 2.5×10^5 cells mL^{−1}, were cultured into 96-well plate for 24 h [30]. Non-adherent cells were removed by washing with sterile PBS. The medium containing different concentrations of CHC and the HpBCD:CHC complexes (3.12–400 µg mL^{−1}) was added to each well, and the plates were incubated for more 48 h. Cells cultured in growth medium alone were used as control. Cell viability was determined by the reduction in the tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide—MTT (Merck, Germany) method, following the manufacturer's recommendation. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) that corresponds to the concentration of compounds needed to inhibit the viable cells up to 50% was calculated by regression analysis. The selectivity index (SI) was calculated using the equation: SI = CC₅₀/IC₅₀, where IC₅₀ corresponds to the minimal concentration of the compounds that cause 50% of antitrypanosomal activity [30].

Trypanosoma cruzi maintenance

Trypanosoma cruzi Y strain was used in all assays. Epimastigotes were maintained by weekly transfers in liver infusion tryptose (LIT) medium [31] and supplemented with 10% of heat-inactivated FBS at 28 °C. The cells obtained from 4-day incubations were used in the assays.

Effect on the growth of epimastigotes

Epimastigotes (1.0×10^6 cells mL^{−1}) in the exponential growth phase were inoculated into a 24-well plate containing LIT-FBS medium with different concentrations of compounds (6.25–100 µg mL^{−1}). The cultures were incubated at 28 °C, and cell growth was estimated by direct counting in a hemocytometer (Improved Double Neubauer) after 72 h. Wells containing growth medium alone and medium plus 1% DMSO were used as controls. The samples used in the test were CHC and HpBCD:CHC complexes obtained by calcination, lyophilization, and grinding. Stock solutions of the respective samples were prepared in DMSO with an initial concentration of 1000 µg mL^{−1}. The results were expressed

as the minimal concentration of the compounds that cause 50% ($IC_{50,Ep}$) of growth inhibition compared to the untreated control.

Results and discussion

In-solution characterization¹H-NMR spectroscopy

From the chemical shift variations obtained in the ¹H-NMR spectroscopy study, it is possible to determine the most affected hydrogens between the two species in the formation of the host–guest complex and understand the topology of this inclusion.

In the present work, samples were prepared considering samples HpBCD:CHC ratios of 5:1 and 10:1 for monitoring CHC hydrogens chemical shifts. Changes of chemical shifts for these samples were considered relative to the pure CHC (Fig. 2).

The ¹H NMR spectra of “free” and complexed CHC (Fig. 2, Table 1) show that all CHC protons underwent a shielding effect in the presence of HpBCD. However, the most affected signals with the presence of cyclodextrin were the hydrogens of the bromophenyl moiety (H3"; H5"; H2"; H6") and the olefin hydrogens close to this aromatic ring (H2'; H3'). This result suggests that the inclusion of the molecule occurs through this part of the structure. This result is supported by the literature. Liu et al. [32] studied the formation of a complex between cyclodextrins and carvacrol, a potent antibacterial. Analysis of the ¹H-NMR spectra shows

Fig. 2 ¹H NMR spectra of: **a** CHC; **b** solution containing HpBCD:CHC in 5:1 ratio, and **c** solution containing HpBCD:CHC in 10:1 ratio. CHC H assignment

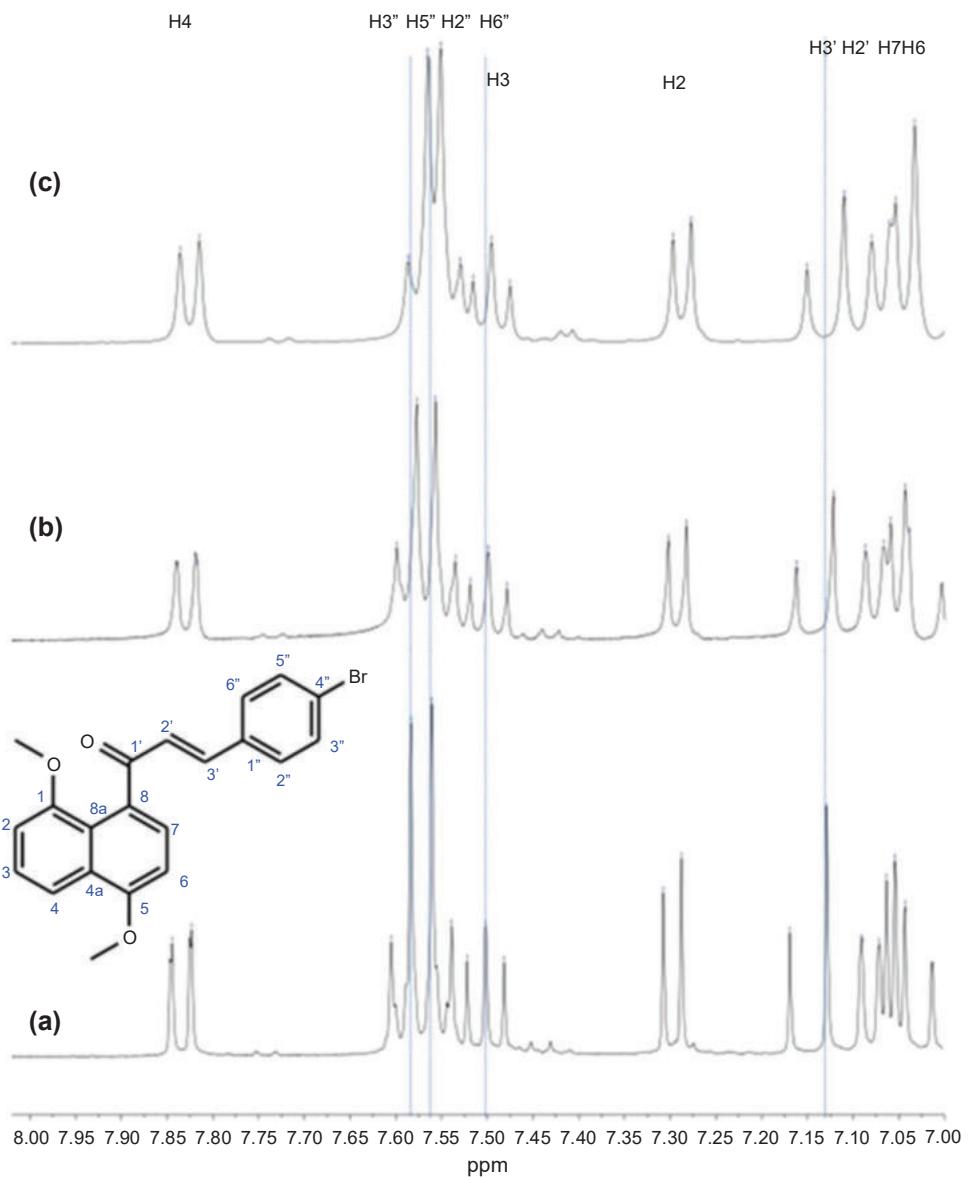


Table 1 ^1H NMR chemical shifts of CHC protons in free and in HpBCD:CHC solutions

H assignment	δ CHC _{free}	$\delta_{\text{HpBCD 5:1 CHC}}$	$\Delta \delta^a$	$\delta_{\text{HpBCD 10:1 CHC}}$	$\Delta \delta^a$
H4	7.844 7.823	7.838 7.817	-0.006 -0.006	7.836 7.815	-0.008 -0.008
H3";H5"	7.605 7.583	7.599 7.577	-0.006 -0.006	7.587 7.565	-0.018 -0.018
H2";H6"	7.561 7.539	7.557 7.535	-0.004 -0.004	7.551 7.529	-0.01 -0.01
H3	7.522 7.502 7.482	7.519 7.499 7.478	-0.003 -0.003 -0.004	7.516 7.496 7.475	-0.006 -0.006 -0.007
H2	7.308 7.288	7.302 7.282	-0.006 -0.006	7.297 7.277	-0.011 -0.011
H3';H2'	7.169 7.129 7.091	7.162 7.122 7.086	-0.007 -0.007 -0.005	7.151 7.110 7.080	-0.018 -0.019 -0.011
H7	7.072 7.064	7.067 7.059	-0.005 -0.005	7.060 7.054	-0.012 -0.01
H6	7.054 7.044	7.043 7.039	-0.011 -0.005	- 7.033	- -0.011
OCH3	4.018	4.011	-0.007	4.006	-0.012
OCH3	3.752	3.745	-0.007	3.739	-0.013

^a $\Delta \delta = \delta(\text{complex}) - \delta(\text{free})$

a shielding of the proton signals from the guest species with an emphasis on the hydrogen signals from the aromatic ring included in the cyclodextrin cavity.

Thus, the results of the ^1H -NMR spectroscopy suggested that the host–guest interaction occurred which is related to the shielding of aromatic CHC's bromophenyl hydrogens as well as internal protons in the CDs cavity [33–35].

UV-vis spectroscopy

For the determination of the host–guest stoichiometric ratio, the Job's plot was used, (Fig. 3) according to the procedure in the experimental section, monitoring the UV band at 295 nm assigned as the $\pi-\pi^*$ transition of the CHC molecule [36]. In Fig. 3, it is possible to observe that the maximum point of the curve was relative to the 0.5 molar fraction of CHC. This result is related to a 1:1 HG molar ratio.

For obtaining the association constant by UV-vis spectrophotometric titration, the $\pi-\pi^*$ transition band at 295 nm was also probed. The Benesi–Hildebrand model was applied considering two models related to 1:1 and 1:2 guest–host interactions. The equations and linear graphs are given in the supplementary material.

The linear adjustment considering 1:1 molar ratio provided the highest R^2 value ($R^2=0.9555$) corroborating Job's method. However, the calculated constant, presented a value of $2.3 (\pm 0.2) \cdot 10^5$. This value, in view of the disturbances verified in the ^1H NMR, seemed incoherent. However, it

should be kept in mind that these experiments were carried out in water/acetonitrile, a solvent in which CHC does not present good solubility. On the other hand, the ^1H NMR experiments were carried out in DMSO-d6, a solvent in which CHC is much more soluble, which weakens the host–guest interaction.

Difusion ordered spectroscopy (DOSY)

In this way, DOSY experiments were carried out as a way to calculate the diffusion coefficients (D) of the complex and of the “free” CHC and thus, obtain the equilibrium constant. This calculation was performed as reported by Malta et al. [37].

The observed diffusion coefficient for the complex (Dobs) is a weighted average of the free (D_{free}) and encapsulated (D_{bound}) CHC diffusion coefficients.

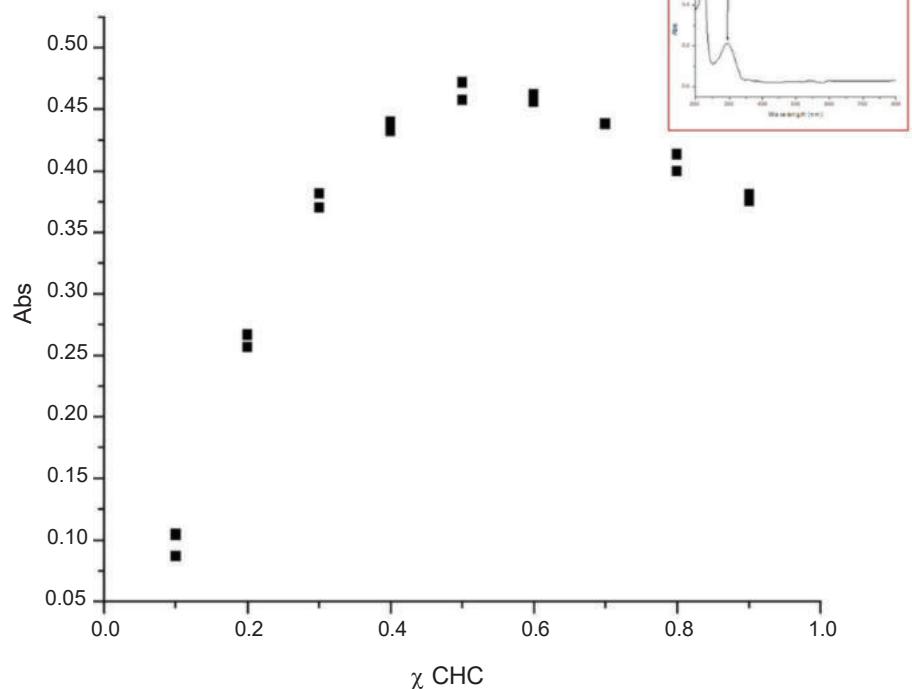
$$D_{\text{obs}} = X_{\text{free}} D_{\text{free}} + X_{\text{bound}} D_{\text{bound}} \quad (1)$$

where the mole fractions of free and encapsulated CHC are X_{free} and X_{bound} , respectively, and $X_{\text{free}} + X_{\text{bound}} = 1$. Considering a 1:1 stoichiometry:

$$K = \frac{\text{complex}}{\text{HpBCD} [\text{CHC}]} \quad (2)$$

where [complex], [HpBCD] and [CHC] are the concentrations of the formed complex, HpBCD and CHC at

Fig. 3 Job's plot for the interaction between HpBCD and CHC. In detail, the CHC UV-vis spectra



equilibrium, respectively. It can be deduced that the concentrations of HpBCD and CHC are equal at equilibrium, so:

$$K = \frac{\text{complex}}{[\text{CHC}]^2} \quad (3)$$

Since $[\text{complex}] = X_{\text{bound}} [\text{CHC}]_0$ and $[\text{CHC}] = X_{\text{free}} [\text{CHC}]_0$.

$$K = \frac{X_{\text{bound}} [\text{CHC}]_0}{X_{\text{free}} [\text{CHC}]_0^2} \quad (4)$$

where $[\text{CHC}]_0$ is the initial concentration of CHC ($2.43 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) can modify Eq. 4 and it can be deduced for:

$$K = \frac{10^5 X_{\text{bound}}}{243 X_{\text{free}}^2} \quad (5)$$

From Eq. 5, Eq. 1 and with the data of D in Table 2, it is possible to arrive at the value of the association constant for this complex of 61.

As can be seen, the constant value obtained from the DOSY experiments is 3 orders of magnitude smaller than the value obtained from UV-Vis spectroscopy. It should be noted that according to this last technique only one wavelength was evaluated, which only takes into account the disturbance that a part of the CHC molecule undergoes with complexation with cyclodextrin; unlike the DOSY

Table 2 Diffusion coefficients (D) and stability constant value (K) for the inclusion complex

	$D (\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{s}^{-1})$	K
CHC	2.26 (D_{free})	—
HpBCD in HpBCD:CHC	0.885 (D_{bound})	61
CHC in HpBCD:CHC	2.1 (D_{obs})	

experiments in which the measured property takes into account the non-covalent modifications undergone by the entire CHC molecule. In addition to this, the differences of solvent system and of physical principles of the techniques used in the determination of the association constant also help to explain the discrepancy between the values. Additional UV experiments using DMSO as the solvent and the Benesi–Hildebrand method indicated a binding constant of the same order of magnitude as that obtained in the DOSY experiments (Fig. S4).

Solid-state characterization of host–guest complex

Thermogravimetric analysis

The thermogravimetric analysis is an important tool for the understanding and characterization of the obtained complex. Initially, TG/DTG curves (Fig. 4) were obtained for three samples: CHC, HpBCD, and the physical mixture

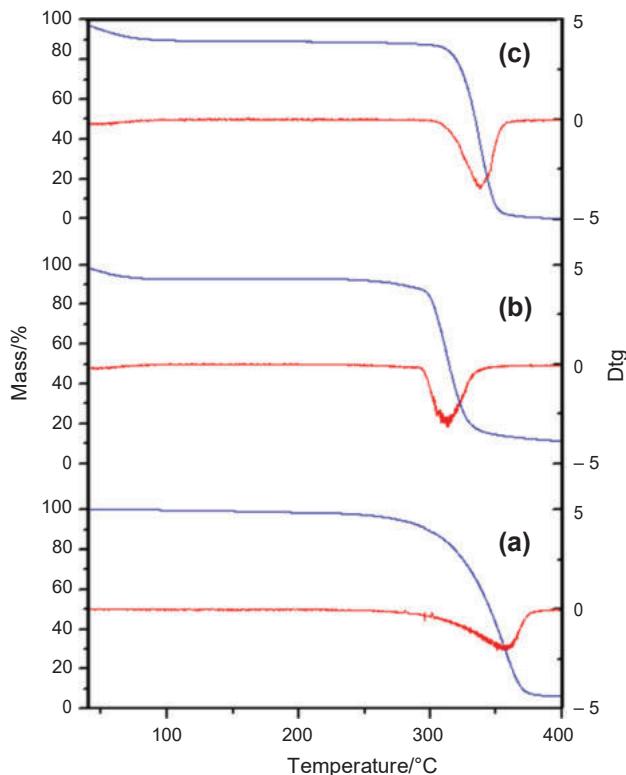


Fig. 4 TGA (blue) and DTG (red) curves for the samples: **a** CHC; **b** PM; and **c** HpBCD

(PM). It can be observed for temperatures under 100 °C, a mass loss for HpBCD and PM samples assigned as water loss [38]. These water molecules are those inside the HpBCD cavity, which is present in both samples. The CHC and HpBCD samples had each their highest mass loss in the temperature intervals of 280 °C–375 °C and 300 °C–360 °C, respectively. The PM sample had a different mass loss profile, losing significant content at lower temperatures than the other samples, between 280 °C–350 °C. These mass losses are mainly relative to the release of volatile organics from the CD scaffold [39]. An explanation for this result can be given by the *in situ* formation of inclusion complex between CHC and HpBCD, present in the PM: Upon heating, firstly there is the melting of CHC at 162 °C [40] followed by the contact between reagents before decomposition of both host and guest, enabling the formation of CHC-HpBCD host–guest complex, which would have a different TG/DTG profile from those for free HpBCD and CHC.

These results from TG/DTG analysis enabled the proposed preparation of the inclusion complex using the Calcination method.

Complementarily, thermogravimetric (TG) and thermodifferential analysis (DTA) of the samples with possible inclusion complexes were performed. (Fig. 5).

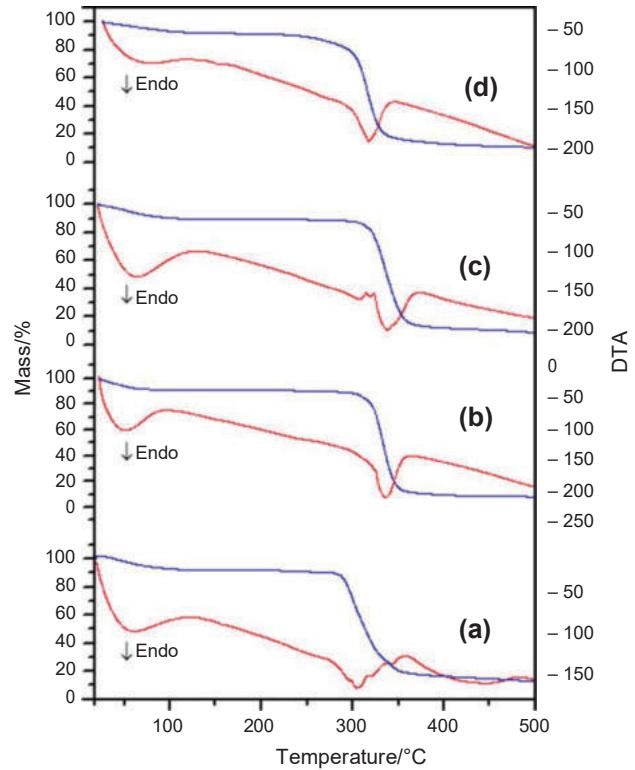


Fig. 5 TGA (blue) and DTA (red) curves for the samples: **a** PM; **b** Grinded product; **c** lyophilized product; and **d** calcinated product

The peak related to the decomposition of the lyophilized and grinded material is shifted to higher temperature values (337° and 336 °C, respectively, Table 3) in relation to the PM and calcinated product (305° and 317 °C, respectively, Table 3). Regarding the temperature range of the event, there is a greater amplitude for the PM ($\Delta T = 70$ °C, Table 3), since, in large part, it is the decomposition of CHC added to the decomposition of HpBCD. The calcinated product also shows a similar behavior regarding this thermal event ($\Delta T = 54$ °C, Table 3). In contrast, lyophilized and grinded materials

Table 3 Temperatures from mass loss process and decomposition peak

	$T_{\text{initial}}/^\circ\text{C}$	$T_{\text{final}}/^\circ\text{C}$	$\Delta T/^\circ\text{C}$	Decomposition peak/°C
Calcinated product	292	346	54	317
Lyophilized product	322	368	46	337
Grinded product	320	363	43	336
Physical Mixture (PM)	280	350	70	305
CHC	268	380	112	355
HpBCD	302	364	62	338

present a thermal decomposition event with a smaller temperature range ($\Delta T = 46^\circ$ and $\Delta T = 43^\circ\text{C}$, respectively). This result, added to the displacement of the peaks, as previously mentioned, allows classifying these last materials as more promising for the formation of the inclusion complex.

Scanning electron microscopy (SEM)

SEM visualizations (Fig. 6) were performed in order to obtain the microanalysis from the characteristic x-rays at different points of the sample. The EDS spectra were obtained with the aim of researching the element bromine since it is present in the CHC structure. From the comparison of different regions, the homogeneity of the sample could be verified

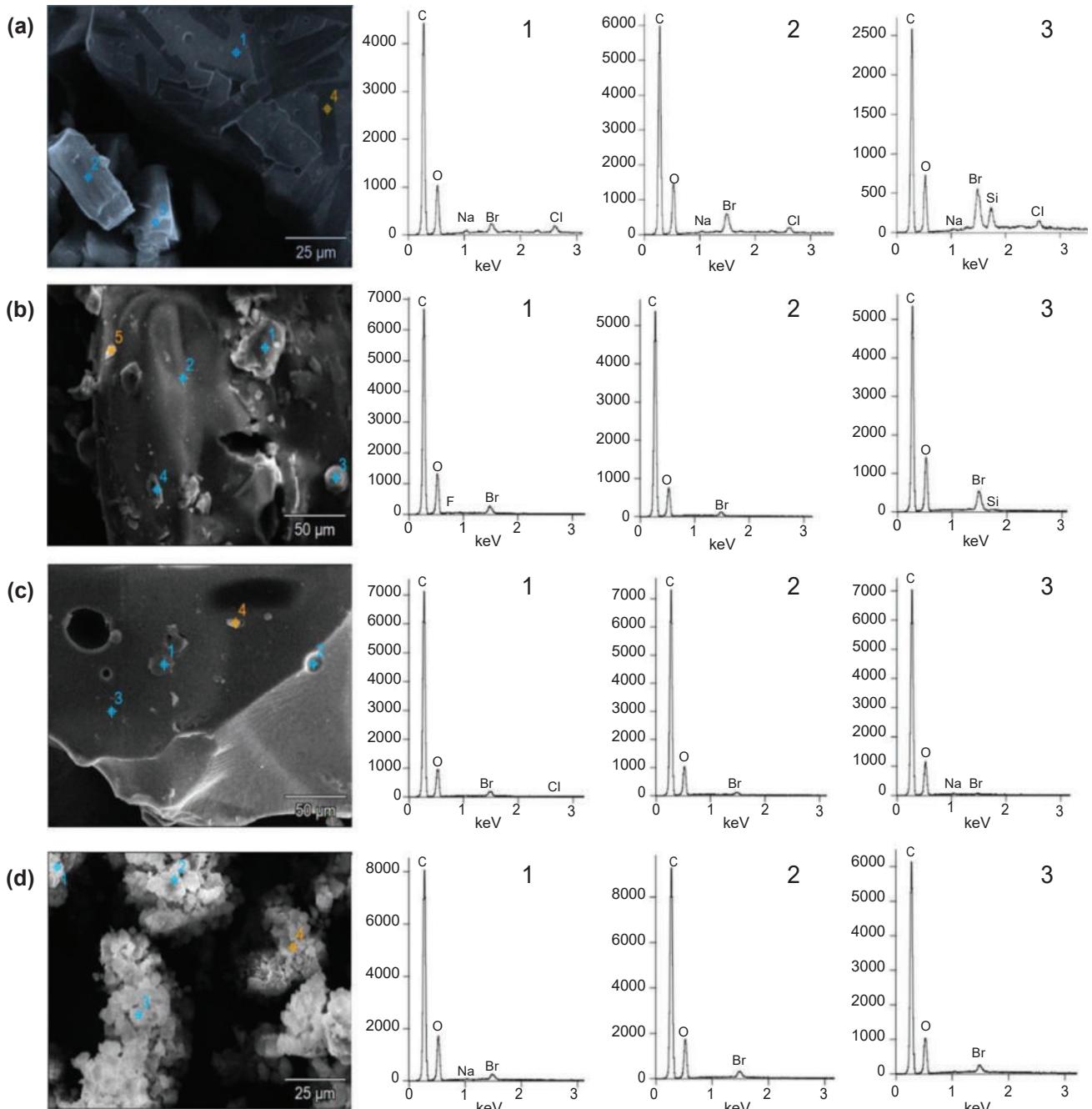


Fig. 6 SEM visualizations and EDS spectra in the points 1, 2 and 3 for **a** PM; **b** calcinated product; **c** lyophilized product; and **d** grinded product

and inferences about the formation of inclusion compounds were made.

It was verified for Fig. 6a, referring to the PM, that there is heterogeneity in terms of the distribution of bromine, conferred by the different peak intensities related to this element in the EDS spectrum at the three different points of the sample. The same is verified in Fig. 6b, for the calcinated sample, and Fig. 6c, for the lyophilized sample. However, for the grinded sample (Fig. 6d), it was observed a spectrum with intensities close to the bromine signal at the three points surveyed, allowing us to say that, for this sample, there is greater homogeneity. The presence of heterogeneity regarding the distribution of the element bromine observed for the previous samples is possibly related to the CHC phase segregation, which allows deducing that the inclusion was not as effective; differently, the grinded sample presented a homogeneity that allows us to say that the formation of inclusion compound was more effective for this sample.

Powder X-ray diffractometry (PXRD)

Powder X-ray diffractograms were acquired for HpBCD; the physical mixture PM; and the grinding method and the calcinated products. (Fig. 7) With an amorphous nature, the HpBCD diffraction pattern shows two broad arcs with the maximum at $2\Theta = 10.2^\circ$ and 18.5° [41]. The PM pattern contains defined and intense peaks in $2\Theta = 5\text{--}30^\circ$ corresponding to the CHC reflections. The calcinated product has an amorphous pattern similar to the HpBCD diffractogram, but with very low-intensity peaks at $2\Theta = 11.78^\circ$ and 24.44° (indicated in the XRD pattern Fig. 7d). These peaks are relative to the low crystallinity CHC. The grinded product from the grinding method has

a similar pattern to the PM diffractogram. However, the reflections at $2\Theta = 21.2^\circ$; 21.56° ; 23.96° ; 25.34° referring to CHC were much attenuated and peaks at $2\Theta = 10.94^\circ$; 25.7° ; 26.0° are no more visible. These results suggest that the host–guest complex between CHC and HpBCD was partially formed for the grinding method. For the calcination method, the step of CHC fusion may have induced an amorphization of this phase together with HpBCD which probably led to no peaks at all. Concerning the lyophilization process, this method did not afford enough material to be characterized by PXRD hence only enabling characterization of correspondent inclusion complex via Fourier-transform infrared spectroscopy.

FTIR analysis

Using the SPARTAN 10 program, a simulated FTIR CHC spectrum was obtained to find a correlation of the signals obtained with the experimental spectrum. Based on the lowest energy conformer, the Lee-Yang-Par (B3LYP) correlation method of Density functional theory (DFT) with 6-311G * basis set was used [42–44].

The simulated spectrum shows a good match with the signals of the spectrum obtained experimentally. Table 4 shows the comparison between the theory and the experimental signals.

This method is in agreement with the result previously described by Albuquerque et al. [40] for CHC. In their work, the theoretical IR was obtained by the Lee-Yang-Par (B3LYP) correlation method of Density functional theory (DFT), and the DGTZVP basis set was used. Solvent effects were considered using the Polarized Continuum Method (PCM).

FTIR spectra of PM, and inclusion complexes obtained from the lyophilization, grinding, and calcination method processes, underwent a mathematical subtraction operation from that of HpBCD spectra using the OMNIC software [45]. The results (Fig. 8) show evidence regarding whether the inclusion complex was formed or not.

CHC and PM spectra are very similar (Fig. 8a, b) since PM is just a physical mixture of the two components of the complex. Therefore, without intimate interaction between these components, upon subtraction by the HpBCD spectrum

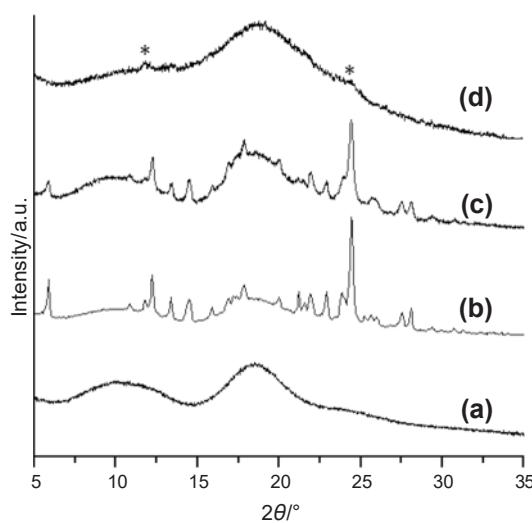


Fig. 7 Powder X-ray diffractograms from the samples: **a** HpBCD; **b** PM; **c** grinding product; **d** calcinated product

Table 4 CHC FTIR simulated and experimental

Vibrational modes	Simulated Wavenumber/cm ⁻¹	Experimental Wavenumber/cm ⁻¹
v C=O	1668	1672
v C=C	1600	1604
def C=C _{outplane}	1386	1389

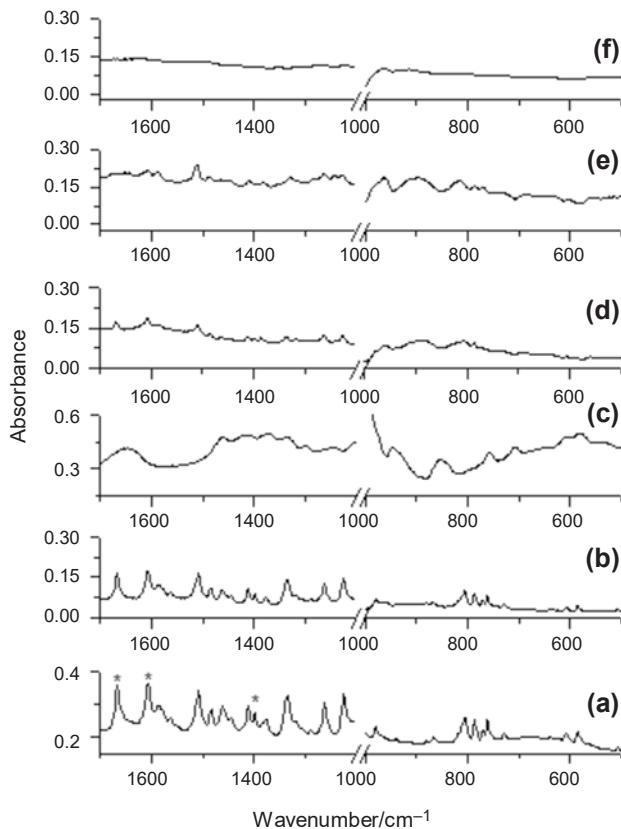


Fig. 8 Subtraction of FTIR spectra from the samples: CHC (a); PM (b); HpBCD (c); grinded product by grinding method (d); calcinated product (e); and lyophilized product (f). (*) CHC signals present in Table 4

(Fig. 8c), it was obtained for PM a collection of signals that is very close to that of the CHC alone. This result shows the subtraction operation was successful in re-creating CHC

spectrum from that of the physical mixture hence enabling its application to the possible inclusion of complex samples.

The lyophilized sample spectrum (Fig. 8f) shows heavily attenuated signals, related to the inclusion of the CHC in the HpBCD cavity since encapsulation brings restriction for the degrees of freedom of the guest [46, 47].

The calcinated product and the grinded product spectrum (Fig. 8d, e, respectively) show an attenuated collection of signals when compared with that of CHC, with remaining signals of CHC, though.

For both samples, the band at 1604 cm^{-1} associated with the C=C stretching vibration also exhibits a significant loss of intensity. The band at 1672 cm^{-1} assigned as the C=O stretching vibration is attenuated in the grinded product spectrum but not visible in the calcinated product spectrum. The loss of intensity of the signals relatives to the CHC molecule after spectra subtractions suggests that the inclusion complex was formed even partially.

Evaluation of anti-epimastigote activity and in vitro cytotoxicity of CHC and host–guest complexes

The CHC and CHC:HpBCD complexes obtained by Calcination method, lyophilization and grinding methods were evaluated on the growth of epimastigote forms of the *Trypanosoma cruzi* and the viability of LLCMK2 cells. Except for the lyophilized complex, all samples inhibited the growth of epimastigotes forms at non-toxic concentrations to LLCMK2 cells in vitro. The IC_{50} and CC_{50} values of the compounds ranged from 19.4 to $1386\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 206.4 to $706.9\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively (Table 5).

As shown from Table 3, all CHC:HpBCD complexes showed a lower cytotoxicity profile on mammalian cells than free CHC, whereas the anti-epimastigote activity of

Table 5 Antitrypanosomal activity on epimastigotes forms (IC_{50}) of *T. cruzi*, toxicity (CC_{50}) to LLCMK22 cells, and selectivity index (SI) of CHC and the host–guest complex HpBCD:CHC

Sample	$CC_{50}^a/\mu\text{g.mL}^{-1}$	$IC_{50}^b/\mu\text{g.mL}^{-1}$	SI ^c	Relative $IC_{50}^d/\mu\text{g.mL}^{-1}$	Relative SI ^e	% CHC mass ^f
CHC	206.4	19.4	10.63	–	–	100
Calcinated complex HpBCD 1: 1 CHC	304.1	37.08	8.2	8.19	37.11	22.1
Lyophilized complex HpBCD 5: 1 CHC	706.9	1386	0.51	74.84	9.44	5.4
Grinded complex HpBCD 1: 1 CHC	419.2	81.92	5.11	18.10	23.16	22.1

^aValues of cytotoxicity concentration of 50% of LLCMK22 cells (CC_{50})

^bValues of inhibitory concentration of 50% of parasites (IC_{50})

^cSI selectivity index (CC_{50}/IC_{50})

^dCalculated by $IC_{50} \times \% \text{ CHC mass}/100$

^eCalculated by CC_{50}/IC_{50} relative

^f% mass of CHC present in the complex HpBCD

the complexes was lower than free CHC. Regarding the SI values, the free CHC, the calcinated complex, and the grinded complex were relatively selective toward the epimastigote forms of *T. cruzi* than to the mammalian cells (SI>4) [48–50].

However, these results can be more appropriately analyzed if we consider the percentages of CHC mass (% CHC) in each sample since they have a different mass proportion of cyclodextrin. Considering that, we calculated the IC₅₀ value relative to % CHC in each sample (IC₅₀ x % CHC mass/100), as well as the relative SI (CC₅₀ / IC₅₀ relative), as shown in Table 5.

Thus, the analysis of the relative IC₅₀ values (Table 5) revealed that the calcinated complex was twice as active as the free CHC (8.19 and 19.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively) and the grinded sample exhibited a CHC-like activity (18.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Regarding the relative selectivity index (Table 5), for calcinated complex it was evidenced much superior performance than for free CHC (37.11 and 10.63, respectively), with a similar result also obtained for the grinded complex (23.16). The results pointed out calcinated complex was the sample that significantly best improved the activity of CHC. However, previous characterization by TG/DTA and SEM/EDS showed this sample as presenting heterogeneous composition. On the other hand, XRD characterization revealed a pattern without peaks which is related in this case to a dramatic lowering in crystallinity of CHC due to solid → molten → solid cycle during calcination. Therefore, “amorphisation” of CHC occurred with important consequences in increasing solubilization of the pharmaceutical, which explains the better result for the calcinated complex compared to the grinded one. Cyclodextrin is also important in the formulation, which is perceived by improved relative SIs for calcinated and grinded complexes in relation to that for CHC (Table 5); however, cyclodextrin in excess, as for lyophilized complex, seemed to be detrimental to the activity of CHC, leading to the worst result presented (74.84 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

These results corroborate the findings of previous studies that demonstrated that the host–guest complexes using cyclodextrins provided improvements in trypanosomal activity. Nicoletti and collaborators [51] described that β -lapachone has its trypanocidal potential improved when associated with HpBCD in a host–guest complex. Against the trypomastigote form of the parasite, the free β -lapachone showed IC₅₀ and SI values of 2.1 μM and 0.05, respectively. In contrast, its complex with cyclodextrin showed IC₅₀ and SI values 0.7 μM and 10.9, respectively. Similar results were reported by Barbosa and collaborators [52], who demonstrated that the IC₅₀ values were 0.6 μM and 2.21 μM for the complex and the free β -lapachone, respectively.

Furthermore, some authors also investigated and proved the antiparasitic activity of other host–guest complexes

against *T. cruzi*, such as the anti-Chagas drug delivery system reported by Alcântara and collaborators [53] using essential oils and cyclodextrin. By the way, Li and collaborators [54] used a drug delivery system containing nanocarriers based on polymers and benznidazole in the treatment against *T. cruzi*. They demonstrated the effectiveness of the complexation technique since the IC₅₀ in amastigotes was 3.51 μM and 33.07 μM for the complexed benznidazole and its free form, respectively. Besides, Rial and collaborators [55] demonstrated that the benznidazole associated with a nanocarrier based on copolymers derived from acrylic acid ester furnished beneficial effects, such as lower toxicity, greater water solubility, and better oral bioavailability. Finally, Braga and collaborators [56] reported the complexation approach of the local anesthetic clonidine with HpBCD, indicating that this strategy increased its clinical potential in addition to increasing solubility and bioavailability.

All these data suggest an optimal performance of the complexes obtained between CHC:HpBCD against the parasite and host cells compared to free CHC. In addition to these results, complexes with cyclodextrin have the advantage of increasing the solubility of guest molecules and improving their bioavailability [31, 57, 58].

Conclusions

The ¹H NMR spectroscopy points to the formation of the complex with the inclusion of the CHC bromophenyl moiety.

UV–Vis spectroscopy studies using Job's plot approach and DOSY experiments, respectively, showed that the molar ratio of the interaction between CHC:HpBCD is 1:1 and that the association constant is 61.

TG and DTA analysis suggested more efficiency for formation of the complex by grinding and lyophilization method. The solid product characterizations by PXRD and FTIR corroborate that the inclusion occurred, even partially, using the three synthetic routes. SEM visualizations showed homogeneity for the distribution of the Br element only for the grinded sample.

The anti-epimastigote biological assays showed a superior efficacy of CHC:HpBCD complexes compared to the isolated CHC. In this regard, the best sample was the calcinated complex. The use of a smaller amount of CHC was afforded from the complexation with cyclodextrin, through improving CHC solubility.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10973-023-12403-x>.

Acknowledgements The authors would like to thank FAPERJ, CNPq and CAPES agencies for funding; Profs. Rodrigo J. Correa and Josué Sebastian B. Forero from Instituto de Química/UFRJ for the use of the UV-vis spectrophotometer; laboratório de difração de raios x of

Instituto de Química/UFRJ for XRD patterns; and Profs Jaqueline D. Senra and Ana Furtado of Instituto de Química/UERJ for SEM visualizations and EDS analysis.

Author contributions IZ has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. LNO has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. FLAM has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. KMS-S has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. PMLP has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. MGA contributed to drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. RSBG contributed to drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. MLFB contributed to drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. SFY-O contributed to drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. AM has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. CHSL has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. LFBM has made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work or reviewing it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; agreement to

be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

References

1. Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Pablo Real J, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for chagas disease. *Acta Trop.* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>.
2. Mazzetti AL, Oliveira LT, Gonçalves KR, Schaun GC, Mosqueira VCF, Bahia MT. Benznidazole self-emulsifying delivery system: a novel alternative dosage form for chagas disease treatment. *Eur J Pharm Sci.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105234>.
3. Vital de Oliveira O, Viegas RG. Cucurbit[7]uril as a possible nanocarrier for the antichagasic benznidazole: a computational approach. *J Inclus Phenom Macrocyclic Chem* 2020. <https://doi.org/10.1007/s10847-020-01014-w>
4. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018;391:82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
5. Bocchi EA, Bestetti RB, Scanavacca MI, Neto EC, Issa VS. Chronic chagas heart disease management from etiology to cardiomyopathy treatment. *JACC.* <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.08.004>
6. Sales Junior PA, Molina I, Murta SMF, Sánchez-Montalva A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, Carneiro CM. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(5):1289–303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>.
7. Rassi A Jr, Marin-Neto J, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the benznidazole evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2017;112(3):224–35. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160334>.
8. Batista MF, Nájera CA, Meneghelli I, Bahia D. The parasitic intracellular lifestyle of trypanosomatids: parasitophorous vacuole development and survival. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:396. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00396>.
9. Hotze PJ, Pecoul B, Rijal S, Boehme C, Aksoy S, Malecela M, et al. Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(3): e0003895. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003895>
10. Coa JC, et al. Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of quinoline-chalcone and quinoline-chromone hybrids. *Med Chem Res.* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1846-5>.
11. Espinoza-Hicks JC, et al. Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: design, synthesis and evaluation. *Eur J Med Chem.* 2019;167:402–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.028>.
12. Bortoluzzi AAM, Staffen IV, Banhuk FW, et al. Determination of chemical structure and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of extracts from the roots of *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima *Trypanosoma cruzi*. *Saudi J Biol Sci* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.036>
13. Sychrová A, Koláříková I, Zemlicka M, Smejkal K. Natural compounds with dual antimicrobial and antiinflammatory effects. *Phytochem Rev.* 2020. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09694-5>.
14. Oliveira VS, et al. Therapeutic applications of solid dispersions for drugs and new molecules: in vitro and in vivo activities. *Pharmaceutics* 2020 12;933. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100933>

15. Barcellos JPA, Eloy JO, Riul TB, Campos PM, Baruffi MD, Marchetti JM. Poly-epsilon-caprolactone nanoparticles enhance ursolic acid in vivo efficacy against *Trypanosoma cruzi* infection. *Mater Sci Eng, C*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.266>.
16. Amaral BR, Saatkamp RH, Junior AE, et al. Development and characterization of thermopressed polyvinyl alcohol films for buccal delivery of benznidazole. *Mater Sci Eng C*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111546>.
17. Bezerra BP, et al. Cocrystal polymorphs and solvates of the anti-*Trypanosoma cruzi* drug benznidazole with improved dissolution performance. *Cryst Growth Des*. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00490>.
18. Arruá EC, Seremeta KP, et al. Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. *Acta Tropica* 2019;198:105080. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105080>
19. De Souza TM, et al. Inclusion compounds of dibenzylthiourea with hydroxypropylated cyclodextrins for corrosion protection of carbon steel in acidic medium. *J Mol Struct*. 2016;1125:331–9. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.06.072>.
20. Cunha-Filho M, et al. The utility of thermal analysis in the preformulation and development of an antifungal nail lacquer containing thymol. *J Therm Anal Calorim*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-09984-2>.
21. Han T, Yong J, Liu Q, Gu X, Zhang W, Yang J. Preparation and characterization of wet-milled cycloviroxine D nanosuspensions. *J Therm Anal Calorim*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08574-1>.
22. Souto EB, et al. Therapeutic interventions for countering leishmaniasis and chagas's disease: from traditional sources to nanotechnological systems. *Pathogens*. 2019;8:119. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030119>.
23. Streck L, et al. High performance liquid chromatography-diode array detector method for benznidazole quantitation in lipid based and self assembling cyclodextrins drug delivery systems. *J Anal Chem*. 2020;75(7):922–9. <https://doi.org/10.1134/S1061934820070163>.
24. Melo PN, Barbosa EG, Garnero C, Caland LB, Lima AAN, Matheus F, Fernandes-Pedrosa MF, Longhi MR, Silva-Júnior AA. Interaction pathways of specific co-solvents with hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes with benznidazole in liquid and solid phase, *J Mol Liq*. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.08.042>
25. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: a review. *J Pharm Biomed Anal* 2014;101:238–250. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022>
26. Collum DB, Renny JS, Tomasevich LL, Tallmadge EH. Method of continuous variations: applications of job plots to the study of molecular associations in organometallic chemistry. *Angew Chem Int Ed*. 2013;52:11998–2013. <https://doi.org/10.1002/anie.201304157>.
27. Tablet C, Matei I, Hillebrand M. The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations, Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine, Dr Alessio Innocenti (Ed.), ISBN: 978-953-51-0198-7, InTech, 2012; Available from: <http://www.intechopen.com/books/stoichiometry-and-research-the-importance-of-quantity-in-biomedicine/-the-determination-of-the-stoichiometry-of-cyclodextrin-inclusion-complexes-by-spectral-methods-poss>
28. Lee C, Yang W, Parr RG. *Phys Rev B*. 1988;37:785–9.
29. Spartan 10. Wave Function, Inc., Irvine, CA, USA.
30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
31. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1964;6:93–100.
32. Liu T, Feng C, Li Z, Gu Z, Ban X, Hong Y, Cheng L, Li C. Efficient formation of carvacrol inclusion complexes during β -cyclodextrin glycosyltransferase-catalyzed cyclodextrin synthesis. *Food Control* 2021;130:108296. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108296>
33. Bramhane DM, Kulkarni PA, Martis EA, Pissurlenkar RR, Coutinho EC, Nagarsenker MS. Characterization of pioglitazone cyclodextrin complexes: Molecular modeling to in vivo evaluation. *J Pharm Bioall Sci*. 2016;8:161–9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171680>.
34. Deng C, Cao C, Zhang Y, Hu J, Gong Y, Zheng M, Xhou Y. Formation and stabilization mechanism of β -cyclodextrin inclusion complex with C10 aroma molecules. *Food Hydrocoll* 2022;123:107013. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107013>
35. Sun C, et al. Ultrasound-mediated molecular self-assembly of thymol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for fruit preservation. *Food Chem* 2021;363:130327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130327>
36. Ekbote A, Patil PS, Maidur SR, Chia TS, Quah CK. Structure and nonlinear optical properties of (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(3-chlorophenyl) prop-2-en-1-one: a promising new D- π -A- π -D type chalcone derivative crystal for nonlinear optical devices. *J Mol Struct* 2017;1129:239–247. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.09.077>
37. Malta LFB, Cordeiro Y, Tinoco LW, Campos CC, Medeiros ME, Antunes OAC. Recognition mechanism of D- and L-tryptophan enantiomers using 2-hydroxypropyl-a- or b-cyclodextrins as chiral selectors. *Tetrahedron Asymmetry* 2008;19:1182–1188. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2008.04.035>
38. Zoppetti G, Puppin N, Ospitali F, Fini A. Solid state characterization of progesterone in a freeze dried 1:2 progesterone/HPBCD mixture. *J Pharm Sci* 2007. <https://doi.org/10.1002/jps.20671>
39. Udrescu L, Sbârcea L, Fulias A, Ledeti I, Vlase T, Barvinschi P, Kurunczi L. Physicochemical characterization of zofenopril inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Serb Chem Soc*. 2015;80(4):485–97.
40. Albuquerque MG, Gonçalves RSB, Lima CHdS, et al. Crystal structures, DFT calculations and Hirshfeld surface analysis of two (E)-3-(aryl)-1-(naphthalen-1-yl)prop-2-en-1-one chalcone derivatives, potential *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl ACP reductase (InhA) inhibitors and optical materials: conformational differences within the prop-2-en-1-one unit. *J Mol Struct* 2021;1246:131091. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131091>
41. Trandafirescu C, et al. Albendazole-cyclodextrins binary systems thermal and spectral investigation on drug-excipient interaction. *J Therm Anal Calorim*. 2019;138:3039–54. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08326-1>.
42. Sbârcea L, Ledeti A, Udrescu L, Vârut R, Barvinschi P, Vlase G, Ledeti I. Betulonic acid—cyclodextrins inclusion complexes. *J Therm Anal Calorim*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08359-6>.
43. Kahraman EN, Saçan MT. Predicting cytotoxicity and enzymatic activity of diverse chemicals using goldfish scale tissue and topminnow hepatoma cell line-based data. *Mol Inf*. 2019;38:1800127. <https://doi.org/10.1002/minf.201800127>.
44. Thirunavukarasu M, Balaji G, Muthu S, Raajaraman BR, Ramesh P. Computational spectroscopic investigations on structural validation with IR and Raman experimental evidence, projection of ultraviolet-visible excitations, natural bond orbital interpretations, and molecular docking studies under the biological investigation on N-Benzylloxycarbonyl-L-Aspartic acid 1-Benzyl ester. *Chem*

- Data Collect 2021;31:100622. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100622>
45. OMNIC software, Thermo Fisher Scientific.
46. Le-Deygen I, Skuredina A, Uporov IV, Kudryashova EV. Thermodynamics and molecular insight in guest–host complexes of fluoroquinolones with β -cyclodextrin derivatives, as revealed by ATR-FTIR spectroscopy and molecular modeling experiments. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409:6451–62. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0590-5>.
47. Fini A, Ospitali F, Zoppetti G, Puppini N. ATR/Raman and fractal characterization of HPBCD/progesterone complex solid particles. *Pharm Res* 2008. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9593-4>
48. Barros AV, Conceição AO, Simoni IC, Arns CW, Fernandes MJB. Mechanisms of antiviral action of seeds from Guettarda angelica Mart. against bovine and swine herpesviruses in vitro. *Virus Res* 2010;15:78–91.
49. Tsuchiya Y, Shimizu M, Hiyama Y, Itoh K, Hashimoto Y, Nakayama M, Horie T, Morita N. Antiviral activity of natural occurring flavonoids in vitro. *Chem Pharm Bull*. 1985;33(9):3381–6.
50. Amoros M, Simões CMO, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Natl Prod* 1992;55(12):1732–1740.
51. Nicoletti CD, Faria AFM, et al. Synthesis and biological evaluation of β -lapachone and nor- β -lapachone complexes with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as trypanocidal agents. *J Bioenergy Biomembr*. 2020;52:185–97. <https://doi.org/10.1007/s10863-020-09826-8>
52. Barbosa JMC, Nicoletti CD, da Silva PB, Melo TG, Futuro DO, Ferreira VF, et al. Characterization and trypanocidal activity of a β -lapachone-containing drug carrier. *PLoS ONE* 2021;16(3):e0246811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246811>
53. Alcântara IS, et al. Cytotoxic potential and antiparasitic activity of the Croton rhamnifoloides Pax leaves. & K. Hoffm essential oil and its inclusion complex (EOCr/ β -CD). *Polymer Bulletin*. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03556-6>
54. Li X, Scott EA, Engman DM, et al. Nanocarrier-enhanced intracellular delivery of benznidazole for treatment of *Trypanosoma cruzi* infection. *JCI Insight*. 2021;6(9):e145523. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.145523>
55. Rial MS, Seremeta KP, Esteva MI, Búa J, Salomon CJ, Fichera LE. In vitro studies and preclinical evaluation of benznidazole microparticles in the acute *Trypanosoma cruzi* murine model. *Parasitology*. 2011;148:566–75. <https://doi.org/10.1017/S0031182020002310>.
56. Braga MA, Martini MF, Pickholz M, Yokaichiya F, Franco MKD, Cabeça LF, Guilherme VA, Silva CMG, Limia CEG, de Paula E. Clonidine complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: From physico-chemical characterization to in vivo adjuvant effect in local anesthesia. *J Pharm Biomed Anal* 2016;119:27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.11.015>
57. Brillas E. A critical review on ibuprofen removal from synthetic waters, natural waters, and real wastewaters by advanced oxidation processes. *Chemosphere* 2022;286:131849. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131849>
58. Swain SK, Phaomei G, Tripathy SK, Yaiphaba N, Devi RB, Nayak S, Parida BB. Effect of β -cyclodextrin decoration on structural, optical and magnetic properties of luminescent magnetic nanoparticles and its application as a drug carrier. *J Mol Struct* 2022;1247:131330. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131330>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.