



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LOUISE DONADELLO TESSAROLO

**ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE
BENZONIDAZOL EM CARBONATO DE CÁLCIO SOBRE CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi***

FORTALEZA

2016

LOUISE DONADELLO TESSAROLO

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE BENZONIDAZOL EM CARBONATO DE CÁLCIO SOBRE CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências para saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alice Maria Costa Martins.

Coorientador: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- T323e Tessarolo, Louise Donadello.
Estudo *in vitro* da atividade tripanocida de nanopartículas de benzonidazol em carbonato de cálcio sobre cepa Y de *Trypanosoma cruzi*/ Louise Donadello Tessarolo. – Fortaleza, 2016.
82 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2016.
Área de concentração: Ciências para saúde.
Orientação: Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
Coorientação: Prof. Dr. Valder Nogueira Freire.
1. Nanotecnologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Doença de Chagas. 4. Técnicas In Vitro. I. Martins, Alice Maria Costa (Orient.). II. Freire, Valder Nogueira (Coorient.). III. Título.

CDD 615.1

LOUISE DONADELLO TESSAROLO

ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE NANOPARTÍCULAS DE BENZONIDAZOL EM CARBONATO DE CÁLCIO SOBRE CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências para saúde.

Aprovada em: ___ / ___ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins (orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Maria de Fátima Oliveira
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Eveline Matias Bezerra
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dra. Ticiano Praciano Pereira
Universidade Metropolitana de Fortaleza

À minha família, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver na certeza da sua presença constante.

Ao meu pai Leomárcio, pela serenidade e força que transmite com tanta sabedoria, pelo amor e completa dedicação à nossa família não medindo esforços para nos conduzir aos nossos sonhos.

À minha mãe Tânia, pela completa doação e pelo imenso amor com que muitas vezes sacrifica seus desejos para nos proporcionar o conforto e a segurança da sua presença.

Ao meu irmão Mateus, pela ajuda com o inglês e por ser meu confidente em momentos de angústia, sempre me encorajando a buscar a minha felicidade custe o que custar.

À minha irmã Giulia, por me ouvir com a maturidade de um adulto e me ensinar a conduzir as situações difíceis com leveza de uma criança.

Às minhas avós Ruth e Vivina pelas orações.

Ao meu namorado Danilo, por acreditar na minha capacidade e me encorajar a seguir adiante, sempre me transmitindo imensa paz e fazendo eu me sentir amada.

À minha orientadora Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins pela confiança, paciência e dedicação.

Ao amigo e também companheiro de laboratório Ramon Róseo Paula Pessoa Bezzerra de Menezes, pela prontidão em ajudar sempre e por ser meu apoio científico e psicológico durante a realização desse trabalho.

Aos amigos e também companheiros de laboratório, Jáder Canuto, Dânya Bandeira, Gdayllon Cavalcante, Tiago Sampaio, Clarissa Perdigão, Izabel Justino, Paloma Leão, Gabriela Bezerra, Lívia Fernandes, Kamilla Alcântara, Isabella Evelyn e Racquel Oliveira, pela ajuda direta e indireta na realização desse trabalho e pelo incentivo e apoio nos momentos de desânimo.

Aos meus amigos João Vitor, Jaime, Andressa e Luana pelo apoio e presença forte em minha vida.

Ao Prof. Dr. Valder Freire, Prof. Dr. Ricardo Santos, Prof. Dr. Adilson Sales e Dra. Eveline Bezerra, pela colaboração.

**"Em verdade, em verdade, vos digo: se o grão de trigo,
caindo na terra, não morrer, fica ele só;
mas se morrer, produz muito fruto."**

João 12:24

RESUMO

A doença de Chagas é um problema de saúde pública, afeta cerca de 6 milhões de pessoas em todo o mundo e causa altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas. O benzonidazol (BZ), fármaco utilizado no tratamento apresenta eficácia limitada e provoca sérios efeitos adversos. O transporte de fármacos por meio de nanopartículas tem demonstrado eficiência quanto à liberação controlada e direcionada de moléculas farmacológicas, além de apresentar propriedades desejáveis, como boa biocompatibilidade e biodegradabilidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade de nanopartículas de benzonidazol em carbonato de cálcio (BZ@CaCO₃) sobre células de hospedeiras LLC-MK2; determinar o efeito tripanocida sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e comparar ao efeito do BZ, bem como, sugerir o mecanismo de morte. Os testes de citotoxicidade utilizando o método do MTT realizados com células LLC-MK2 cultivadas com meio DMEM a 10% de SBF demonstraram CI₅₀ de 55 µg/mL para BZ@CaCO₃ e 160 µg/mL para BZ. Formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT a 10% de SBF a 28°C na presença de BZ@CaCO₃ por 24, 48 e 72 horas. BZ@CaCO₃ mostrou atividade tripanocida sobre formas epimastigotas nos três tempos de tratamento (CI₅₀ 24h = 8,72 µg/mL; CI₅₀ 48h = 8 µg/mL; CI₅₀ 72 h = 4,8 µg/ml) sendo esse efeito mais significativo que o do BZ (CI₅₀ 24h = 56,7 µg/mL CI₅₀ 48h = 15,9 µg/mL; CI₅₀ 72h = 4,3 µg/ml). Formas tripomastigotas foram obtidas a partir dos sobrenadantes de células LLC-MK2 infectadas, ressuspensas em meio DMEM com 2% de SBF e tratadas durante 24 h. As formas tripomastigotas foram mais susceptíveis a BZ@CaCO₃ (CI₅₀ = 1,8 µg/mL) do que ao BZ (CI₅₀= 67 µg/mL). Esses ensaios também foram realizados com nanopartículas de carbonato de cálcio livres de fármacos (nCaCO₃) utilizadas como controle negativo. Nos ensaios com as formas amastigotas obtidas por infecção de células LLC-MK2, o BZ@CaCO₃ foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas, o número de amastigotas por células infectadas e o índice de sobrevivência em 24h de incubação. Ensaio de citometria de fluxo utilizando os marcadores de fluorescência 7-amino actinomicina D, anexina V- PE e rodamina 123 mostraram que o efeito tripanocida tanto da BZ@CaCO₃ quanto do BZ está relacionado a morte por necrose com alteração do potencial mitocondrial. Assim, conclui-se que a BZ@CaCO₃ apresenta efeito tripanocida *in vitro* sobre as três formas de *Trypanossoma cruzi*, sendo esse efeito potencialmente maior do que o observado para BZ.

Palavras-Chave: Nanotecnologia. *Trypanossoma cruzi*. Doença de Chagas. Técnicas In Vitro.

ABSTRACT

Chagas disease is a public health concern, affects about 6 million people worldwide and causes high morbidity and mortality in affected populations. One of the few drugs available for treatment of this disease is Benznidazole (BZ) was developed over forty years ago, has limited effectiveness and cause severe adverse effects. The transport of drugs by nanoparticles has attracted the interest of the scientific community as it demonstrates efficiency and the controlled and targeted release of pharmacological molecules, in addition to its desirable properties such as good biocompatibility and biodegradability. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of benznidazole nanoparticles (BZ@CaCO₃) produced with calcium carbonate on LLC-MK2 host cells; to define the trypanocidal effect on epimastigotes, trypomastigote and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* Y strain and compare the effect of BZ, as well as characterize the nanoparticle-induced death mechanism. The cytotoxicity tests using the MTT method performed with LLC-MK2 cells grown in DMEM with 10% FBS showed IC₅₀ of 55 µg/mL for BZ@CaCO₃ and 160 µg/mL for BZ. Epimastigotes were grown in LIT medium with 10% FBS at 28 °C in the presence of BZ@CaCO₃ for 24, 48 and 72 hours. BZ@CaCO₃ showed trypanocidal activity against epimastigote forms at all three treatment times (24h IC₅₀ = 8.72 µg/mL, 48h IC₅₀ = 8 µg/mL, 72 h IC₅₀ = µg/mL), with this effect being more significant than the BZ alone (24h IC₅₀ = 56.7 µg/mL; 48h IC₅₀ = 15.9 µg/mL; 72h IC₅₀ = 4.3 µg/mL). Trypomastigote forms were obtained from supernatants of infected LLC-MK2 cells, resuspended in DMEM medium with 2% FBS and treated for 24 h. The trypomastigotes were more sensitive to BZ@CaCO₃ (IC₅₀ = 1.8 µg/mL) when compared to BZ (IC₅₀ = 67 µg/mL). These assays were also performed with calcium carbonate drug free nanoparticles (nCaCO₃) used as negative control. In tests with the amastigote forms obtained by infecting LLC-MK2 cells, BZ@CaCO₃ was able to reduce the percentage of infected cells, the number of amastigotes per infected cells and the survival index after 24 hours of incubation. Flow cytometric assays using 7-amino actinomycin D, annexin V-PI and rhodamine 123 fluorescent markers showed that BZ@CaCO₃ and BZ induce death by necrosis and promote changes on the mitochondrial potential of epimastigotes. In conclusion, BZ@CaCO₃ has trypanocidal effect on all three forms of *Trypanosoma cruzi* that is potentially greater than that observed for BZ alone.

Keywords: Nanotechnology. *Trypanosoma cruzi*. Chagas Disease. In Vitro Techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição de doença de Chagas no mundo.....	16
Figura 2- Transmissão vetorial e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 3- Sinal de Romaña	20
Figura 4- Alterações anatômicas presentes na fase crônica cardíaca da doença de Chagas	20
Figura 5- Evolução da hipertrofia esofágica causada por <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 6- Estrutura molecular do benzonidazol	22
Figura 7- Representação esquemática do ensaio para determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO ₃ sobre células hospedeiras LLC-MK2	33
Figura 8- Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO ₃ sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	35
Figura 9- Representação esquemática da contagem celular em hemocitômetro	35
Figura 10- Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO ₃ sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 11- Representação esquemática do ensaio para avaliação do efeito da BZ@CaCO ₃ sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 12- Representação esquemática dos principais componentes de um citômetro de fluxo.....	40
Figura 13- Representação esquemática do ensaio para investigação do mecanismo de morte celular induzido pela BZ@CaCO ₃ sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento	42
Figura 14- Representação esquemática do ensaio para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento com BZ@CaCO ₃	44
Figura 15- Efeito da BZ@CaCO ₃ sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento	51
Figura 16- Efeito do BZ sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....	52
Figura 17- Análise agrupada dos efeitos da BZ@CaCO ₃ e BZ na diminuição da viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento	53
Figura 18- Efeito da nCaCO ₃ sobre a viabilidade de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....	54
Figura 19- Efeito da BZ@CaCO ₃ sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento	61

Figura 20- Efeito do BZ sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento.....	63
Figura 21- Análise agrupada do efeito da BZ@CaCO ₃ e do BZ sobre formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento	64
Figura 22-Gráficos Density-plot de distribuição das populações celulares submetidas ao ensaio de investigação de mecanismo de morte celular por citometria de fluxo	65
Figura 23- - Efeito da BZ@CaCO ₃ e BZ sobre a intensidade de fluorescência da Rodamina 123 nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.....	67
Figura 24- Histogramas do efeito da BZ@CaCO ₃ e BZ sobre a intensidade de fluorescência da Rodamina 123 nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Concentração de benzonidazol (BZ) nos grupos de nanopartículas de benzonidazol (BZ@CaCO ₃) utilizados nos experimentos in vitro	47
Tabela 2-Concentração inibitória de 50% da cultura de epimastigota	55
Tabela 3-Valores de viabilidade celular de formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi tratadas com BZ@CaCO ₃ , BZ e nCaCO ₃ por 24, 48 e 72 horas.....	55
Tabela 3-Valores de viabilidade celular de formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi tratadas com BZ@CaCO ₃ , BZ e nCaCO ₃ por 24, 48 e 72 horas.....	56
Tabela 4- Concentração inibitória de 50% da cultura (CI ₅₀) de tripomastigotas, LLC-MK2 e índice de seletividade.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-Amino Actinomicina D
Anexina-V- PE	Anexina V- ficoeritrina
BZ	Benzonidazol
BZ@CaCO ₃	Nanopartícula de Benzonidazol em carbonato de cálcio
CT	Controle
CI ₅₀ ou IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
DM	Duplo marcado
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
EPM	Erro padrão médio
FC	Fator de correção da câmara
FD	Fator de correção da diluição
ISe	Índice de Seletividade
ISo	Índice de sobrevivência
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LCTM	Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais
LIT	<i>Meio Liver infusion tryptose</i>
LLC-MK2	Células <i>Rhesus monkey kidney</i>
LNDT	Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5difeniltetrazólio
nCaCO ₃	Nanopartícula de carbonato de cálcio livre de fármaco
NM	Não marcado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão fosfato
Rho	Rodamina 123
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Doença de Chagas.....	16
1.1.1 <i>Tratamento farmacológico da doença de Chagas</i>	21
1.2 Nanociência e a Nanotecnologia na entrega de fármacos	23
2 JUSTIFICATIVA.....	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Local.....	29
4.2 Linhagens celulares.....	29
4.3 Obtenção das substâncias em estudo e preparo das soluções de trabalho	29
4.4 Determinação do teor de BZ na BZ@CaCO ₃	30
4.5 Ensaio de citotoxicidade em células hospedeiras LLC-MK2.....	30
4.5.1 <i>Cultivo e manutenção de células LLC-MK2</i>	30
4.5.2 <i>Determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre células hospedeiras LLC-MK2</i>	31
4.6 Ensaios com formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	33
4.6.1 <i>Cultivo e manutenção das formas epimastigotas</i>	33
4.6.2 <i>Determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre as formas epimastigotas</i>	34
4.7 Ensaios com formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y	36
4.7.1 <i>Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas</i>	36
4.7.2 <i>Determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de T. cruzi</i>	37
4.8 Avaliação do efeito da BZ@CaCO ₃ sobre a forma amastigota de <i>T. cruzi</i>	38
4.9 Ensaios para avaliação de mecanismo de morte	40
4.9.1 <i>Ensaio para investigação do mecanismo de morte celular.</i>	41
4.9.2 <i>Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	42
4.10 Análise estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Determinação do teor de BZ na BZ@CaCO ₃	45
5.2 Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO ₃ sobre a viabilidade de células LLC-MK2.....	48

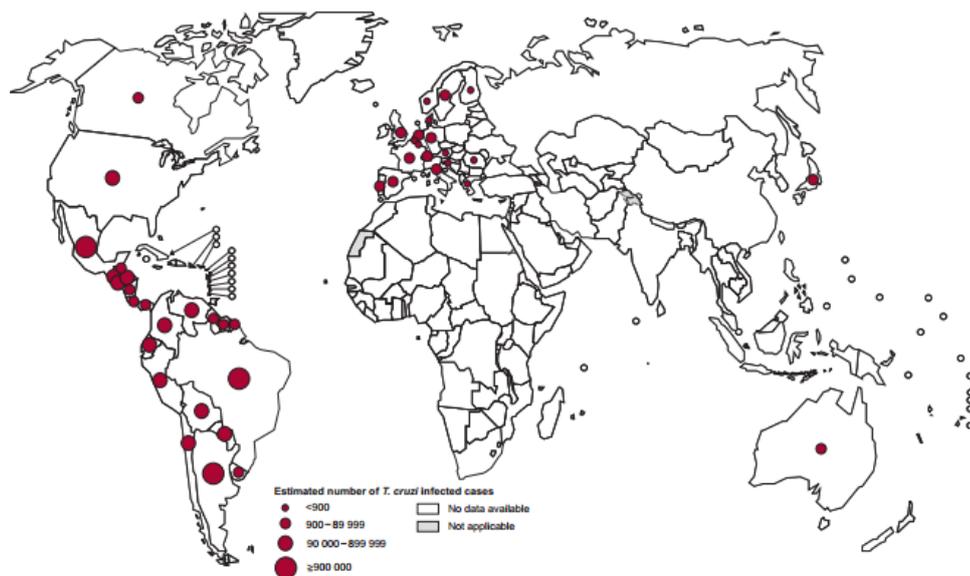
5.3	Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.	50
5.4	Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.	57
5.5	Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>.	60
5.6	Determinação do mecanismo de morte celular	65
5.7	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	66
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das treze principais doenças tropicais negligenciadas, tem sido um flagelo para o homem desde a antiguidade e continua a ser um problema econômico e social relevante em muitos países da América Latina, onde a doença é endêmica (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Segundo estimativas da OMS, existem no mundo 6 milhões de pessoas infectadas e 25 milhões em risco (OMS, 2015). No Brasil, três milhões de pessoas estão infectadas e outras cinco milhões em risco (PETHERICK, 2011). Embora, inicialmente, a doença de Chagas estivesse, aparentemente, restrita a América Latina, a mobilidade da população levou ao aparecimento da doença em regiões não endêmicas (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012). Nas últimas décadas, tem sido cada vez mais encontrada nos Estados Unidos da América, Canadá e alguns países europeus (BEARD et al., 2003; DIAZ; HISTORY; BURDEN, 2008; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; OMS, 2015). A figura 1 mostra a distribuição da doença de Chagas no mundo.

Figura 1- Distribuição de doença de Chagas no mundo.



Fonte: OMS (2013).

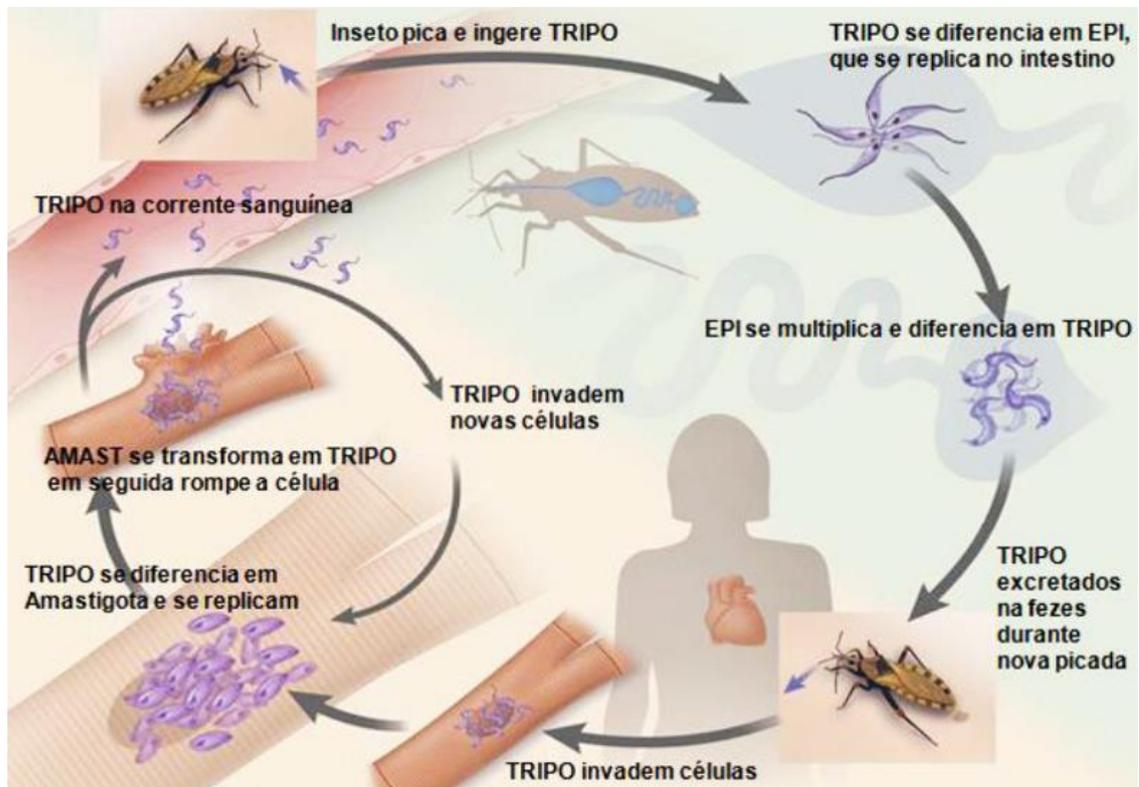
A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma antroponose causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*. Este protozoário hemoflagelado é classificado dentro da Ordem *Kinetoplastida* e se desenvolve em insetos hematófagos da família *Reduviidae*, em pequenos mamíferos de vida silvestre e em humanos (CHAGAS, 1909; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* possui ciclo de vida complexo que requer passagem obrigatória por um hospedeiro invertebrado, o inseto vetor triatomíneo, e um hospedeiro vertebrado (BONNEY; ENGMAN, 2010). Durante seu ciclo de desenvolvimento, o parasito apresenta três formas evolutivas morfológica e funcionalmente distintas: epimastigota, forma replicativa não infectante, presente no intestino superior do inseto; tripomastigota, forma não replicativa infectante, presente na porção posterior do intestino do inseto; e amastigota, forma replicativa intracelular (ABE et al., 2002a; ROMERO; MORILLA, 2010).

O ciclo do parasito se inicia quando o inseto vetor triatomíneo se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado contendo formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, as formas tripomastigotas vão para o estômago do inseto, onde a maioria é lisada por enzimas digestivas (CASTRO et al., 2007). As formas tripomastigotas remanescentes se transformam em formas epimastigotas, que por sua vez migram para o intestino médio do inseto e dividem-se intensivamente mantendo a infecção no vetor (ALVES et al., 2007). Parte desses epimastigotas migra para o intestino posterior onde se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, forma infectante para várias espécies de mamíferos. A infecção ocorre quando o triatomíneo ao realizar o repasto sanguíneo deposita junto a região da picada excrementos (fezes e urina) contaminados com formas tripomastigotas metacíclicas. Uma substância irritante que ocasiona prurido também é liberada pelo inseto, a coceira local faz com que os tripomastigotas metacíclicos sejam arrastados para o orifício da picada pelo próprio hospedeiro vertebrado (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de sobreviver e reproduzir-se em uma variedade de células nucleadas (SILVA et al., 2007), onde se convertem em formas amastigotas; ocorre proliferação intracelular por sucessivas divisões binárias e diferenciação em formas tripomastigotas que rompem a célula e caem na circulação sanguínea (LIMA et al., 2010). Após a ruptura celular, as formas tripomastigotas liberadas na corrente sanguínea podem infectar células vizinhas, disseminar para outros órgãos ou serem ingeridas por outro inseto vetor reiniciando o ciclo (MUÑOZ-SARAIVA et al., 2012). A figura 2 ilustra a transmissão vetorial e o ciclo do *T. cruzi* nos dois hospedeiros.

Figura 2- Transmissão vetorial e ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: RASSI; MARIN-NETO (2010) Modificado.

A principal forma de transmissão da doença de Chagas ainda é a vetorial, através do contato com os excrementos do triatomíneo infectado (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA, 2007). No Brasil, 52 espécies de triatomíneos foram descritas, destas 27 foram encontradas no nordeste, com maior atenção para espécies de três gêneros distintos, *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, sendo estes vetores importantes para a transmissão entre animais domésticos e o homem nas áreas endêmicas (RASSI; MARIN-NETO, 2010). A transfusão sanguínea é o segundo mecanismo mais comum de transmissão da doença (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). A transmissão congênita pode ocorrer em qualquer fase da doença materna e também pode se dar em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre, ou ocorrer durante o parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (BRASIL, 2012). A infecção pela via oral é responsável por surtos de transmissão em áreas urbanas e regiões onde não há circulação de insetos vetores domiciliados (PEREIRA et al., 2009). Esta via de transmissão é geralmente associada com uma alta concentração parasitária, resultando em uma manifestação clínica aguda mais severa com altos índices de mortalidade A

transmissão por meio de transplante de órgãos tem adquirido relevância nas últimas décadas, devido ao aumento do número desses procedimentos. Essa forma de transmissão apresenta manifestações clínicas graves uma vez que os receptores estão imunocomprometidos (BRASIL, 2012).

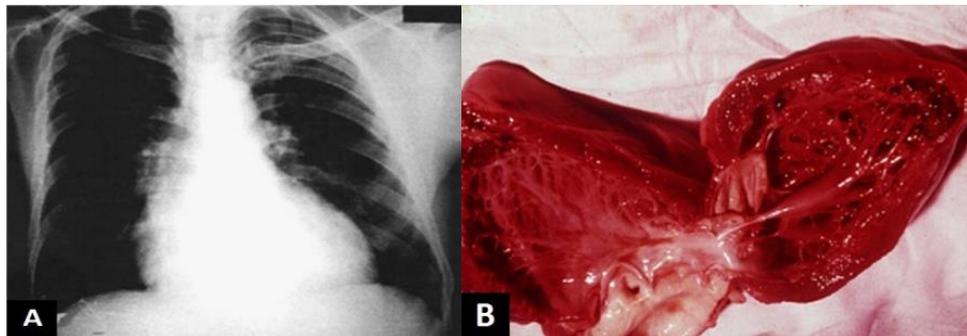
A doença de Chagas pode se apresentar em duas fases clínicas definidas: fase aguda e crônica (CHAGAS, 1909). A fase aguda apresenta parasitemia evidente sob observação direta do sangue. Quando a infecção é vetorial podem ser observados os sinais aparentes de porta de entrada que podem ser ocular, conhecido como sinal de Romana (figura 3), ou cutâneo, chamado de chagoma de inoculação (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000). Em muitos casos não há sintomas, mas os casos sintomáticos são caracterizados por manifestações como febre, edema, hipertrofia dos linfonodos e em situações graves hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). A fase aguda na maioria dos casos evolui para forma crônica indeterminada, período em que se torna difícil a demonstração do parasito no sangue circulante, mas é possível sua detecção nos tecidos. A forma indeterminada foi descrita por Carlos Chagas em 1985 como assintomática e com resultados normais para eletrocardiograma e raio-x de coração, esôfago e cólon. Apesar de o prognóstico parecer bom, cerca de 20 a 30% dos pacientes na fase indeterminada podem evoluir para as formas crônicas determinadas (COURA, 2007; RASSI; MARIN-NETO, 2010) A fase crônica pode envolver formas cardíacas, digestivas ou mistas. A forma crônica cardíaca apresenta-se com hipertrofia das fibras miocárdicas e dilatação das cavidades com presença de trombos e fibrose (figura 4). A fase crônica digestiva provoca redução nos neurônios dos plexos mioentéricos do esôfago e dos cólons, conduzindo assim à dilatação desses órgãos caracterizada por megaesôfago e megacólon (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; COURA, 2007) (figura 5). Não é uma doença fatal nos estágios iniciais; no entanto, nos estágios avançados, até 30% dos pacientes são conduzidos à morte por disritmias, falha cardíaca congestiva, megaesôfago, megacólon (ABE et al., 2002b).

Figura 3- Sinal de *Romaña*

Fonte: ZANETTI (2012).

Legenda: Sinal ocular de porta de entrada de infecção por *T.cruzi*, o sinal de Romaña consiste em edema bpalpebral unilateral elástico, com coloração róseo-violácea de início geralmente.

Figura 4- Alterações anatômicas presentes na fase crônica cardíaca da doença de Chagas



Fonte: COURA; BORGES-PEREIRA (2012).

Legenda: (A) Radiografia de paciente chagásico, apresentando cardiomegalia; (B) hipertrofia do tecido miocárdico característico da fase crônica cardíaca da Doença de Chagas.

Figura 5- Evolução da hipertrofia esofágica causada por *Trypanosoma cruzi*



Fonte: COURA; BORGES-PEREIRA (2012).

1.1.1 Tratamento farmacológico da doença de Chagas

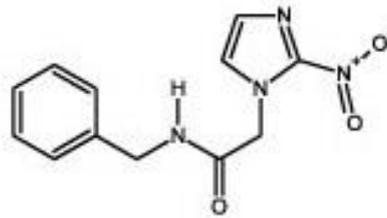
Um século após a descrição da doença de Chagas, vários aspectos relacionados ao tratamento ainda são considerados complexos. O tratamento é eficaz logo após a infecção no início da fase aguda (CANÇADO, 1999), porém, uma vez que a doença tenha progredido até as formas indeterminada ou crônica, nenhum medicamento apresenta efetividade satisfatória. A taxa média de cura entre casos agudos e recentes é de 80%, ao passo que é inferior a 20% entre os crônicos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; SESTI-COSTA et al., 2014).

O tratamento é indicado para pacientes adultos infectados, especialmente aqueles sem sintomas; pacientes nos quais a infecção foi reativada (por exemplo, devido à imunossupressão) e paciente em fase crônica precoce. Entretanto, é contra indicado a pacientes com insuficiência renal ou hepática, e durante gravidez (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; MARIN-NETO et al., 2009; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

As opções terapêuticas disponíveis atualmente foram desenvolvidas há mais de quarenta anos, sendo eles o nifurtimox, produzido em 1967 e o benzonidazol, introduzido na terapêutica em 1972. O nifurtimox, primeiro a ser indicado para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas, foi lançado pelo Laboratório Bayer com o nome comercial de Lampit®. Considerado tóxico, teve sua comercialização cancelada em diversos países, inclusive no Brasil

(CANÇADO, 2002). O benzonidazol, composto nitroheterocíclico (N-benzil-2nitro-1-imidazolacetamida) (figura 6) produzido, inicialmente, pelo Laboratório Roche com o nome comercial de Rochagan®, teve sua patente transferida para o Brasil em 2003, passando a ser produzido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) (OLIVEIRA et al., 2008)

Figura 6- Estrutura molecular do benzonidazol



Fonte: NOGUEIRA et al. (2011).

O mecanismo de ação do benzonidazol ainda não foi elucidado. Estudo recente sugere que benzonidazol atua como um pró-fármaco sendo ativado por nitroreduases mitocondriais parasitárias, que reduzem o benzonidazol gerando metabólito tóxico sem significativa geração de espécies reativas de oxigênio (WILLKINSON et al., 2011). No entanto, o possível mecanismo mais relatado na literatura sugere que o efeito tripanocida do nitrocomposto deve-se a redução dos grupamentos nitro, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio) e metabólitos eletrofílicos, os quais podem fazer ligações covalentes com macromoléculas vitais do parasito e promover dano oxidativo ao *T.cruzi* (MAYA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; SESTI-COSTA et al., 2014; URBINA; DOCAMPO, 2005).

O benzonidazol é o fármaco indicado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da doença de Chagas; todavia possui eficácia limitada e desencadeia muitos efeitos adversos (ABE et al., 2002b; CANÇADO, 2002; PÉREZ-AYALA et al., 2011). Nas primeiras semanas, os efeitos adversos comumente observados em pacientes que utilizam o benzonidazol são reações cutâneas, dentre as quais podem ser citados dermatite atópica, eritomatose, erupções sensíveis à luz, púrpura, febre, perda de peso e distúrbios gastrointestinais. O avançar do tratamento pode culminar em leucopenia, trombocitopenia e distúrbios neurológicos como degeneração neuronal e desmielinização (HIGINO, 2012). A necessidade do emprego deste medicamento em esquemas posológicos prolongados, de pelo menos 60 dias, com doses diárias

de 5-7 mg/kg de peso corporal, facilita o surgimento dessas reações (COURA *et al.*, 1997; COURA e BORGES-PEREIRA, 2012; HASSLOCHER-MORENO, 2012).

A seletividade farmacológica do benzonidazol ao *T. cruzi* é atribuída ao fato de que as células de mamíferos hospedeiros possuem um maior aporte de mecanismos antioxidantes, quando comparadas às células de tripanosoma. Esses mecanismos, que podem ter natureza enzimática ou não enzimática, são responsáveis pela detoxificação das células e redução da toxicidade de xenobióticos. Os sistemas antioxidantes mais importantes são os mediados pelas enzimas superóxido desmutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona-S-transferase, e pelas vias do α -tocoferol e glutatona, e ainda a metabolização de radicais livres e compostos eletrofílicos por grupos -SH de metalotióis (MAYA *et al.*, 2007). Entretanto, o benzonidazol apresenta marcante toxicidade sobre células hospedeiras, o que indica que os mecanismos detoxificantes intracelulares não são eficazes na proteção das células contra a ação do BZ (RIBEIRO, 2009). Assim se faz necessário a pesquisa por novas alternativas terapêuticas.

1.2 Nanociência e a Nanotecnologia na entrega de fármacos

“Quais seriam as propriedades dos materiais se nós pudéssemos arrumar os átomos da forma que nós queremos?” Esse foi o questionamento levantado por Richard Feynman, físico norte-americano, durante palestra no ano de 1959. Esse cientista anteviu um dos temas mais promissores da atualidade, a Nanociência. O avançar da tecnologia proporcionou o surgimento de dispositivos e equipamentos que tornaram possíveis as ideias de Feynman. Em 1981, foi criado o microscópio de tunelamento, que permitiu obter imagens de átomos em uma superfície, e em 1990, pesquisadores americanos posicionaram individualmente átomos de xenônio (BARTH, 2006).

O termo Nanociência é utilizado para descrever o campo da ciência voltado para a Nanotecnologia, que compreende a manipulação pelo homem de materiais em escala nanométrica, ou seja, de dimensões entre 0,1 e 100 nanômetros. Um nanômetro (nm) equivale a um bilionésimo do metro; para se ter uma noção do tamanho real dessas partículas, um fio de cabelo humano tem, aproximadamente, 80.000 nm de espessura, hemácias apresentam 5.000 nm de diâmetro enquanto uma molécula de DNA tem cerca de 2,5 nm (BISOGLI *et al.*, 2012; BORGHETTI; GUAZZELLI, 2005). A importância da ciência nessa dimensão reside no fato de que, à medida que o objeto manipulado se aproxima da escala nanométrica, as leis da Física

Clássica perdem a validade e o material passa a se comportar com base na Física Quântica (MARTINEZ; ALVES, 2013).

Evidencia-se cada vez mais que a redução do tamanho dos materiais leva ao surgimento de novas propriedades físicas e químicas, devido ao aparecimento de efeitos quânticos de tamanho e de superfície. Ou seja, um material com seu tamanho reduzido à escala nanométrica pode apresentar propriedades eletrônicas, mecânicas e térmicas diferentes quando em seu estado de sólido estendido (BURDA et al., 2005; MARTINEZ; ALVES, 2013). Outra consequência é o aumento da área superficial específica, devido ao aumento significativo na quantidade de átomos superficiais em relação ao volume total da partícula, alterando assim, sua reatividade química (CAO, 2004).

As alterações nas propriedades dos materiais em nanoescala e sua variedade segundo composição e aplicação atraem significativo interesse científico e tem promovido a convergência de ciências distintas como física, biologia, química e informática, fazendo da nanociência um campo interdisciplinar em expansão (BARTH, 2006).

Do ponto de vista biológico, a nanotecnologia investiga a relação das biomacromoléculas e células com os nanomateriais. Uma vez que estão na mesma escala de tamanho, podem interagir quando colocados em contato, havendo formação de complexos, genericamente conhecidos como bionanointerface. As implicações tecnológicas desta bionanointerface vêm sendo denominadas Bionanotecnologia ou Nanotecnologia Biológica, com desdobramentos nas áreas da saúde, agricultura e meio ambiente, uma vez que estão sendo planejados e construídos nanossistemas com a capacidade de interagir com os níveis inferiores da organização biológica. Desse modo, dependendo da natureza destas interações, irão ocorrer reflexos sobre os níveis superiores da organização dos biosistemas (tecidos, órgãos, sistemas, organismo, população, ecossistema) dado a interconectividade entre todos os níveis (MARTINEZ; ALVES, 2013).

O interesse pela bionanotecnologia é compreensível diante da variedade de aplicações dos nanomateriais nessa área. São utilizados na produção de implantes e engenharia de tecidos (NAYAK et al., 2010), na fabricação de medidores de poluentes ambientais (REN; CHEN; NAGATSU, 2011), no desenvolvimento de sensores biológicos e sistemas de transporte de moléculas biologicamente ativas (BENINCASA et al., 2011; HIGAKI et al., 2006; LIANG et al., 2013; WEI et al., 2010).

A produção de sistemas nanoparticulados para transporte de moléculas biologicamente ativas como proteínas, ácidos nucleicos e fármacos é uma das aplicações mais promissoras da nanotecnologia voltada para medicina e diagnóstico (VERMA et al., 2013). Tem atraído interesse pela possibilidade de serem sintetizadas de forma a disponibilizar o fármaco gradualmente, dependendo na necessidade, podendo diminuir a toxicidade e aumentar a eficiência em doses baixas (MANUJA et al., 2013). Além de poder ser funcionalizados, sendo conferidos a esses sistemas propriedades versáteis, como boa biocompatibilidade e entrega a alvo seletivo, de acordo com o interesse pretendido (XU et al., 2012). A este respeito, a prata metálica, que tem potencial antimicrobiano reconhecido, apresenta atividade biocida ainda mais elevada quando utilizada na forma de nanopartícula devido ao aumento tanto da área de superfície como da quantidade de átomos na mesma (NOWACK; KRUG; HEIGHT, 2011). Ouro nanoparticulado também apresenta ação biocida excelente para eliminar *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* em tempos curtos (LIMA et al., 2013). Nanopartículas de selenio (SeNP) apresentam menor toxicidade que os óxidos SeO_3 e SeO_4 , e testes *in vitro* e *in vivo* comprovam que eNP podem inibir a proliferação das formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania major*, além de limitar a localização da Leishmaniose cutânea (BEHESHTI et al., 2013).

Polímeros apresentam elevada eficácia na entrega de fármacos, mas possuem algumas limitações, tais como síntese complicada e biocompatibilidade insatisfatória. Compostos inorgânicos, em contrapartida, tem vantagens como biocompatibilidade ideal, capacidade de carregamento de diferentes agentes terapêuticos, pH de dissolução favorável a entrega intracelular, além de serem biodegradáveis, uma das características mais desejáveis para uma nanopartícula. Esses componentes inorgânicos fornecem matérias de baixo risco e com variada aplicação prática, por isso têm sido muito utilizados na produção de partículas carreadoras de fármacos (BIRADAR et al., 2012; FUJIWARA et al., 2008; LIANG et al., 2013; SUKHORUKOV et al., 2004).

O CaCO_3 , componente significativo dos tecidos duros naturais, tais como ossos e dentes, apresenta potencial promissor no desenvolvimento de transportadores de fármacos e proteínas bioativas. Comparado com vários outros materiais inorgânicos anteriormente utilizados, o CaCO_3 é extremamente adequado a produção de nanopartículas de liberação controlada devido sua baixa toxicidade e prolongada biodegradabilidade (MALEKI et al., 2015; QIAN et al., 2011; UENO et al., 2004; WEI et al., 2010).

Testes *in vivo* realizados com nanopartículas de CaCO_3 e insulina (nanoinsulina), demonstraram que o CaCO_3 melhora a entrega da insulina via transdérmica. Provavelmente as

nanopartículas penetram através do estrato córneo e epiderme atingindo a derme, onde permanecem e liberam, lentamente, a insulina na corrente sanguínea. Esse transporte tem grande valor, pois promove a entrega de insulina de forma não invasiva (HIGAKI et al., 2006)

Nanopartículas de CaCO_3 são eficientes também no tratamento gênico de distúrbios como imunodeficiências, fibrose cística, Parkinson e câncer. A interação eletrostática do Ca^{2+} com a carga negativa da molécula de DNA promove estabilidade do DNA mediante degradação das nucleases celulares (CHEANG et al., 2010). Além disso, a alta toxicidade dos agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer é um importante fator limitante de seu uso, a doxorrubicina, por exemplo, é especialmente tóxica para o coração e os rins, o que dificulta a sua utilização. A produção de nanopartículas de CaCO_3 de liberação direcionada e seletiva desse fármaco, permite que doses elevadas sejam entregues a um tecido alvo desejado, minimizando a exposição dos tecidos saudáveis aos efeitos secundários do medicamento (MALEKI et al., 2015; VERMA et al., 2013; ZHAO et al., 2010).

O desenvolvimento de nanopartículas pode ser de grande valia para a utilização de fármacos potencialmente tóxicos que provocam significativos efeitos colaterais. Conectando essa informação com a realidade da doença de Chagas, entende-se que a utilização de um fármaco com potencial tripanocida já constatado sob a forma de nanopartícula é uma alternativa promissora para o problema na terapêutica da doença de Chagas.

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é um grande problema de saúde pública, pois causa altos índices de morbidade e mortalidade nas populações afetadas (RASSI; MARIN-NETO, 2010). Embora, inicialmente, a doença de Chagas estivesse, aparentemente, restrita a América Latina, a migração da população levou ao aparecimento da doença em regiões não endêmicas, como Estados Unidos da América e Canadá (AFONSO; EBELL; TARLETON, 2012).

Um dos poucos fármacos disponíveis para o tratamento dessa doença é o benzonidazol, desenvolvido há mais de quarenta anos, que apresenta eficácia limitada e provoca sérios efeitos adversos (VENDRAMETTO et al., 2010). Existe assim uma necessidade na busca de estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitas sem causar tantas complicações para o hospedeiro.

O transporte de fármacos por meio de nanopartículas tem atraído interesse da comunidade científica por, em diversos trabalhos experimentais e clínicos, estar demonstrando eficiência quanto à liberação controlada e direcionada de moléculas farmacológicas (HIGAKI et al., 2006; ZHAO et al., 2010).

O desenvolvimento de nanopartículas pode ser de grande valia para a utilização de fármacos potencialmente tóxicos que provocam significativos efeitos colaterais. A facilidade de transposição da membrana celular, aliada à liberação controlada da molécula terapêutica, diminui as concentrações plasmáticas do fármaco e conseqüentemente reduz sua toxicidade (ROMERO; MORILLA, 2010).

Conectando essa informação com a realidade da doença de Chagas, entende-se que a utilização de um fármaco com potencial tripanocida já constatado sob a forma de nanopartícula pode ser uma alternativa promissora para o problema na terapêutica da doença de Chagas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do benzonidazol nanoparticulado em carbonato de cálcio sobre culturas de cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito tripanocida do benzonidazol nanoparticulado sobre formas epimastigota, tripomastigota e amastigota da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.
- Analisar a toxicidade do benzonidazol nanoparticulado sobre células hospedeiras e determinar o índice de seletividade.
- Investigar alterações celulares indicativas de morte por necrose e apoptose induzidas pelo benzonidazol nanoparticulado.
- Avaliar o potencial transmembrânico mitocondrial após tratamento com benzonidazol nanoparticulado.
- Comparar o efeito tripanocida do benzonidazol nanoparticulado e benzonidazol livre.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDT) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, com colaboração do Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais (LCTM) do Departamento de Física na produção e caracterização de nanopartículas, ambos laboratórios da Universidade Federal do Ceará.

4.2 Linhagens celulares

No presente trabalho, foram utilizadas células de mamífero LLC-MK2 (*Rhesus monkey kidney*) e formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y, doadas pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.3 Substâncias em estudo e preparo das soluções de trabalho

O benzonidazol (BZ), fármaco de referência com teor de pureza de 99,31%, foi gentilmente cedido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) e usado para a produção de nanopartículas de benzonidazol com carbonato de cálcio (BZ@CaCO₃). Concomitantemente, foram produzidas nanopartículas de carbonato de cálcio sem adição de benzonidazol ou outro fármaco (nCaCO₃).

Para a realização dos ensaios biológicos, o BZ foi diluído em solução estéril de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% na concentração de 2 mg/mL. A partir dela, foram realizadas diluições seriadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) estéril para produzir as concentrações de trabalho. As diluições foram realizadas para garantir concentração máxima de 0,5% de DMSO. Além disso, foram realizados ensaios de citotoxicidade em parasitas e células hospedeiras para garantir que o veículo não apresenta efeito sobre o crescimento dessas células.

As nanopartículas foram dispersas em PBS estéril (1 mg/mL) e incubadas em sonicador (Unique Ultrasonic Cleaner[®]) por 40 minutos a 37°C para desagregação de partículas.

Antes da realização de cada experimento, diluições seriadas nas concentrações de trabalho foram preparadas em PBS.

4.4 Determinação do teor de BZ na BZ@CaCO₃

A quantificação de benzonidazol encapsulado nas nanopartículas foi realizada por espectrofotometria UV (MANUJA et al., 2013). Utilizando o espectrofotômetro Cary 5000 UV-vis-NIR, equipado com cubeta retangular de caminho óptico de 1 cm.

Inicialmente, 3,8 mg de BZ foram pesados e dissolvidos em água destilada e DMSO 5% em balão volumétrico de 50 mL. Obteve-se, assim, uma solução de concentração igual a 76 mg/L, a partir da qual foram feitas diluições seriadas em água destilada (38 a 5,07 mg/L). Para determinação do espectro de absorção de luz do BZ, as soluções foram submetidas à varredura espectrofotométrica em comprimentos de onda variando de 200 a 400 nm. A curva padrão de BZ foi então determinada com base no pico de absorção observado (BAHARARA et al., 2014; BEZERRA et al., 2014; SOARES-SOBRINHO et al., 2012).

Para determinação do teor de BZ nas nanopartículas, 6,5 mg de BZ@CaCO₃ foram dispersos em 50 mL de água destilada em balão volumétrico, obtendo concentração final de 130 mg/L. Em seguida, essa mistura foi agitada por 4 horas a 37 °C para liberação completa do BZ da nanopartícula. Por fim, foi realizada medição espectrofotométrica conforme descrito acima. As concentrações foram calculadas por interpolação na curva padrão de BZ (BEZERRA et al., 2014; SOARES-SOBRINHO et al., 2012; UNCITI-BROCETA et al., 2015).

4.5 Ensaio de citotoxicidade em células hospedeiras LLC-MK2

4.5.1 Cultivo e manutenção de células LLC-MK2

Tendo em vista a ideia central do trabalho, que sugere um novo modelo de sistema de liberação de benzonidazol, é imprescindível a realização de testes de citotoxicidade em células de mamíferos, com o objetivo de determinar as concentrações de trabalho ideais para os ensaios de atividade antiparasitária e comparar a seletividade das substâncias testadas em relação ao parasito e as células de mamíferos.

As células LLC-MK2 foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 25 cm² em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) composto de glutamina (0,58 g/L), bicarbonato de sódio (3,7 g/L), glicose (4,5 g/L), piruvato de sódio (0,11 g/L), sais inorgânicos, vitaminas e outros aminoácidos, acrescido de penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal (SBF). A linhagem foi mantida em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, sendo observada diariamente em microscópio óptico invertido, até atingirem confluência (CECILIO et al., 2013).

A manutenção celular foi feita por meio de repiques, procedimento em que as células são removidas da superfície da garrafa, têm sua viabilidade avaliada por quantificação em câmara de Neubauer na presença de azul de trypan e são então transferidas para uma nova garrafa. O meio de cultura da garrafa confluenta foi removido, e as células lavadas com 2-3 mL de PBS estéril, pH 7,4. A garrafa foi incubada com 1 mL de Tripsina por 5-8 minutos a 37 °C para o desprendimento das células aderidas na superfície da garrafa. Em seguida, a tripsina foi desativada pela adição de 1 mL de DMEM completo, e alíquotas da suspensão celular obtida foram transferidas para uma nova garrafa de cultivo (DA SILVA et al., 2008; MENEZES, 2013).

Para estoque das células LLC-MK2, as células foram desprendidas e centrifugadas a 4000 rpm/ 5 min, ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de DMSO e quantificadas de acordo com a viabilidade indicado por azul de trypan. Em seguida, estocadas em criotubos a -20°C *overnight* e transferidas para *freezer* a -80°C onde foram mantidas por até três meses.

4.5.2 Determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre células hospedeiras LLC-MK2

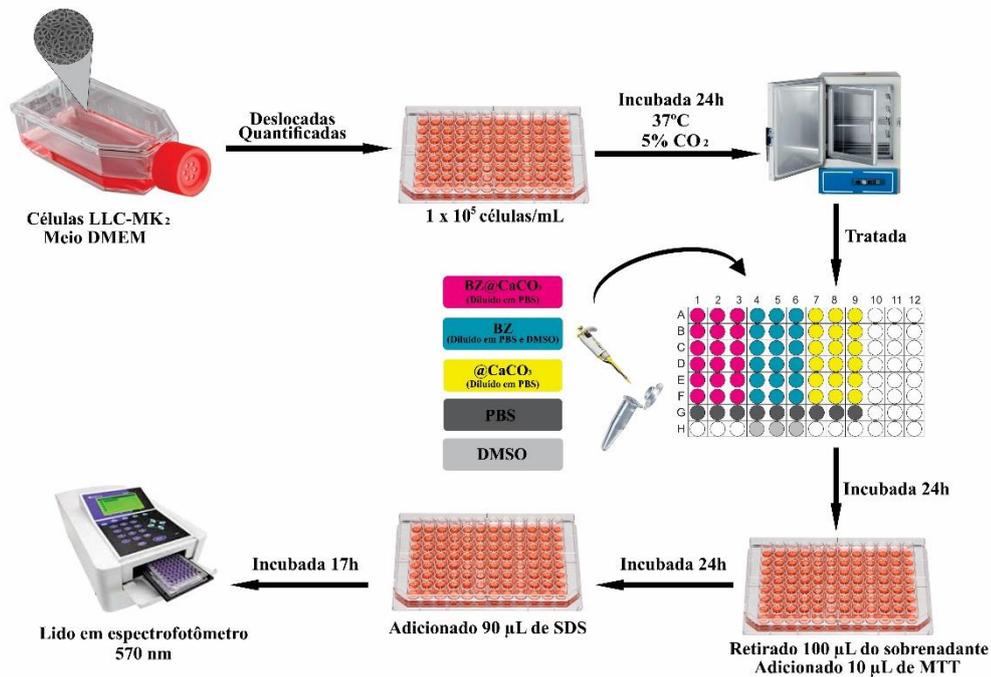
A citotoxicidade das substâncias em estudo sobre células LLC-MK2 foi determinada através do teste do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MTT), ensaio amplamente utilizado na quantificação espectrofotométrica da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

O teste baseia-se na reação colorimétrica de conversão do MTT em sal de formazan. O MTT, sal de cor amarelada, é internalizado nas células viáveis por endocitose e reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Esses cristais são solubilizados por um agente surfactante adicionado em seguida, e os produtos finais são lidos por

espectrofotometria a 570 nm. A intensidade da cor violácea produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MENEZES, 2013; UNCITI-BROCETA et al., 2015)

Para a realização desse ensaio, as células LLC-MK2 foram removidas da garrafa e centrifugadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram ressuspensas em 1 mL de DMEM. Alíquotas foram diluídas em solução de azul de trypan 0,1% e quantificadas em câmara de Neubauer. As células foram subcultivadas na concentração 1×10^5 células/mL em meio DMEM completo, em placas de 96 poços e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24h, tempo necessário para a adesão e proliferação celular na superfície da placa. Passado esse período, as células foram tratadas com BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/mL e incubadas sob as mesmas condições por mais 24h. Poços tratados com PBS foram utilizados como controle negativo. Em seguida, 100 µL do meio da cultura foram retirados, 10 µL de uma solução de MTT (Sigma[®]) a 2,5 mg/mL em PBS foram acrescentados e, 4h depois, foram adicionados 90 µL do agente surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17h de incubação a placa foi lida em leitor de placa (Asys Expert Plus[®]) a 570nm (figura 7). Foram feitos no mínimo três experimentos em triplicata. Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular \pm erro padrão médio (E.P.M.) em relação ao controle negativo. A CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento celular) foi estimada por regressão não-linear (DA SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2011). Foram feitos grupos tratados apenas com DMSO 0,5%, concentração máxima utilizada no ensaio, utilizados como controle negativo.

Figura 7- Representação esquemática do ensaio para determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre células hospedeiras LLC-MK2



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Ensaio com formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y

4.6.1 Cultivo e manutenção das formas epimastigotas

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (*Liver infusion tryptose*), de acordo com Camargo (1964). O meio LIT é composto de cloreto de sódio (4 g/L), cloreto de potássio (0,4 g/L), fosfato de sódio anidro (8 g/L), triptose (5 g/L), infusão de fígado (5 g/L), glicose (4 g/L), hemina (25 mg/L), suplementado com 10% SBF, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em garrafas plásticas estéreis e mantidas em incubadora a 28°C .

A manutenção das culturas de epimastigotas foi feita por meio de repique realizado a cada sete dias, procedimento em que 0,1 mL da suspensão é transferida para uma nova garrafa plástica estéril contendo 10 mL de meio LIT completo (KESSLER et al., 2013; SANTORO et al., 2007).

Para estoque da cultura, os epimastigotas foram quantificados em câmara de Neubauer e centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspenso em meio LIT acrescido de 10% de DMSO estéril. Essa suspensão foi quantificada, suspensões na concentração 10^6 parasitos/mL foram armazenadas em *vials* de criopreservação a -20°C *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a -80°C onde foram mantidas por até três meses.

4.6.2 Determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre as formas epimastigotas

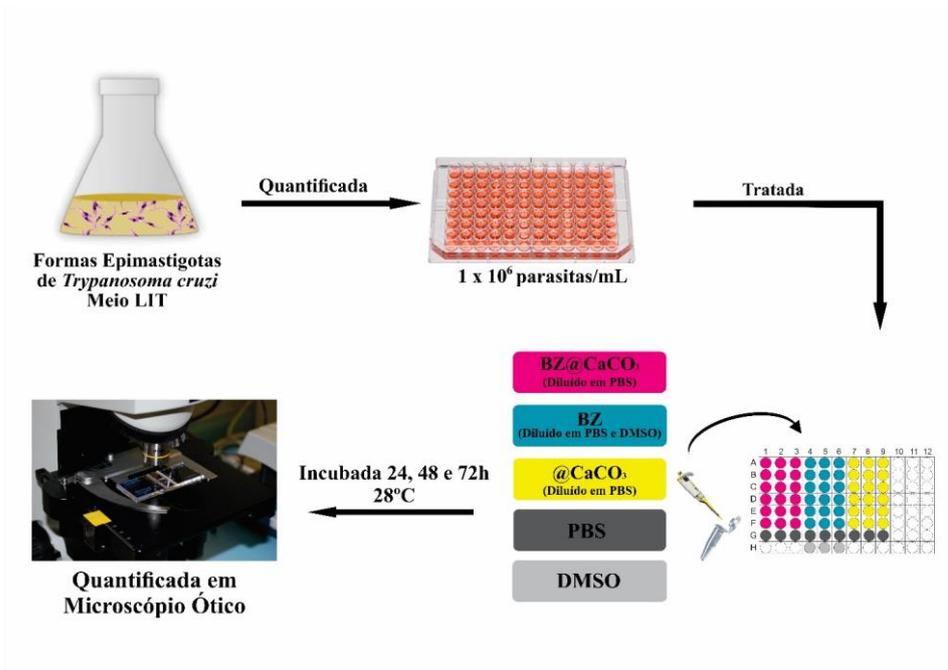
A avaliação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre as formas epimastigotas foi realizada por meio do método de contagem em câmara de Neubauer (NOGUEIRA et al., 2015).

Os ensaios foram realizados com cultura de epimastigotas no sétimo dia após repique, período em que atinge a fase *log* de crescimento (ADADE; CHAGAS; SOUTO-PADRÓN, 2012). Nessa ocasião, a cultura foi quantificada e uma suspensão de trabalho foi produzida e subcultivada em placa de 96 poços na concentração final de 10^6 parasitos/mL. Em seguida, a cultura foi tratada com BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e mantida por 24, 48 e 72 horas em incubadora a 28°C (PEREIRA et al., 2015). Como controle negativo, foram utilizados poços tratados com PBS.

O crescimento e as alterações morfológicas da cultura foram acompanhados por microscopia óptica, e as contagens foram feitas em Câmara de Neubauer, também chamada hemocitômetro, após os períodos de incubação. Os parasitos foram considerados viáveis por observação de motilidade e manutenção de forma característica. Foram realizados no mínimo três experimentos em triplicata (BECERRA et al., 2012b; KESSLER et al., 2013). Ensaio mostrado na figura 8.

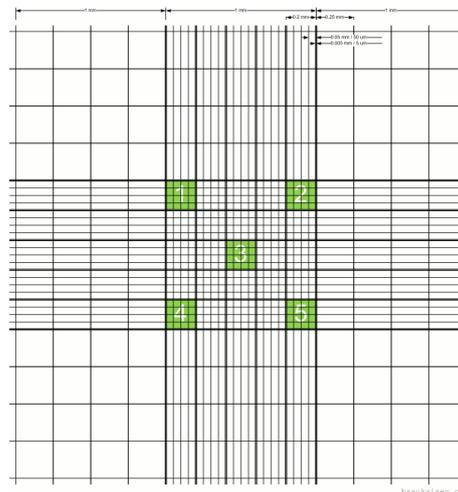
A quantificação de parasitos viáveis foi realizada pela contagem de cinco campos presentes no quadrante central do hemocitômetro, como demonstrado na figura 9.

Figura 8 - Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9-Representação esquemática da contagem celular em hemocitômetro



Fonte: BRAUKAISER (2015).

Legenda: Os parasitos com motilidade preservada localizados nos campos sinalizados com a cor verde foram quantificados.

A densidade parasitária foi determinada utilizando a fórmula abaixo:

$$\frac{N^{\circ} \text{ parasitos}}{\text{mL}} = \text{contagem} \times 5 \times FC \times FD$$

Sendo FC o fator da correção da câmara de Neubauer (10^4) e FD o fator de diluição utilizado para a contagem. Os resultados dos ensaios foram expressos em porcentagem de viabilidade celular \pm E.P.M. em relação ao grupo controle negativo *versus* concentração da substância testada. Por fim, foi estimada a CI_{50} como descrito acima.

4.7 Ensaios com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y

4.7.1 Cultivo e manutenção das formas tripomastigotas

A cultura das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi mantida por meio de infecções consecutivas de células LLC-MK2. As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² na densidade 2×10^5 células/mL utilizando meio DMEM a 10% SBF em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24 horas, período em que a cultura atinge estágio de semiconfluência, as células foram infectadas com suspensão de tripomastigotas na concentração de 10^7 parasitos/mL e passaram a ser mantidas no meio DMEM a 2% de SBF trocado diariamente. No 5º dia após a infecção, observou-se o início da eclosão celular com liberação de tripomastigota no sobrenadante. As eclosões foram observadas até o 7º dia, quando então as garrafas foram descartadas. Os tripomastigotas colhidos no 6º dia foram utilizados nos ensaios, enquanto os coletados no 7º dia foram utilizados para a infecção de novas garrafas (ADADE; CHAGAS; SOUTO-PADRÓN, 2012; MEIRA et al., 2015).

Para o estoque da cultura, os tripomastigotas liberados pela ruptura de células infectadas no 5º dia após infecção foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer e centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. O *pellet* formado após a centrifugação foi ressuspenso em meio DMEM acrescido de 10% de DMSO estéril. A partir dessa suspensão, alíquotas de concentração 10^6 parasitos/mL foram preparadas, e armazenadas em *vials* de criopreservação a -20°C *overnight* e, em seguida, transferidas para *freezer* a -80°C onde foram mantidas por até três meses.

4.7.2 *Determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de T. cruzi*

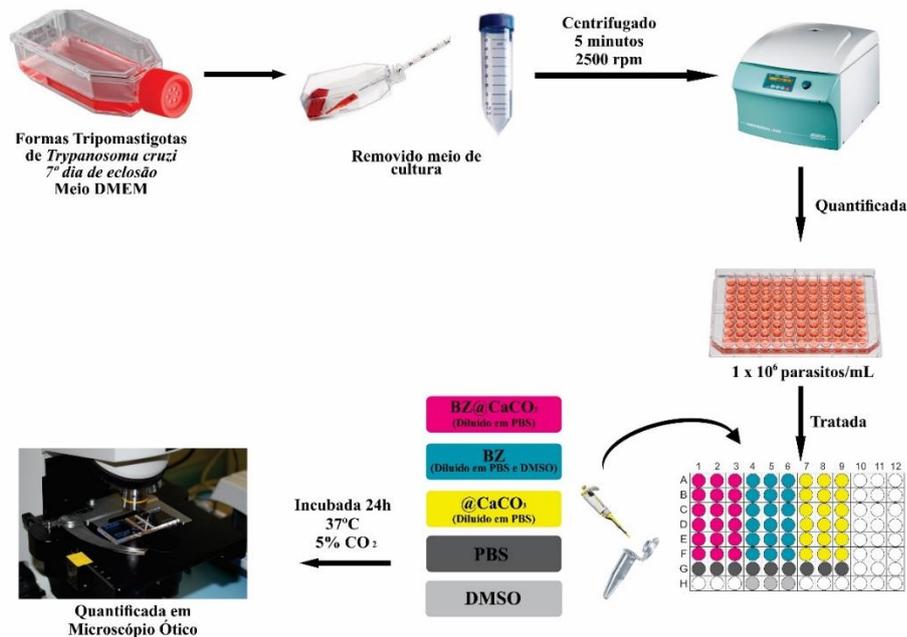
No sexto dia de infecção, o meio das garrafas infectadas foi removido e centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* contendo os tripomastigotas foi ressuspensionado em DMEM a 10% de SBF. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e subcultivados em placa de 96 poços na densidade de 10⁶ parasitos/mL. Em seguida, os grupos foram tratados com BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ nas concentrações finais de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 µg/mL, e mantidos por 24 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. (ADADE; CHAGAS; SOUTO-PADRÓN, 2012; BECERRA et al., 2012a; BORGES et al., 2012; MEIRA et al., 2015). Passado o tempo de tratamento, as suspensões celulares de cada grupo experimental foram quantificadas como explicado anteriormente. Ensaio mostrado na figura 10. Devido ao significativo efeito da BZ@CaCO₃ nas concentrações testadas inicialmente, experimentos subsequentes foram feitos também nas concentrações de 0,78 e 0,39 µg/mL. Como controle negativo, foram usadas culturas de parasitos tratados com PBS. Foram realizados no mínimo três experimentos em triplicata.

Os resultados dos ensaios foram expressos em porcentagem de viabilidade celular ± E.P.M. em relação ao grupo controle negativo *versus* concentração da substância testada e pela estimativa da CI₅₀.

Foi estimado o índice de seletividade, calculado como mostrado na fórmula abaixo:

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{CI_{50} \text{ LLCMK2}}{CI_{50} \text{ Tripomastigota}}$$

Figura 10- Representação esquemática do ensaio para a determinação da citotoxicidade da BZ@CaCO₃ sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.8 Avaliação do efeito da BZ@CaCO₃ sobre a forma amastigota de *T. cruzi*

A avaliação do efeito da BZ@CaCO₃ sobre as formas amastigotas de *T. cruzi* foi realizada por contagem de células fixadas e coradas em microscópio óptico (HERNÁNDEZ-CHINEA et al., 2015; PEREIRA, 2015).

As células LLC-MK2 foram subcultivadas em meio DMEM a 10% de SBF na densidade de 10⁵ células/mL em placas estéreis de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. A placa foi incubada em atmosfera a 5% de CO₂ e 37°C por 24h para que a cultura atingisse estágio de semiconfluência. Após esse período, a cultura foi infectada com suspensão de tripomastigotas na densidade de 5 x 10⁶ parasitos/mL e incubada por 24h sob as mesmas condições, agora em meio DMEM a 2% de SBF. Passado o período de infecção, as células foram tratadas com as CI₅₀ e 2 x CI₅₀ de BZ@CaCO₃ (8,72 e 17,4 µg/mL) e BZ (56,76 e 113,6 µg/mL) obtida no experimento com as formas epimastigotas tratados por 24h. Culturas tratadas com PBS foram utilizadas como controle negativo. Após 24h de incubação com as substâncias testes, as lamínulas foram retiradas da placa, lavadas com PBS, fixadas com solução de Bouin

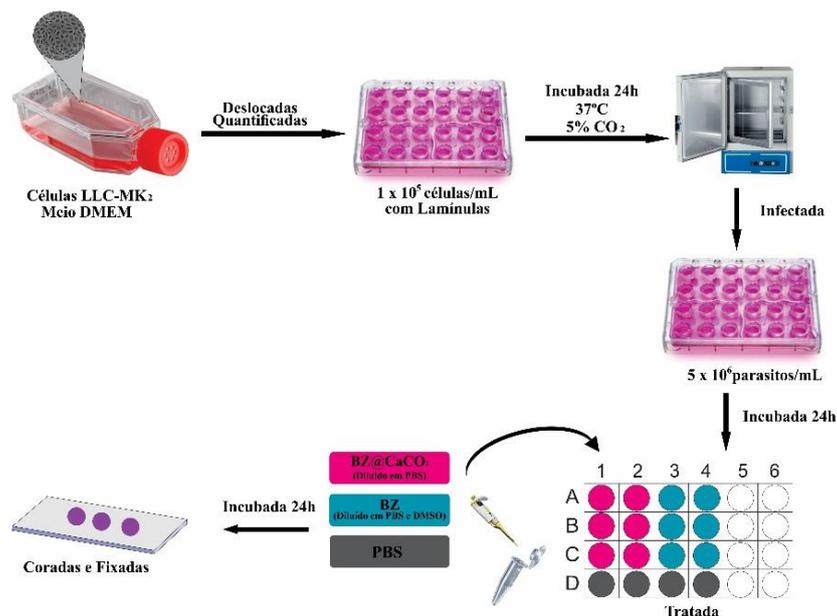
e coradas com Giemsa (BORGES et al., 2012; DE SOUZA et al., 2011; MACEDO et al., 2015). Ensaio mostrado na figura 11.

O número de células infectadas e o número de amastigotas por célula infectadas foram determinados por contagem randômica de 300 células em microscópio óptico (HERNÁNDEZ-CHINEA et al., 2015). O resultado dos ensaios foi expresso em porcentagem de células infectadas e número de amastigota por célula \pm E.P.M. em relação ao grupo controle negativo *versus* concentração da substância testada. Foram feitos três experimentos em triplicata.

O efeito antiamastigota foi também estimado pelo cálculo do índice de sobrevivência, definido como na fórmula abaixo:

$$\text{Índice de Sobrevivência} = \% \text{ células infectadas} \times \frac{N^{\circ} \text{ de amastigotas}}{\text{Células infectadas}}$$

Figura 11- Representação esquemática do ensaio para avaliação do efeito da BZ@CaCO₃ sobre formas amastigotas de *T. cruzi*



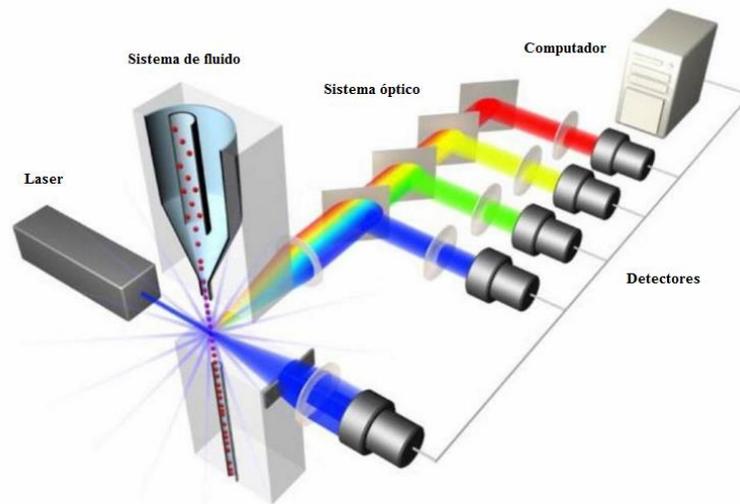
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Ensaios para avaliação de mecanismo de morte

A avaliação do tipo de morte celular induzida pelas substâncias em estudo foi realizada pela investigação de alterações celulares indicativas de morte por necrose ou apoptose, e pela análise do comprometimento mitocondrial, por citometria de fluxo, usando formas epimastigotas de *T. cruzi*.

A citometria de fluxo é uma técnica de análise automatizada através da qual uma única célula pode ser caracterizada física e bioquimicamente, em meio líquido (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000). Baseia-se na aplicação de radiação a laser, fluxo hidrodinâmico, ótica e substâncias fluorescentes associados a recursos de informática, como demonstrado na figura 12.

Figura 12-Representação esquemática dos principais componentes de um citômetro de fluxo



Fonte: Adaptada de INOVCARE (2015).

Legenda: O sistema de fluido permite a passagem das células pelos feixes de laser uma a uma. A luz dispersa pelas células é direcionada, por meio do sistema óptico até detectores que convertem a intensidade da luz dispersa em voltagem e transmite a informação para o computador acoplado.

A aquisição dos parâmetros no citômetro de fluxo é feita através da passagem de uma amostra por um ou mais feixes de laser, e pela captura da luz dispersa por cada célula. A medição da luz dispersa e emissão de fluorescência permite classificá-las quanto ao seu tamanho, granulosidade (ou complexidade interna) e intensidade de fluorescência (DE ANDRADE, 2011).

Envolvidas por fluxo de fluido isotônico, as células passam, uma a uma, pelo feixe de laser e dispersam a luz em todos os ângulos. A luz dispersa coletada na direção frontal, chamada de FSC (*Foward Light Scatter*), é proporcional ao tamanho da célula, sendo utilizada para avaliar este parâmetro. A luz dispersada lateralmente, chamada de SSC (*side scatter*) remete a complexidade celular, como o número de organelas presentes. Todos os feixes de luz dispersados são quantificados por detectores que convertem a intensidade da luz dispersa em voltagem, e transmitem a informação para computador acoplado. Tamanho e complexidade são considerados parâmetros intrínsecos, uma vez que pode ser obtido na ausência de marcadores (HALAMODA-KENZAOU et al., 2015).

Para a análise de uma maior variedade de parâmetros são utilizados fluorocromos, que promovem a marcação celular em variados alvos. Os dados de fluorescência são geralmente coletados da mesma maneira, à medida que cada célula passa pelo laser, um sinal de fluorescência é gerado, a fluorescência é direcionada ao detector onde é traduzida em um pulso de voltagem proporcional à quantidade de fluorescência emitida (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; HALAMODA-KENZAOU et al., 2015).

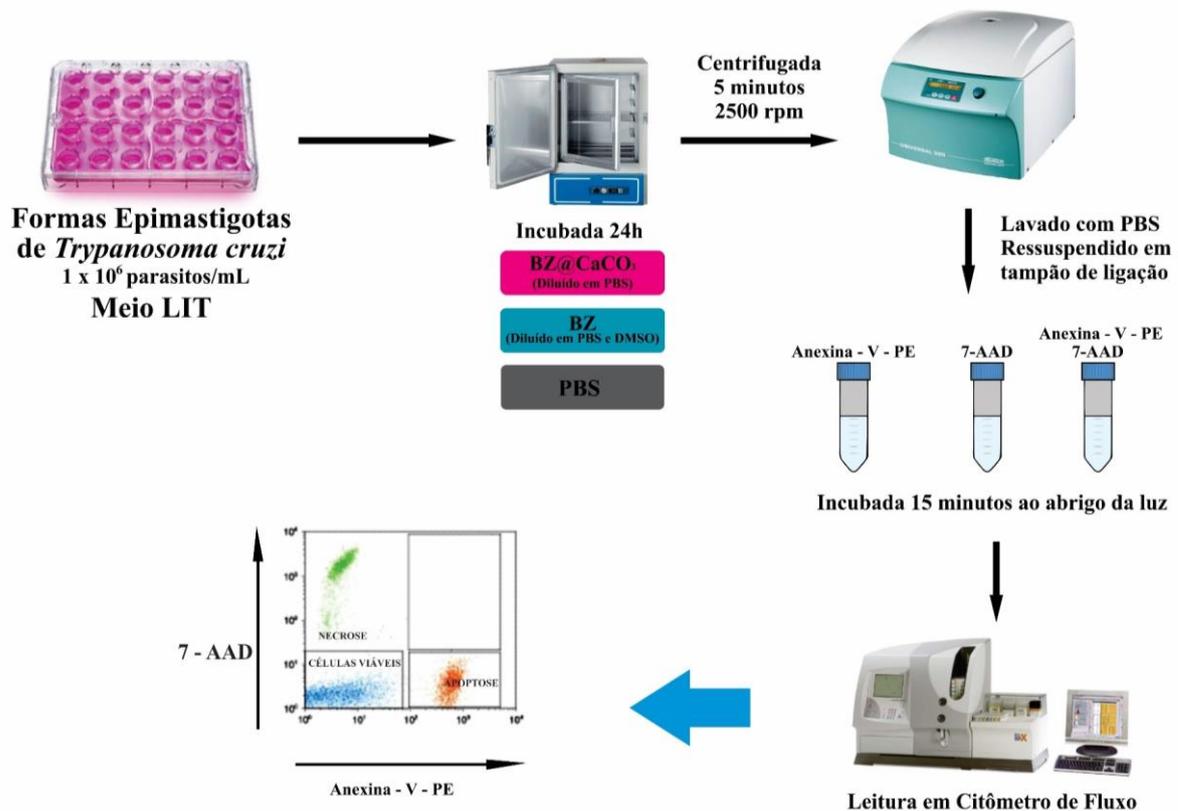
4.9.1 Ensaio para investigação do mecanismo de morte celular.

A análise da citometria de fluxo utilizando os marcadores de fluorescência 7-amino actinomicina D (7-AAD) e anexina V- ficoeritrina (Anexina V-PE) foi realizada objetivando diferenciar a morte parasitária em apoptose ou necrose. A anexina V-PE liga-se fortemente a fosfatidilserina, um fosfolípido interno da membrana plasmática, que é externalizado no estágio inicial da apoptose, sendo muito utilizado como marcador desse tipo de morte celular. O 7-AAD liga-se a cadeias de DNA celular; no entanto é impermeável à membrana celular íntegra. Dessa forma, é um sinalizador importante da perda de integridade da membrana, sinal característico de necrose (BD PHARMINGENTM, 2008; BRAZÃO et al., 2015; JOUVE et al., 2013)

Nesse ensaio, as formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T.cruzi* foram incubadas com BZ@CaCO₃ (8,72 µg/mL), BZ (56,76 µg/mL) e PBS (controle negativo), por 24h em placas de 24 poços. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm/ 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado uma vez com PBS e outras duas vezes com tampão de ligação (0,01 M hepes/NaOH, pH 7,4, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂), sendo

finalmente ressuspensionado com 100 μ L do mesmo. As suspensões foram incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz com 5 μ L 7-AAD e Anexina V- PE (BD Pharmingen™, usando um kit comercial – PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I). Após esse período, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação para a leitura no citômetro (FACSCalibur®, BD Pharmigen), onde os grupos experimentais foram analisados usando, no mínimo, 10^4 células por aquisição. O percentual de células marcadas com cada fluorocromo ou não marcadas foi obtido para análise estatística (DELAVARI et al., 2014; KESSLER et al., 2013). Ensaio mostrado na figura 13.

Figura 13- Representação esquemática do ensaio para investigação do mecanismo de morte celular induzido pela BZ@CaCO₃ sobre formas epimastigotas de *T.cruzi* após 24h de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

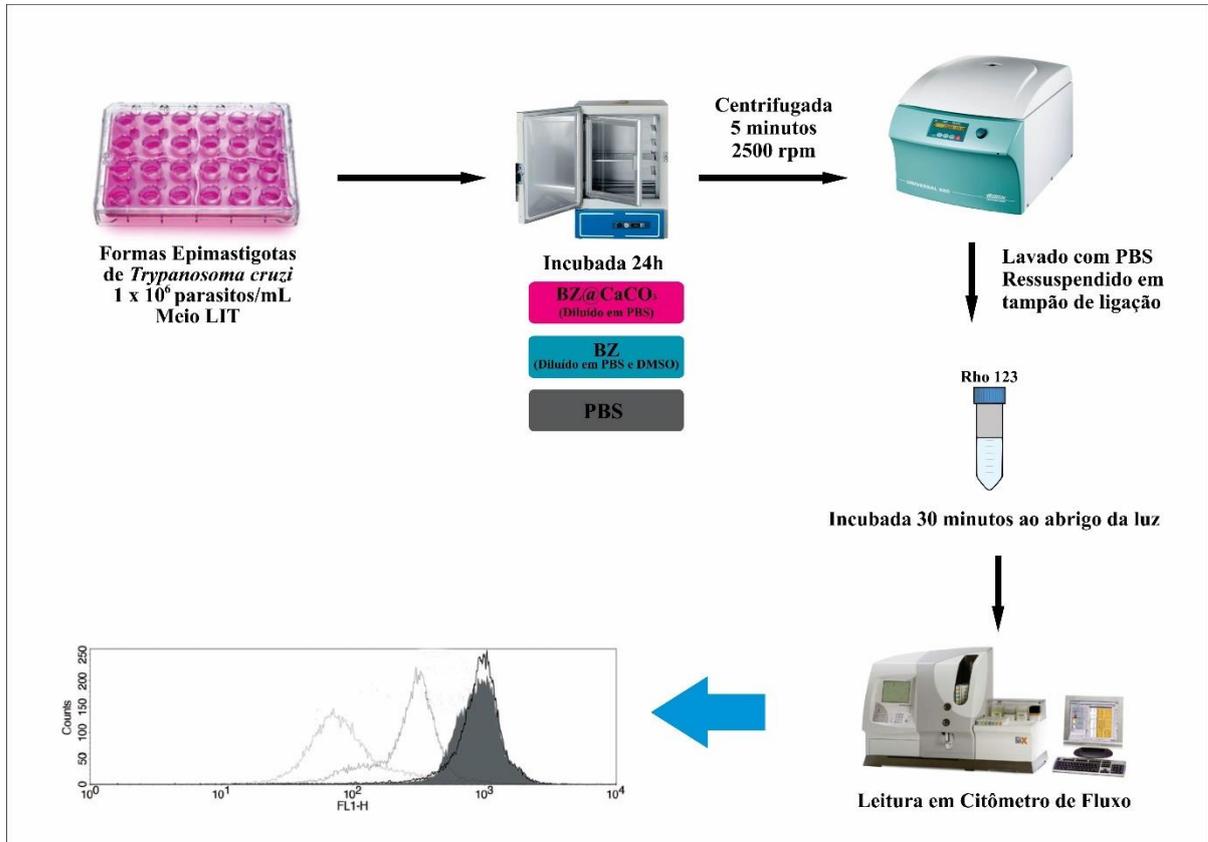
4.9.2 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Com o objetivo de analisar o efeito das drogas em estudo sobre a função mitocondrial, as células foram submetidas à citometria de fluxo utilizando Rodamina 123

(Rho123) como fluorocromo. A Rho123 é um corante catiônico que se acumula no espaço intermembrana de mitocôndrias viáveis, emitindo fluorescência vermelha. Lesão mitocondrial provoca a redução do acúmulo desse corante, que passa para o citoplasma, onde emite fluorescência verde (BARACCA et al., 2003).

As formas epimastigotas foram incubadas com BZ@CaCO₃ (8,72 µg/mL), BZ (56,76 µg/mL) e PBS (controle negativo), por 24h em placas de 24 poços. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2500 rpm/ 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com PBS duas vezes, sendo finalmente ressuspendido em 100 µL do mesmo. As suspensões foram marcadas com Rho 123 10 µg/mL (Sigma®) e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas duas vezes, resuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo, usando no mínimo 10⁴ células por aquisição. O resultado foi observado pela redução da emissão de fluorescência vermelha (FL₂) (ADADE; CHAGAS; SOUTO-PADRÓN, 2012; KESSLER et al., 2013; SANDES et al., 2014). A intensidade de fluorescência foi determinada pela média geométrica da intensidade de fluorescência FL₂. Para comparação, foi feita uma relação entre a intensidade de fluorescência dos grupos teste em relação ao grupo controle. Ensaio mostrado na figura 14.

Figura 14- Representação esquemática do ensaio para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento com BZ@CaCO₃



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.10 Análise estatística

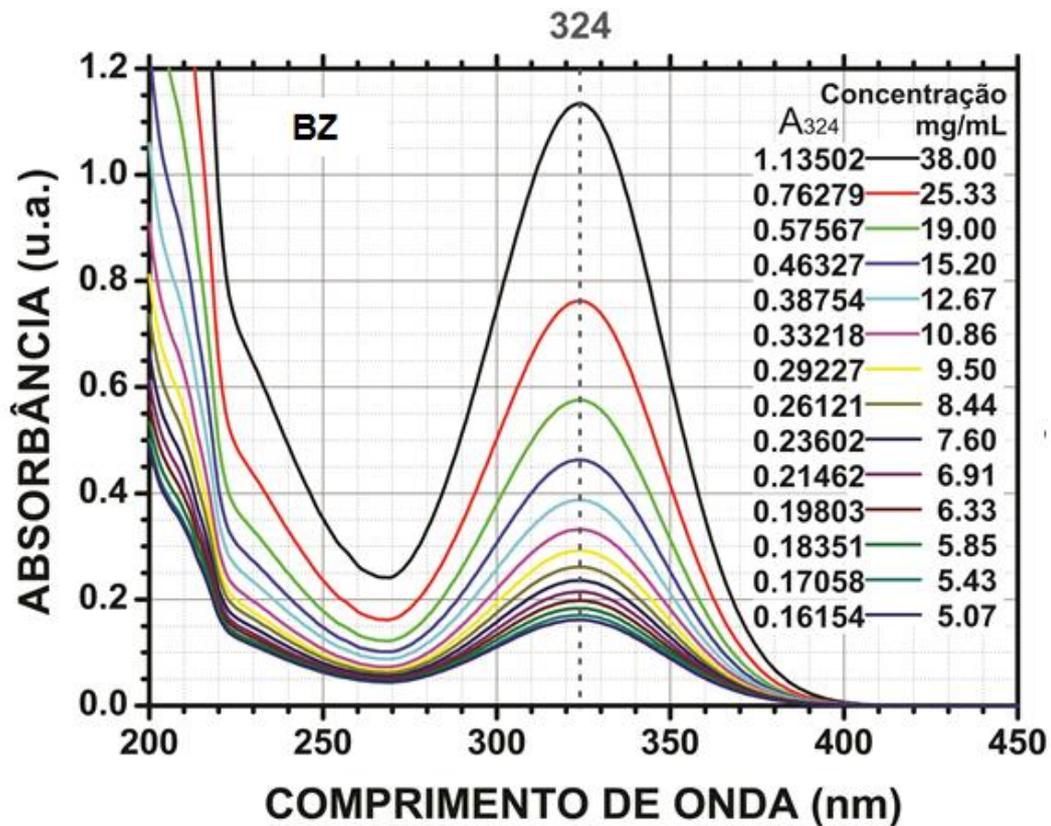
Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. e, para comparação de dados, foi utilizado ANOVA com pós-teste de Dunnet, considerando $p < 0,05$ como critério de significância. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism versão 5.0 e o Microsoft Excel 2010.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do teor de BZ na BZ@CaCO₃

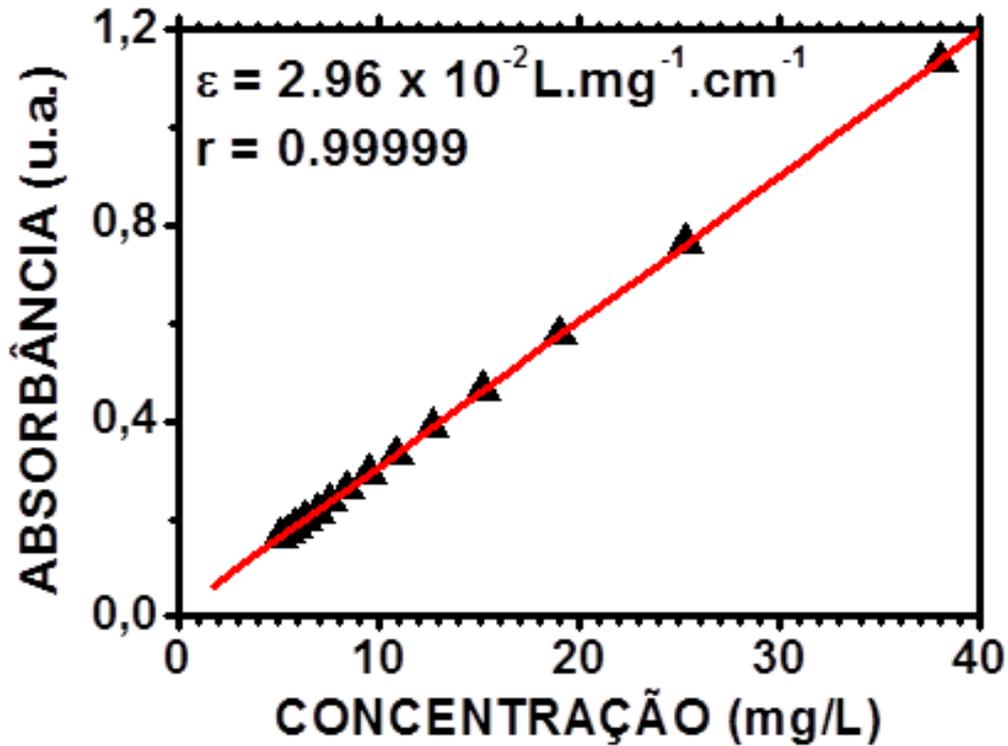
Para determinação da concentração de BZ inserida nas nanopartículas de CaCO₃, soluções padrão de BZ foram submetidas à varredura espectrofotométrica para determinação do pico de absorção de luz na faixa de 200 a 400 nm. Foi observado um pico no comprimento de onda de 324 nm, como demonstrado na figura 15. Dessa forma, a curva padrão de BZ foi determinada nesse comprimento de onda (Figura 16) (BEZERRA *et al.*, 2014).

Figura 15- Espectro de absorção do benzonidazol na região UV (200 a 400 nm), com pico de absorção em 324 nm.



Fonte: BEZERRA *et al.* (2014).

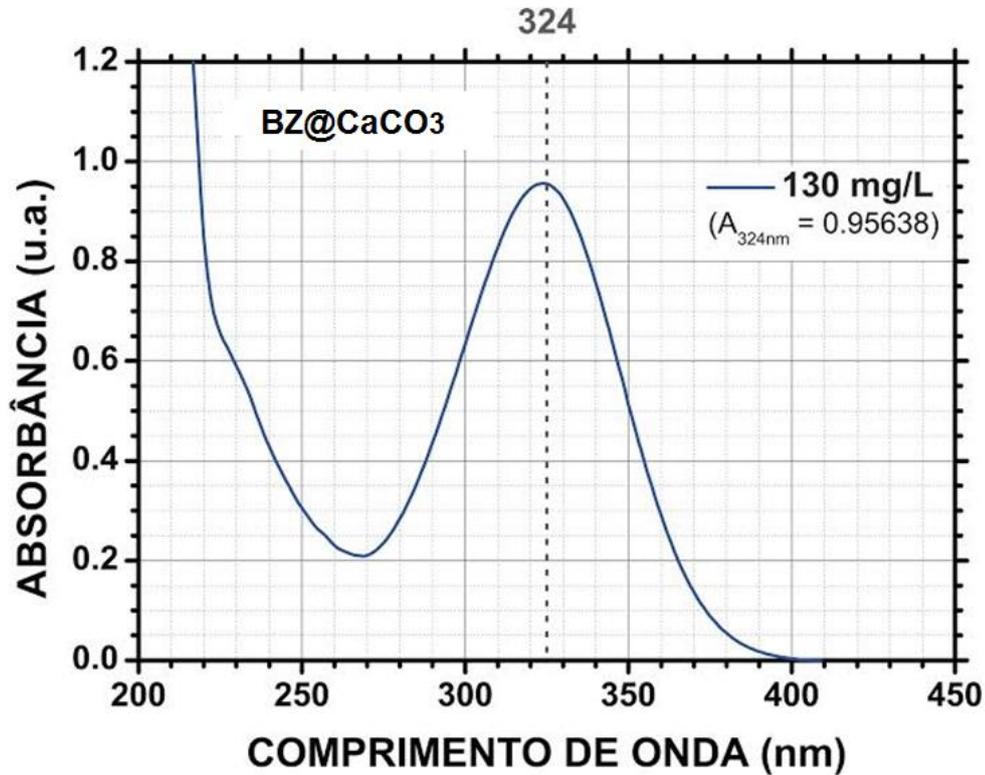
Figura 16- Curva Padrão do benzonidazol determinada por espectrofotometria UV (324nm)



Fonte: BEZERRA *et al.* (2014).

Em seguida, a solução de BZ@CaCO₃ (130 mg/L) foi analisada por espectrofotometria UV. Foi observado um pico de absorção semelhante ao encontrado para a curva padrão de BZ (Figura 17). A concentração de BZ foi obtida após interpolação na curva padrão, tendo sido obtido um teor de aproximadamente 24,85%. A tabela 1 demonstra a concentração de BZ em cada concentração de BZ@CaCO₃ utilizada nos ensaios biológicos.

Figura 17- Espectro de absorção do benzonidazol nanoparticulado (BZ@CaCO₃)



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A determinação espectrofotométrica foi realizada na região UV (200 a 400 nm), com pico no comprimento de onda a 324 nm. Após interpolação na curva padrão de Benzonidazol (BZ), foi calculado um teor de 24,85%.

Tabela 1-Concentração de benzonidazol (BZ) nos grupos de nanopartículas de benzonidazol (BZ@CaCO₃) utilizados nos experimentos *in vitro* considerando o teor de 25%.

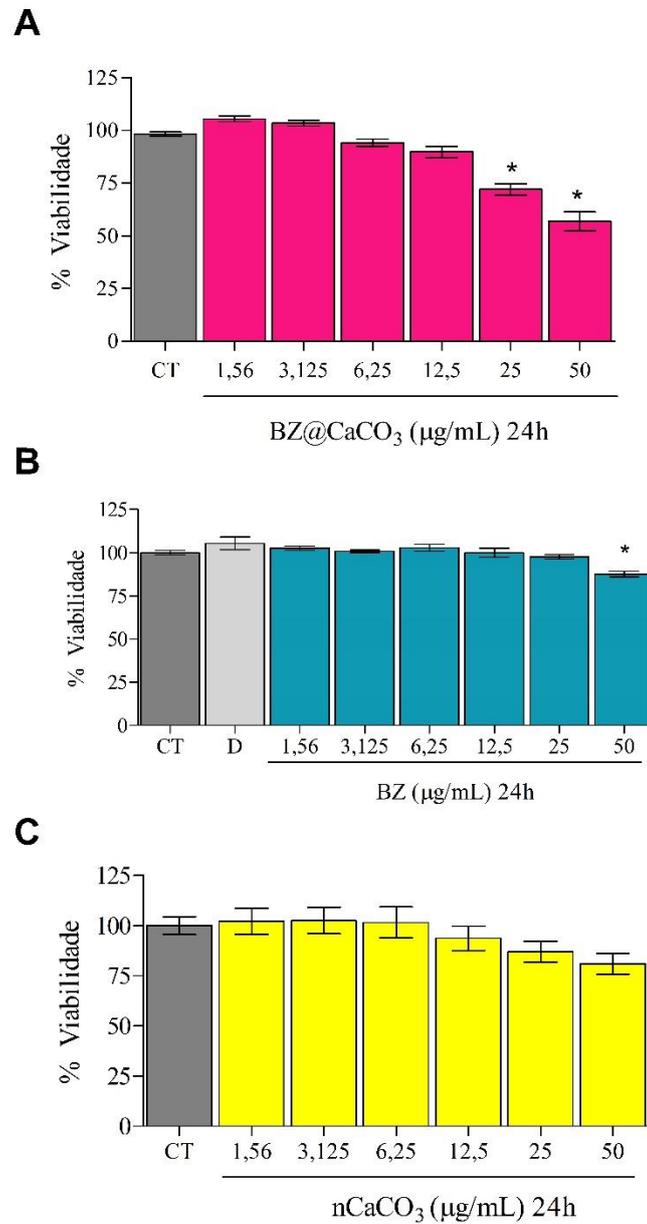
BZ@CaCO ₃ (µg/mL)	BZ (µg/mL)
50	12,43
25	6,22
12,5	3,11
6,25	1,55
3,125	0,78
1,56	0,39

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre a viabilidade de células LLC-MK2

Objetivando investigar o efeito de BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ sobre células hospedeiras, as células LLC-MK2 foram incubadas por 24 h nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 µg/mL, e tiveram sua viabilidade determinada pela leitura espectrofotométrica do ensaio de MTT. O ensaio mostrou que a BZ@CaCO₃ diminuiu a viabilidade celular nas duas maiores concentrações testadas (50 e 25 µg/mL). O BZ diminuiu a viabilidade apenas na concentração de 50 µg/mL. As nanopartículas de carbonato de cálcio livre de fármaco (nCaCO₃) não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações testadas. Dados apresentados na figura 18. A concentração capaz de inibir 50% da cultura (CI₅₀) foi determinada para cada uma das substâncias em estudo, sendo 55 µg/mL para BZ@CaCO₃ e 160 µg/mL para BZ. Os resultados incentivaram a continuidade do trabalho, e possibilitaram a escolha das concentrações utilizadas nos ensaios tripanocidas de formas intracelulares.

Figura 18- Efeito da BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ sobre a viabilidade de células LLC-MK2 após 24h de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (A) BZ@CaCO₃ diminuiu a viabilidade das células LLC-MK2 nas concentrações de 50 e 25 µg/mL; (B) BZ diminuiu a viabilidade das células LLC-MK2 na concentração de 50 µg/mL. A coluna D representa grupo controle tratado com 0,5% de DMSO, utilizado como diluente do BZ; (C) nCaCO₃ não diminuiu a viabilidade das células LLC-MK2. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p< 0,05 vs. grupo controle).

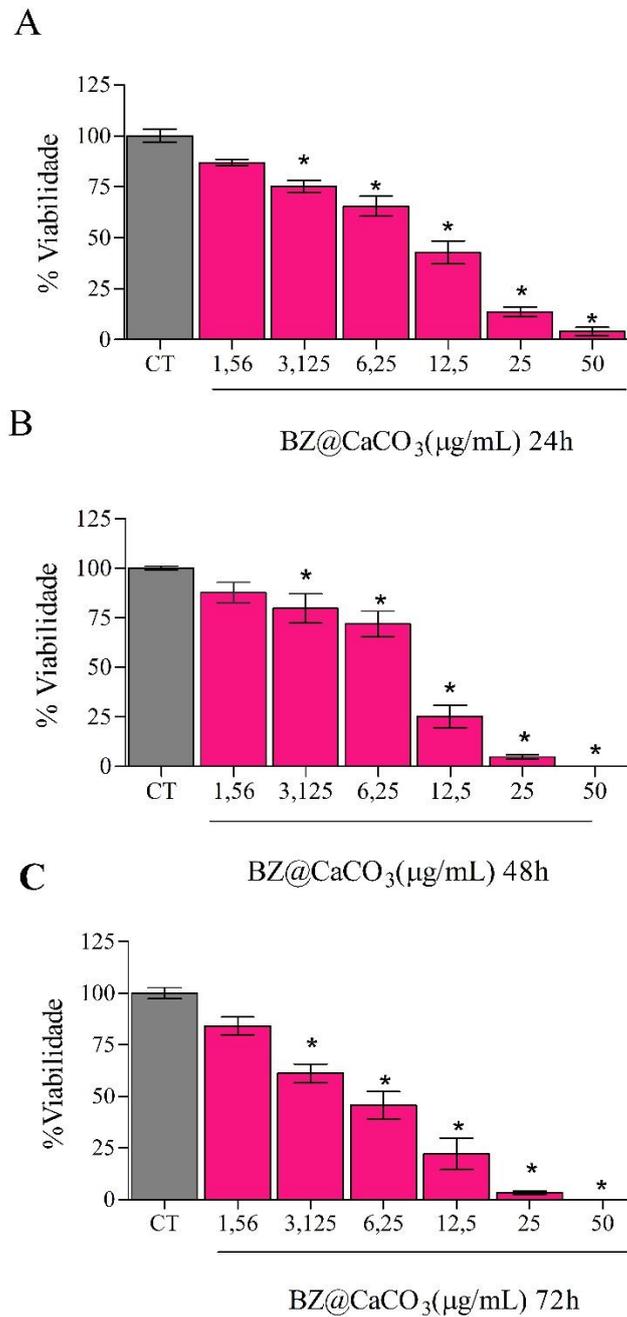
5.3 Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Os ensaios de contagem em câmara de Neubauer para determinação do efeito da Bz@CaCO₃ sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram realizados após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os resultados demonstram que Bz@CaCO₃ apresenta efeito tripanocida sobre as formas epimastigotas, nos três tempos testados, nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 µg/mL. Esse efeito tripanocida é concentração e tempo dependente, chegando a 100% de inibição da viabilidade na maior concentração testada após 48 e 72 horas (Figura 19). As concentrações inibitórias para 50% da cultura de epimastigotas (CI₅₀) são semelhantes nos tempos de 24 e 48 horas, CI_{50/24h} = 8,72 µg/mL e CI_{50/48h} = 8 µg/mL; no entanto, diminui para 4,8 µg/mL após 72 horas de tratamento (tabela 2).

O benzonidazol, fármaco de referência, foi utilizado nos ensaios como controle positivo e demonstrou efeito tripanocida nas maiores concentrações testadas 50; 25; 12,5 µg/mL, para o tempo de 24 horas, e 50; 25; 12,5; 6,25 µg/mL para o tempo de 48 horas. No tempo de 72 horas as menores concentrações testadas também foram capazes de diminuir a viabilidade celular (Figura 20). O BZ apresentou CI_{50/24h} = 56,7 µg/mL e CI_{50/48h} = 15,9 µg/mL, maiores que a da nanopartícula em estudo (tabela 2). A CI₅₀ após 72 horas de tratamento com o BZ é 4,3 µg/mL, valor numericamente semelhante ao valor da CI₅₀ da Bz@CaCO₃ após o mesmo tempo de tratamento. No entanto, sabe-se que o teor de BZ nas nanopartículas equivale à aproximadamente 25%. A análise agrupada para comparação do efeito da BZ@CaCO₃ e BZ sobre as formas epimastigotas nos tempos de 24, 48 e 72h demonstra os resultados descritos (Figura 21).

A nanopartícula de CaCO₃ livre de fármaco (nCaCO₃) foi utilizada como controle negativo nos ensaios e não demonstrou efeito tripanocida nos tempos de 24 e 48 horas, diminuindo a viabilidade apenas no tempo de 72 horas nas três maiores concentrações (50; 25 e 12,5 µg/mL) (Figura 22). Uma vez que não foi observada uma curva concentração-efeito para nCaCO₃, não foi possível calcular CI₅₀. As CI₅₀ obtidas nos ensaios com epimastigotas estão apresentadas na tabela 2. Os dados de viabilidade das formas epimastigotas incubadas com BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ nos três tempos de tratamento estão apresentados na tabela 3.

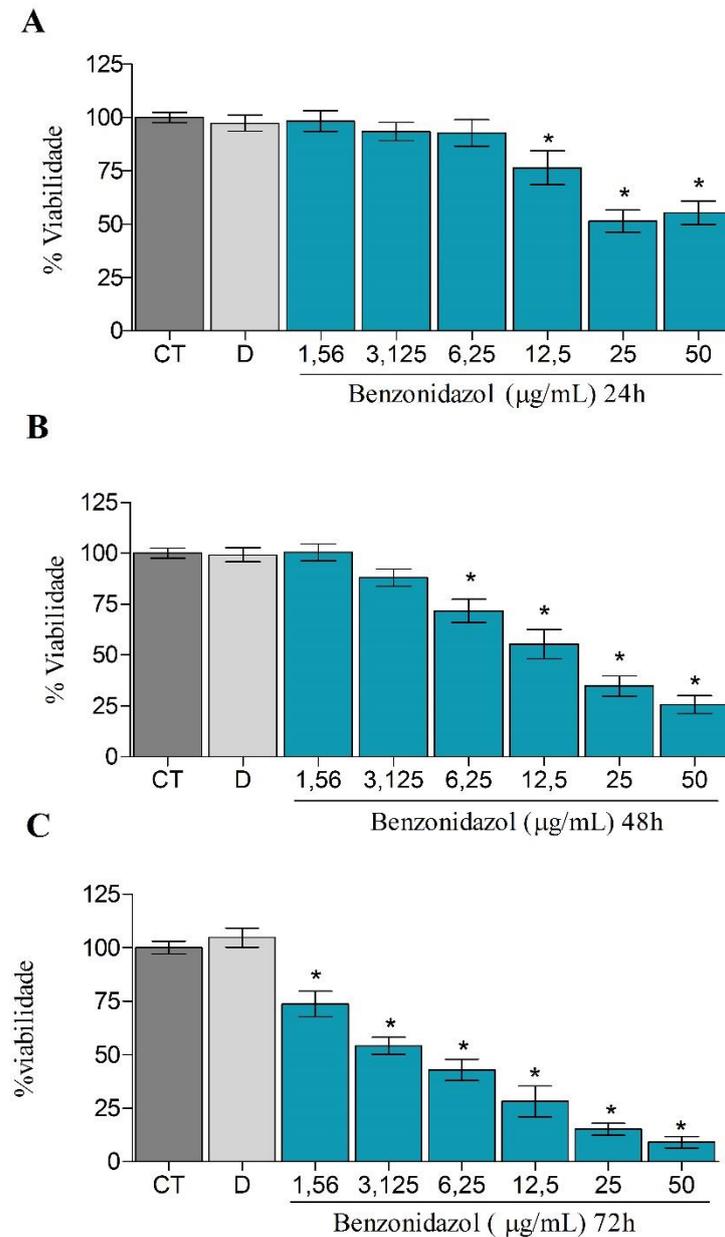
Figura 19- Efeito da BZ@CaCO₃ sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Após 24 (A), 48 (B) e 72h (C) de tratamento, a nanopartícula de benzonidazol (BZ@CaCO₃) diminuiu a viabilidade das formas epimastigotas nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25 3,125 µg/mL. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p< 0,05 vs. grupo controle).

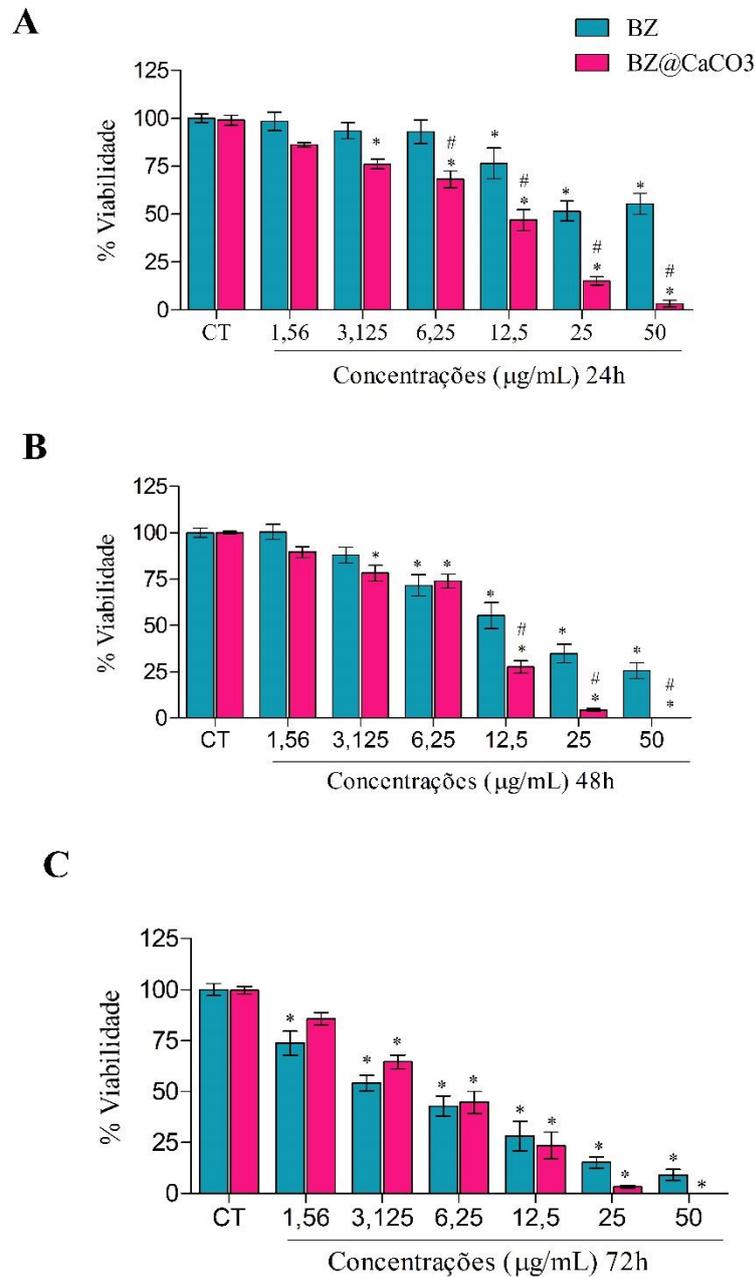
Figura 20- Efeito do BZ sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de tratamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: O benzonidazol (BZ) diminuiu a viabilidade das formas epimastigotas após 24 (50; 25 e 12,5 µg/mL)(A), 48 (50; 25; 12,5 e 6,25 µg/mL)(B) e 72 (todas as concentrações restadas)(C) horas de tratamento. A coluna D representa grupo controle tratado com 0,5% de DMSO, utilizado como diluente do BZ. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

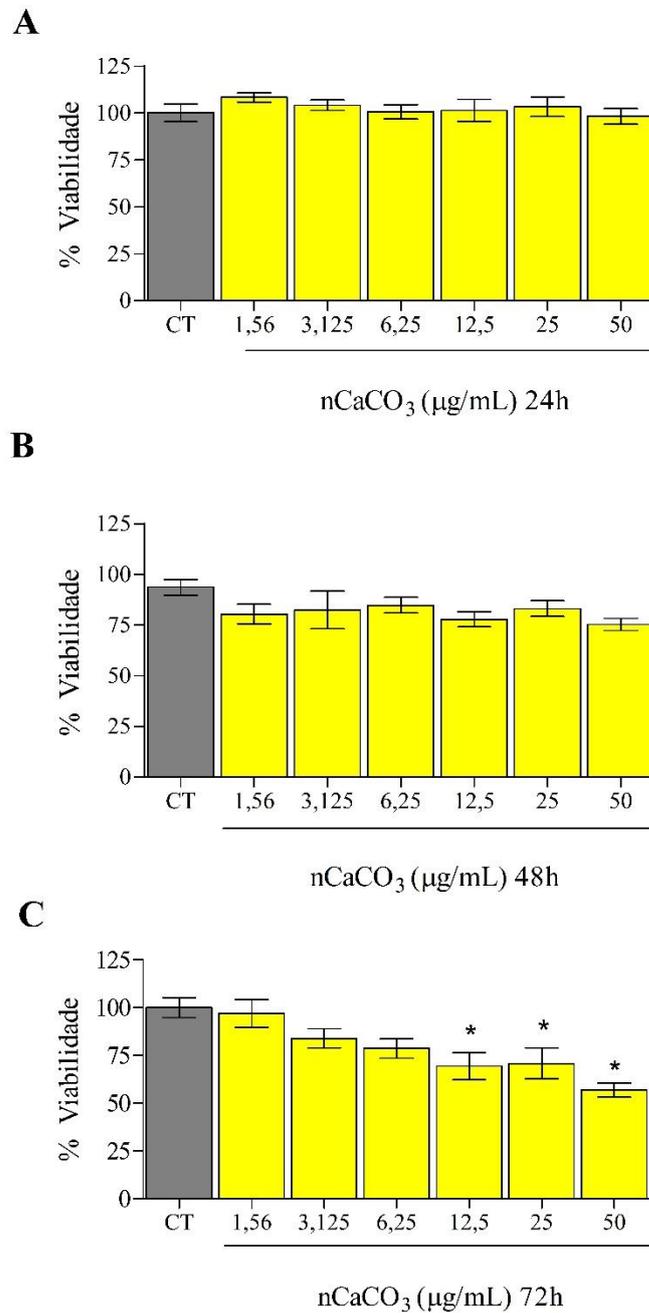
Figura 21- Análise agrupada dos efeitos da BZ@CaCO₃ e BZ na diminuição da viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A nanopartícula de benzonidazol (BZ@CaCO₃) diminuiu a viabilidade das formas epimastigotas de forma significativa quando comparada ao BZ nas quatro maiores concentrações testadas após tratamento de 24h (A); e nas três maiores concentrações testadas após 48h(B). Após 72h (C), diminuiu a viabilidade de forma semelhante ao benzonidazol. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle; # $p < 0,05$ vs. grupo benzonidazol).

Figura 22- Efeito da nCaCO₃ sobre a viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24, 48 e 72 horas de tratamento



Fonte: Elaborada pelo Autor.

Legenda: A nanopartícula livre de fármaco (nCaCO₃) não diminuiu a viabilidade das formas epimastigotas após 24(A) e 48h (B) de tratamento. Após 72h (C), diminuiu a viabilidade nas concentrações de 50; 25 e 12,5 µg/mL. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p< 0,05 vs. grupo controle).

Tabela 2-Concentração inibitória de 50% da cultura de epimastigota

Grupo teste	Concentrações Inibitórias de 50% da cultura de epimastigota ($\mu\text{g/mL}$)		
	24h	48h	72h
BZ@CaCO ₃	8,7	8,0	4,8
BZ	56,7	15,9	4,3
nCaCO ₃	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A tabela mostra as concentrações de nanopartículas de benzonidazol (BZ@CaCO₃), benzonidazol (BZ) e nanopartículas de CaCO₃ (nCaCO₃) capazes de inibir 50% da cultura de epimastigota em 24, 48 e 72 h de tratamento.

Tabela 3-Valores de viabilidade celular de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ por 24, 48 e 72 horas

Tempo de tratamento	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Concentrações		
		BZ@CaCO ₃	BZ	nCaCO ₃
	0	100,0 \pm 3,1	100,0 \pm 2,3	100,00 \pm 4,6
	1,56	86,9 \pm 1,6	97,3 \pm 3,6	108,2 \pm 2,4
	3,125	75,1 \pm 2,9*	98,3 \pm 4,7	104,1 \pm 2,8
24h	6,25	65,4 \pm 4,8*#	93,4 \pm 4,3	100,5 \pm 3,7
	12,5	42,7 \pm 5,6*#	92,8 \pm 6,1*	101,3 \pm 5,8
	25	13,6 \pm 2,3*#	76,4 \pm 7,9*	103,3 \pm 5,2
	50	4,0 \pm 2,03*#	51,5 \pm 5,1*	98,21 \pm 4,1

Continua

Tabela 4-Valores de viabilidade celular de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ por 24, 48 e 72 horas

Tempo de tratamento	Concentrações			
	(µg/mL)	BZ@CaCO ₃	BZ	nCaCO ₃
48h	0	100,0 ± 1,1	100,0 ± 2,5	93,58 ± 3,9
	1,56	87,8 ± 5,2	100,4 ± 4,1	80,38 ± 4,8
	3,125	79,6 ± 7,4*	87,9 ± 4,2	82,48 ± 9,0
	6,25	71,8 ± 6,5*	71,6 ± 5,7*	84,73 ± 3,8
	12,5	25,2 ± 5,6*#	55,3 ± 7,1*	77,7 ± 3,6
	25	4,8 ± 1,1*#	34,8 ± 4,9*	83,04 ± 3,8
	50	0,0± 0,0*#	25,5 ± 4,3*	75,26 ± 2,9
72h	0	100,0 ± 2,7	100,0 ± 3,0	100,0 ± 5,2
	1,56	84,1 ± 4,3	73,7 ± 5,9*	96,9 ± 7,3
	3,125	61,1 ± 4,6*	54,2 ± 3,9*	83,9 ± 5,0
	6,25	45,6 ± 6,5*	42,8 ± 5,0*	78,5 ± 5,0
	12,5	22,1 ± 7,7*	28,1 ± 7,2*	69,3 ± 7,1*
	25	3,3 ± 0,8 *	15,1 ± 2,8*	70,7 ± 8,2*
	50	0,0± 0,0*	9,0 ± 2,6*	56,7 ± 3,6*

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Apresentados aqui os valores numéricos relacionados ao percentual de viabilidade nos três tempos de tratamento. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (E.P.M.) e analisados com ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p<0,05 vs. grupo controle; #p<0,05 vs. grupo benzonidazol).

5.4 Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

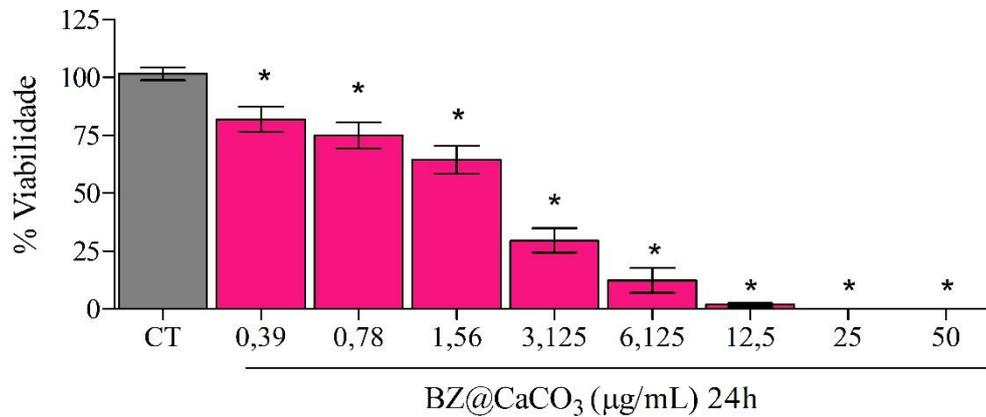
As formas tripomastigotas, obtidas a partir da eclosão de células LLC-MK2, foram incubadas com diferentes concentrações de BZ@CaCO₃, BZ e nCaCO₃ por 24 horas para avaliação do efeito tripanocida pelo método de contagem em câmara de Neubauer. Os resultados demonstraram que BZ@CaCO₃ diminuiu a viabilidade dos tripomastigotas em todas as concentrações testadas, sendo elas 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 µg/mL, chegando a 100 % de inibição nas concentrações de 50 e 25 µg/mL (Figura 23).

O benzonidazol diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas, após tratamento de 24 horas, nas concentrações 50, 25 e 12,5 µg/mL (Figura 24). O efeito tripanocida de BZ@CaCO₃ é maior do que o efeito do BZ. Quando comparados, BZ@CaCO₃ diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas de forma significativamente maior que o BZ até mesmo nas menores concentrações (Figura 25). A nCaCO₃ diminuiu a viabilidade celular apenas nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL (Figura 26).

A BZ@CaCO₃ apresentou concentração inibitória de 50% da cultura das formas tripomastigotas de 1,8 µg/mL, enquanto a do benzonidazol é foi 67 µg/mL. Tendo em vista o resultado do doseamento, apenas 25% desse valor da concentração de BZ@CaCO₃ se refere ao fármaco. Sendo assim, a concentração efetiva de BZ presente na nanopartícula capaz de inibir 50% do crescimento de tripomastigotas equivale a 0,45 µg/mL.

Utilizando os valores de CI₅₀ da BZ@CaCO₃ e BZ em células LLC-MK2 e tripomastigotas, foram calculados os índices de seletividade, que representa a seletividade de cada uma das substâncias ao parasita em relação à célula de mamífero. O índice para BZ@CaCO₃ foi 30,5 e para BZ 2,38, como mostrado na tabela 4.

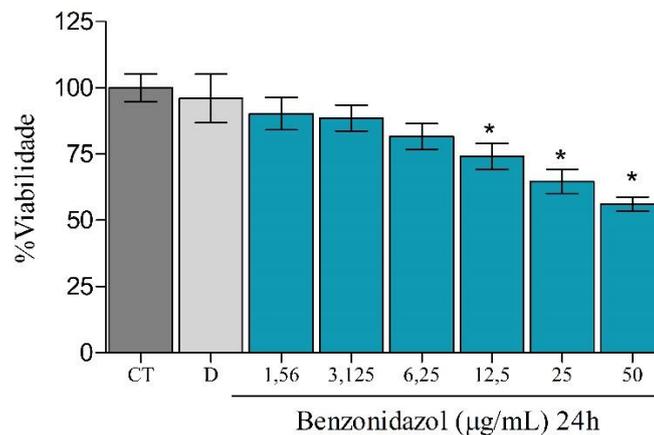
Figura 23- Efeito da BZ@CaCO₃ sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Após 24 h de tratamento, a BZ@CaCO₃ diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas em todas as concentrações testadas, inibindo 100% a cultura nas concentrações de 50 e 25 µg/mL. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p<0,05 vs. grupo controle).

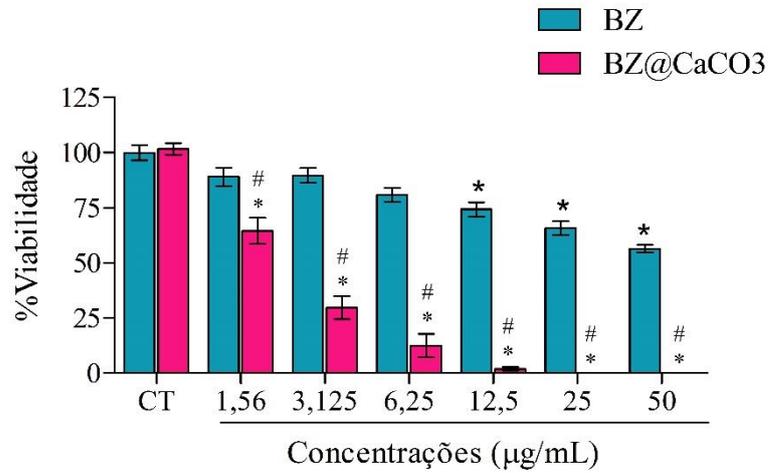
Figura 24- Efeito do BZ sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Após 24 h de tratamento, o BZ diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL. A coluna D representa grupo controle tratado com 0,5% de DMSO, utilizado como diluente do BZ. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p<0,05 vs. grupo controle).

Figura 25- Análise agrupada dos efeitos da BZ@CaCO₃ e BZ na diminuição da viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Após 24 h de tratamento, a nanopartícula de benzonidazol (BZ@CaCO₃) diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas de maneira significativamente maior do que o benzonidazol (BZ) em todas as concentrações testadas. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p<0,05 vs. grupo controle; #p<0,05 vs. grupo benzonidazol).

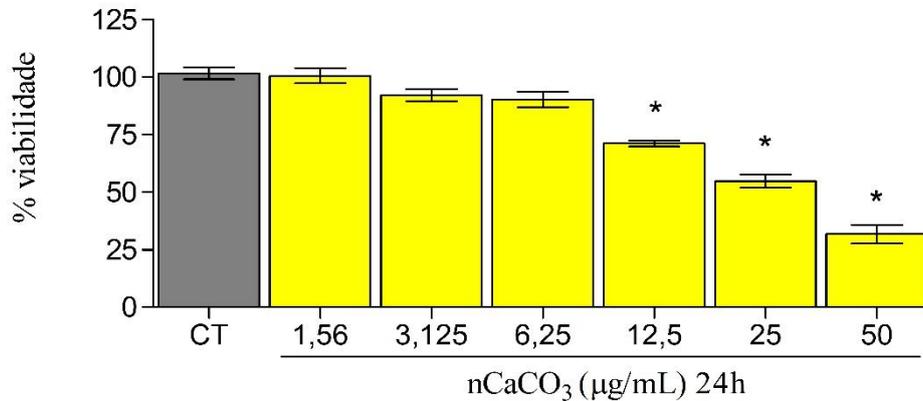
Tabela 5- Concentração inibitória de 50% da cultura (CI₅₀) de tripomastigotas, LLC-MK2 e índice de seletividade.

	CI ₅₀ em LLC-MK2 (µg/mL)	CI ₅₀ em Tripomastigota (µg/mL)	Índice de Seletividade
BZ@CaCO ₃	55	1,8	30,5
BZ	160	67	2,38

Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: A tabela mostra as concentrações de nanopartículas de benzonidazol (BZ@CaCO₃), benzonidazol (BZ) capazes de inibir 50% da cultura de tripomastigota e LLC-MK2 em 24 h de tratamento. A razão desses valores resulta no índice de seletividade.

Figura 26-Efeito da nCaCO₃ sobre a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento



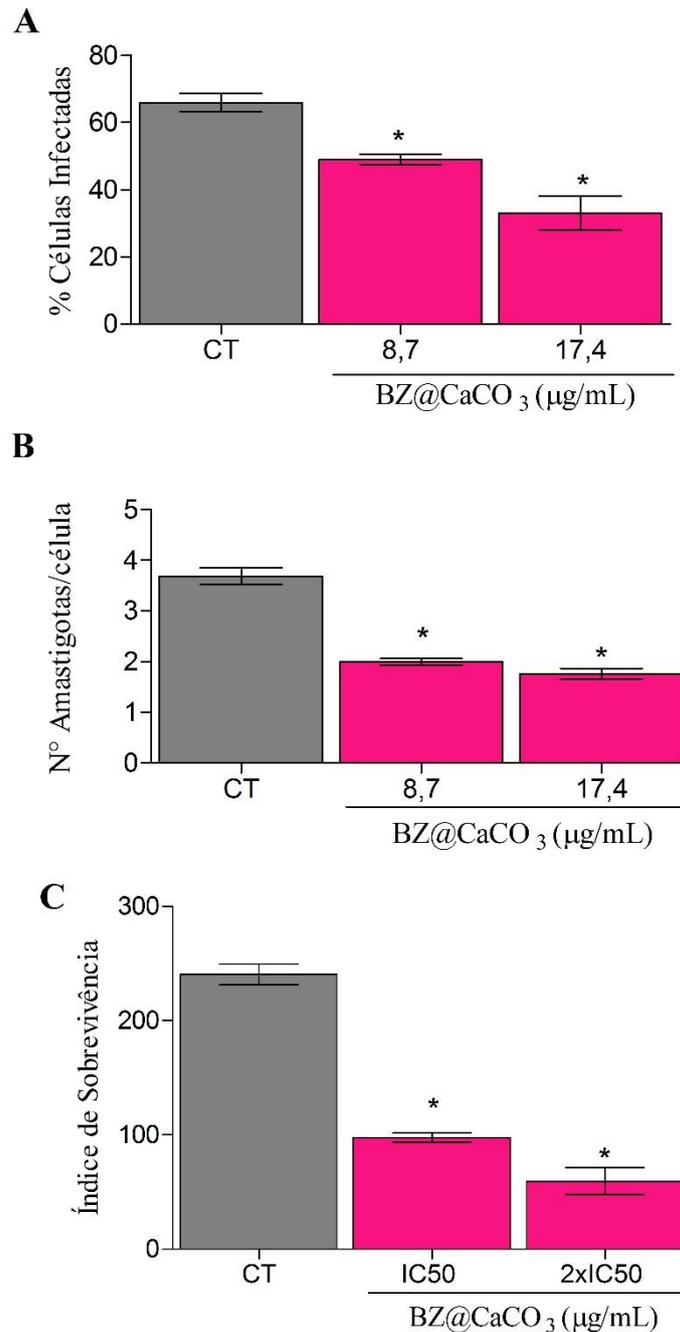
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Após 24 h de tratamento, a nCaCO₃ diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p < 0,05 vs. grupo controle).

5.5 Determinação do efeito citotóxico da BZ@CaCO₃ sobre formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Para investigar ainda mais a o efeito da BZ@CaCO₃ sobre *Trypanosoma cruzi*, foi realizado ensaio com a forma intracelular do parasito, utilizando concentrações não tóxicas para as células hospedeiras LLC-MK2. A análise do ensaio foi feita por contagem da lâmina fixada e corada em microscópio óptico. As concentrações de BZ@CaCO₃ utilizadas foram 8,7 e 17,4 µg/mL, correspondentes à CI₅₀ e ao dobro da CI₅₀ de BZ@CaCO₃ sobre as formas epimastigotas em 24h. Essas concentrações foram escolhidas por não apresentarem toxicidade para as células LLC-MK2 e demonstrarem efeito tripanocida sobre as formas epimastigotas. Os resultados mostram que o tratamento com a concentração de 8,7 µg/mL resultou na diminuição de 25% do percentual de células infectadas e na redução de 46% do número de amastigotas por células. O tratamento com 17,4 µg/mL reduziu o percentual de células infectadas e o número de amastigotas por célula em aproximadamente 50% (Figura 27). O efeito tripanocida também foi comprovado pelo índice de sobrevivência das formas amastigotas, como mostrado na figura 27.

Figura 27- Efeito da BZ@CaCO₃ sobre formas amastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

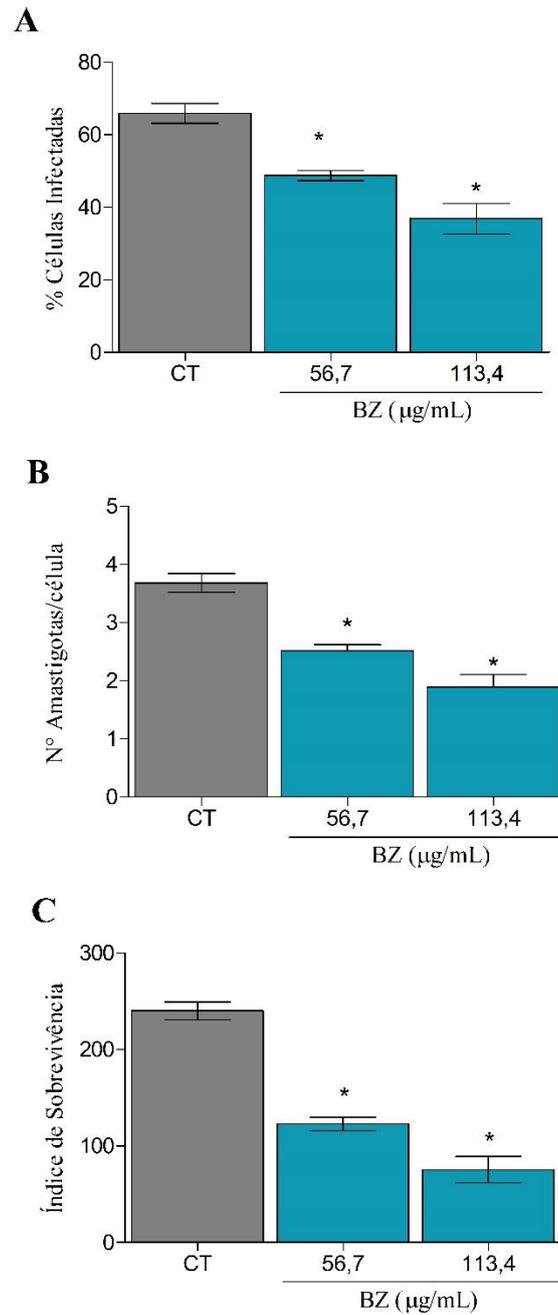
Legenda: (A) BZ@CaCO₃ diminuiu o percentual de células infectadas nas duas concentrações testadas; (B) Tratamento com BZ@CaCO₃ nas duas concentrações reduziu o número de amastigotas por células em aproximadamente 50%; (C) BZ@CaCO₃ reduziu o índice de sobrevivência dos amastigotas em duas concentrações testadas. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular ± erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p< 0,05 vs. grupo controle).

As células LLC-MK2 infectadas com *T. cruzi* foram também incubadas com benzonidazol por 24 horas com as concentrações inibitórias de 50% da cultura de epimastigota

(56,7µg/mL) e com dobro dela (113,4 µg/mL) para uma análise comparativa com a nanopartícula em estudo. Os ensaios mostraram que o tratamento com 56,7 µg/mL reduziu 26% do percentual de células infectadas e aproximadamente 32% do número de amastigotas por células. O tratamento com 113,4 µg/mL resultou na diminuição de 44% no percentual de células infectadas e de 50% no número de amastigotas por célula (Figura 28). O índice de sobrevivência foi determinado como na Figura 20.

A análise dos resultados aponta efeito semelhante do BZ e das BZ@CaCO₃ na inibição da infecção de células LLC-MK2 por *T. cruzi*, sugerindo que, mesmo em concentrações bem menores, BZ@CaCO₃ apresenta efeito anti-amastigota comparável ao observado para BZ (Figura 29).

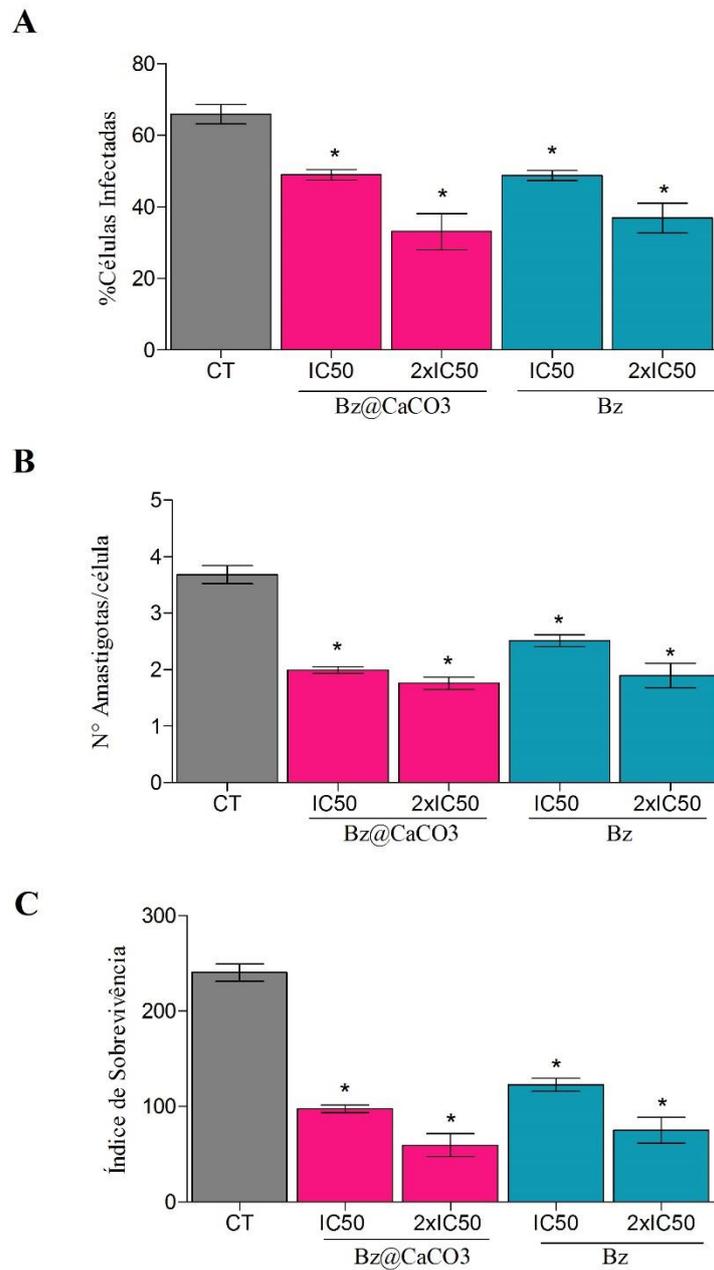
Figura 28- Efeito do BZ sobre formas amastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: (A) O tratamento com BZ nas concentrações de 56,7 e 113,4 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu o percentual de células infectadas em 26% e 44% respectivamente.; (B) BZ nas concentrações de 56,7 e 113,4 $\mu\text{g/mL}$ reduziu o número de amastigotas por célula em 32 e 50 % respectivamente.; (C) BZ reduziu o índice de sobrevivência dos amastigotas em duas concentrações testadas. CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm erro padrão médio (E.P.M.) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

Figura 29- Análise agrupada do efeito da BZ@CaCO₃ e do BZ sobre formas amastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento



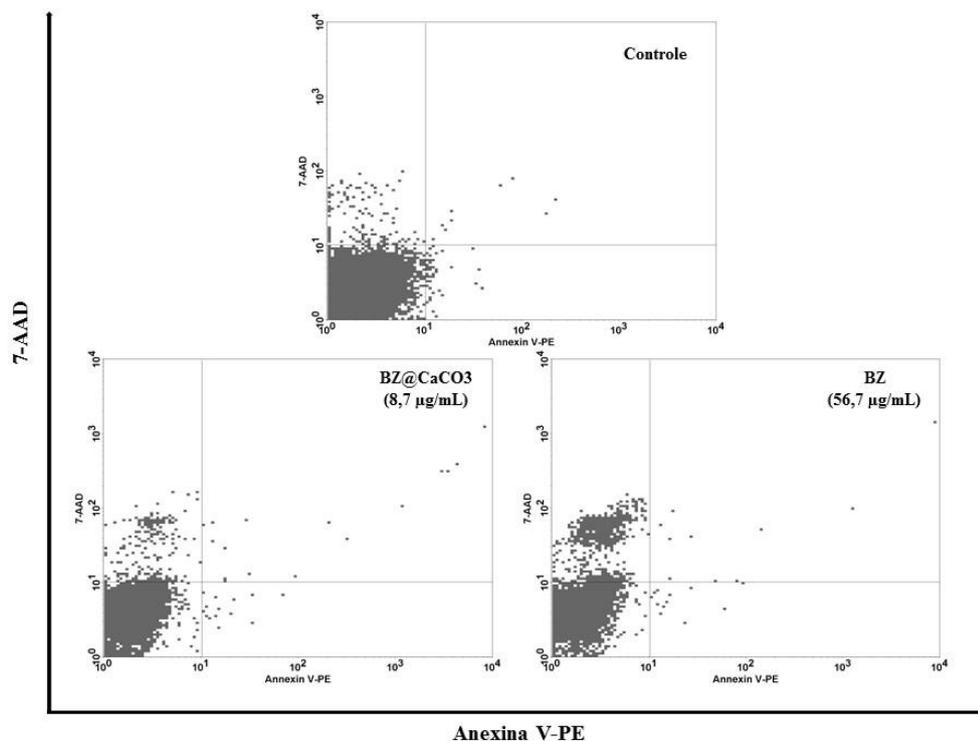
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: BZ@CaCO₃ e BZ reduziram de forma semelhante o percentual de células infectadas (A); o número de amastigotas por célula infectada (B); e o índice de sobrevivência (C). CT= grupo controle, células tratadas com PBS. Os dados foram expressos como percentual de viabilidade celular \pm erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (* $p < 0,05$ vs. grupo controle).

5.6 Determinação do mecanismo de morte celular

Esse ensaio foi realizado objetivando investigar alterações celulares indicativas de necrose e/ou apoptose em culturas de parasitos tratados com BZ@CaCO₃ (8,7 µg/mL) e BZ (56,7 µg/mL). Culturas da forma epimastigota, após 24h de tratamento com a CI₅₀ em 24 horas foram marcadas com 7-amino actinomicina D (7-AAD) e anexina V- ficoeritrina (Anexina V-PE) e analisadas por citometria de fluxo. Foi observado que os parasitos tratados com BZ@CaCO₃ e BZ apresentaram aumento significativo na marcação com 7-AAD, observado pelo aparecimento de população localizada no quadrante esquerdo superior (Figura 30). Isso sugere a ocorrência de eventos necróticos, como mostrado na figura 31, para as duas substâncias.

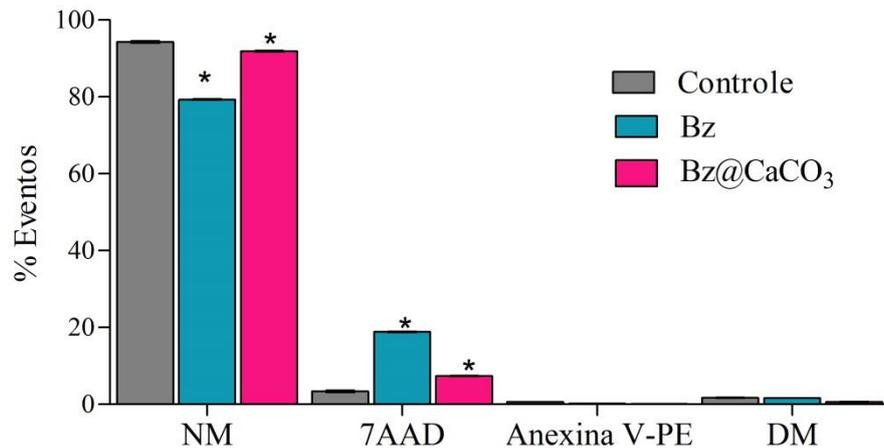
Figura 30-Gráficos Density-plot de distribuição das populações celulares submetidas ao ensaio de investigação de mecanismo de morte celular por citometria de fluxo



Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular induzida na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI₅₀ de BZ@CaCO₃ e BZ.

Figura 31- Mecanismo de morte celular induzido após 24 horas de tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com BZ@CaCO₃ e BZ



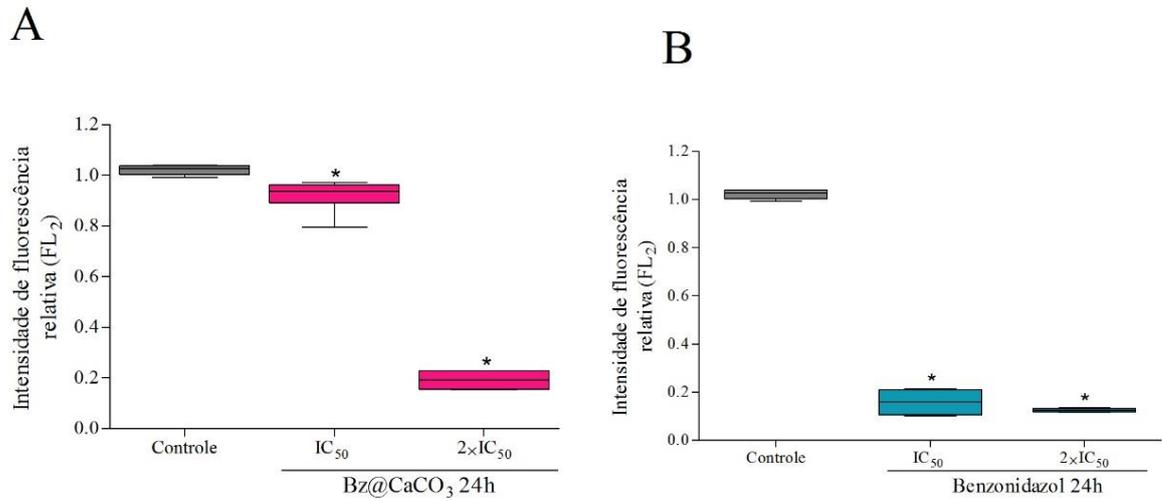
Fonte: Elaborada pelo autor.

Legenda: Avaliação do mecanismo de morte celular induzida na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com CI₅₀ de BZ@CaCO₃ e BZ. (NM= não marcado; 7-AAD= marcado com 7-amino actinomicina D; Anexina V-PE= marcados com anexina V- ficoeritrina; DM= marcado com 7-AAD e Anexina V-PE). Os dados foram expressos como percentual de eventos \pm erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (*p< 0,05 vs. grupo controle).

5.7 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O ensaio de citometria de fluxo utilizando Rodamina 123 (Rho123) teve como objetivo avaliar a função mitocondrial das formas epimastigotas tratadas com CI₅₀ e o dobro da CI₅₀ da BZ@CaCO₃ (8,7 e 17,4 $\mu\text{g/mL}$) e BZ (56,7 e 113,4 $\mu\text{g/mL}$). Após 24 horas de incubação, as culturas foram marcadas com Rho 123 e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados mostram diminuição da intensidade de fluorescência nas culturas tratadas com BZ@CaCO₃ e BZ, indicando despolarização mitocondrial (Figuras 32 e 33).

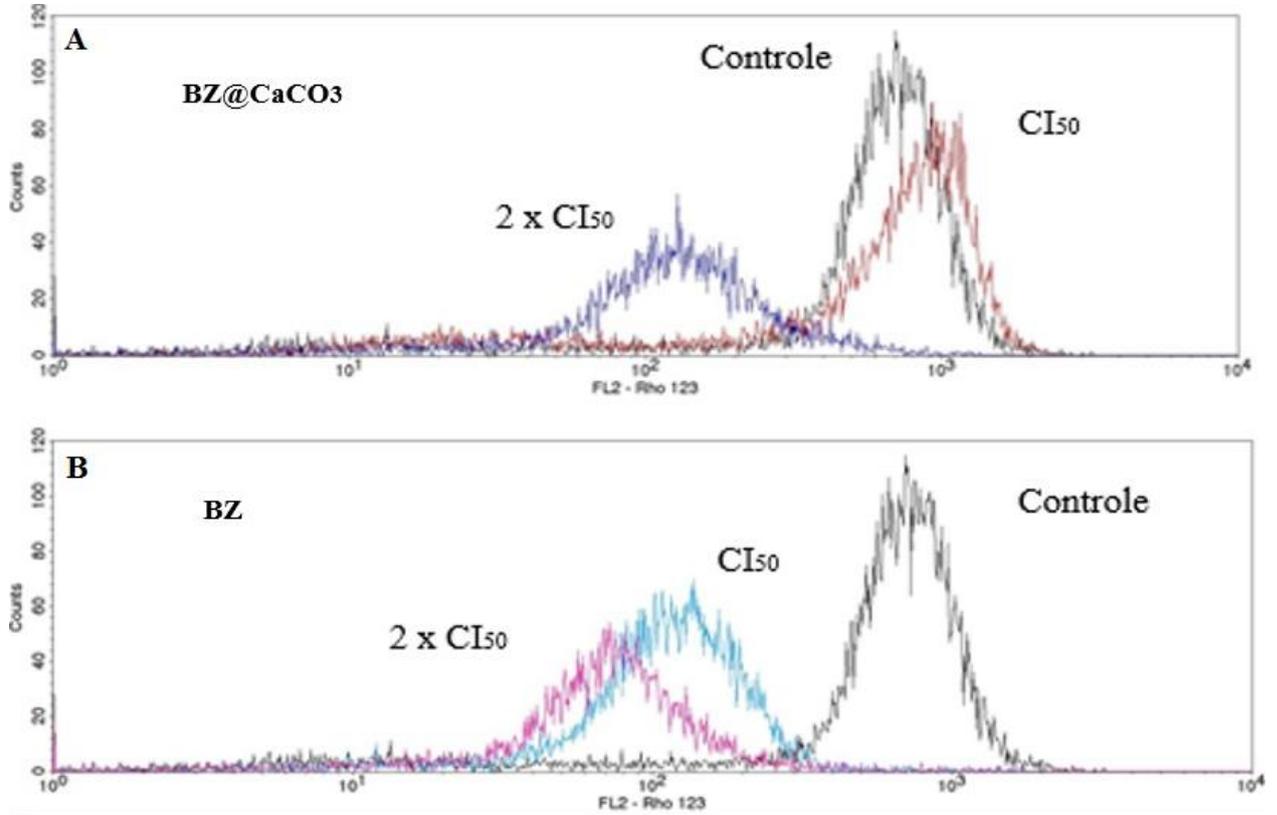
Figura 32- - Efeito da BZ@CaCO₃ e BZ sobre a intensidade de fluorescência da Rodamina 123 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Gráfico mostra diminuição da intensidade de fluorescência da Rodamina 123 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento com (A) BZ@CaCO₃ nas concentrações de 8,7 e 17,4 µg/mL (CI₅₀ e 2 x CI₅₀) e (B) BZ nas concentrações de 56,7 e 113,4 µg/mL (CI₅₀ e 2 x CI₅₀). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência ± erro padrão médio (EPM) de três experimentos independentes e analisados estatisticamente pelo método ANOVA e pós-teste de Dunnet (p < 0,05 vs. grupo controle).

Figura 33- Histogramas do efeito da BZ@CaCO₃ e BZ sobre a intensidade de fluorescência da Rodamina 123 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os histogramas mostram a diminuição da intensidade de fluorescência da Rodamina 123 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento com (A) BZ@CaCO₃ nas concentrações de 8,7 e 17,4 µg/mL (CI₅₀ e 2 x CI₅₀) e (B) BZ nas concentrações de 56,7 e 113,4 µg/mL (CI₅₀ e 2 x CI₅₀).

6 DISCUSSÃO

A doença de Chagas é um relevante problema de saúde pública que causa impacto social e econômico nas populações afetadas. Antes restrita a região Latino Americana, hoje tem número crescente de casos na América do Norte e Europa (DNDI, 2015). A parasitose acomete cerca de sete milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade (OMS, 2015; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Um dos poucos fármacos disponíveis para o tratamento dessa doença é o benzonidazol, fármaco desenvolvido há mais de quarenta anos, que apresenta eficácia limitada e alta toxicidade, estando associado a severos efeitos adversos (OLIVEIRA et al., 2008; SOARES et al., 2011). Existe assim uma necessidade na busca de estratégias terapêuticas que promovam maior seletividade sobre os parasitos sem causar tantas complicações para o hospedeiro.

Nesse contexto, o transporte de fármacos por meio de nanopartículas tem atraído o interesse na comunidade científica por, em diversos trabalhos experimentais e clínicos, estar demonstrando eficiência quanto à liberação controlada e direcionada de moléculas farmacológicas (HIGAKI et al., 2006; ZHAO et al., 2010)

A utilização de nanossistemas de liberação de fármacos é de grande valia no tratamento da doença de Chagas, pois esses sistemas são capazes de penetrar na célula, tendo em vista seu tamanho nanométrico, carreando um volume pequeno e efetivo de fármaco. A facilidade de transposição da membrana celular, aliada à liberação controlada da molécula terapêutica, diminui as concentrações plasmáticas do fármaco e conseqüentemente reduz sua toxicidade, além de permitir melhores resultados citotóxicos sobre a forma amastigota (BRANQUINHO et al., 2014; ROMERO; MORILLA, 2010).

O presente estudo teve como objetivo investigar a ação antiparasitária da nanopartícula de benzonidazol em carbonato de cálcio sobre as três formas do parasito *Trypanosoma cruzi* cepa Y, avaliando o possível mecanismo de morte, e comparando ao efeito do fármaco livre.

Escolheu-se trabalhar com nanopartículas de carbonato de cálcio, pois esse mineral apresenta lenta biodegradabilidade, boa biocompatibilidade e baixa toxicidade (CHEANG et al., 2010; FUJIWARA et al., 2008; QIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2015). Além disso, o carbonato apresenta baixo custo e tem sido utilizado com êxito como carreador de fármacos e biomacromoléculas (QIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2015; ZHAO et al., 2010). O teor do

benzonidazol na nanopartícula de carbonato de cálcio é de cerca de 25% e foi determinado por espectrofotometria UV.

Os ensaios *in vitro* com as formas epimastigotas evidenciaram que a BZ@CaCO₃ possui efeito tripanocida mais potente do que o BZ. A nanopartícula contendo o fármaco inibiu o crescimento de epimastigotas nos três tempos de tratamento de forma consideravelmente maior quando comparada ao benzonidazol. As CI₅₀ obtidas para a substância em estudo confirmam esse dado, tendo sido a CI₅₀ de 24 horas, aproximadamente, sete vezes menor que a do benzonidazol livre, e a CI₅₀ de 48 horas, a metade. Esses resultados evidenciam uma ação inibitória mais rápida da nanopartícula em relação ao benzonidazol. O efeito tripanocida do benzonidazol aumenta com o tempo de tratamento, assim como o da BZ@CaCO₃. Entretanto, apesar de as CI₅₀ parecerem se igualar no tempo de 72 horas (BZ@CaCO₃ CI₅₀ = 4,8 e BZ CI₅₀ = 4,3), é importante ressaltar que a concentração real de BZ na nanopartícula é aproximadamente ¼ do seu peso, conforme descrito nesse estudo. Isso implica que na forma nanoparticulada, foi necessária uma quantidade quatro vezes menor de BZ para se obter 50% de citotoxicidade após 72 horas de tratamento.

A nanopartícula de carbonato de cálcio livre de fármaco não apresentou efeito tripanocida sobre formas epimastigotas nos tempos de 24 e 48 horas, tendo inibido a cultura apenas no tempo de 72 horas. Esse resultado pode estar associado a alterações físico-químicas no meio de cultura, uma vez que no referido tempo de tratamento foi observado depósito de carbonato nas culturas tratadas com concentrações mais altas (dados não mostrados). O efeito tripanocida da BZ@CaCO₃ sobre formas epimastigotas não pode ser atribuído ao seu teor de carbonato de cálcio, pois apresentou inibição significativa já nos primeiros tempos de tratamento, quando a nanopartícula vazia não demonstrou nenhum efeito inibitório. E ainda no tempo de 72 horas, BZ@CaCO₃ foi capaz de inibir a cultura com concentrações ainda mais baixas, nas quais não foi observado efeito de nCaCO₃ sobre epimastigotas.

Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos, como no estudo *in vitro* realizado por Kroubi (2010) em que nanopartículas catiônicas de diminazeno testadas em *Trypanosoma brucei* apresentaram efeito tripanocida mais acentuado que o fármaco livre, sendo esse efeito concentração e tempo dependente. A análise das culturas foi feita após 12 e 24 horas de tratamento. Em uma mesma concentração, a viabilidade parasitária no tempo de 24 horas foi até 70% menor do que no tempo de 12 horas. Anos depois, Manuja (2014) mostrou que nanopartículas de sulfato de quinapiramina em alginato de sódio foi capaz de inibir 100% a cultura de *Trypanosoma evansi* em 4 horas de tratamento, enquanto o fármaco livre precisou

de 6 horas e concentração 41 vezes maior para atingir a mesma inibição. Delavari (2014) também constatou que o efeito leishmanicida de nanopartículas de óxido de zinco aumentava significativamente com o tempo de tratamento e concentração.

As formas tripomastigotas foram ainda mais suscetíveis ao tratamento com BZ@CaCO₃ do que as formas epimastigotas. A BZ@CaCO₃ diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas de maneira significativamente maior que o benzonidazol até mesmo nas menores concentrações. A CI₅₀ da nanopartícula de benzonidazol é 37 vezes menor do que a CI₅₀ do fármaco livre. Esse efeito é bastante relevante, por se tratar da forma infectante do *T. cruzi*.

Em trabalho semelhante, pentamidina livre e nanopartículas de pentamidina em polietilínoglicol e quitosana revestidas com anticorpo foram testados sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* e, assim como no presente estudo, a nanopartícula apresentou maior atividade tripanocida que o fármaco livre, evidenciada pelo valor de CI₅₀ 14 vezes menor (UNCITI-BROCETA *et al.*, 2015). Anteriormente, Sánchez (2002) já havia comprovado através de teste *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* que o nifurtimox encapsulado em nanopartículas de etil-cianoacrilato apresenta atividade tripanocida mais significativa do que o nifurtimox livre. Estudos *in vivo* têm demonstrado que as nanopartículas também têm maior efeito redutor da parasitemia que a mesma substância livre (CARNEIRO *et al.*, 2014; UNCITI-BROCETA *et al.*, 2015).

As nCaCO₃ diminuíram a viabilidade das formas tripomastigotas apenas nas maiores concentrações testadas. Dessa forma, BZ@CaCO₃ demonstrou efeito mais pronunciado sobre tripomastigotas do que nCaCO₃. Esse resultado indica que, apesar de a estrutura da nanopartícula causar efeito sobre tripomastigotas, o principal efeito observado em BZ@CaCO₃ é atribuído ao benzonidazol presente nele.

A BZ@CaCO₃ apresentou citotoxicidade sobre células hospedeiras (LLC-MK2), de forma mais acentuada que o fármaco livre, sendo a CI₅₀ da nanopartícula três vezes menor que a do benzonidazol. A nanopartícula de carbonato de cálcio livre de fármaco não apresentou citotoxicidade, indicando boa biocompatibilidade (WEI *et al.*, 2010). Esses resultados podem sugerir que a diminuição da viabilidade observada no tratamento com a BZ@CaCO₃ está, possivelmente, relacionada à entrada facilitada do fármaco na célula através do sistema de liberação. Como acontece no estudo de Chen (2012), terapia anticâncer no qual nanopartículas de carbonato de cálcio contendo quimioterápico inibiu a proliferação celular de forma mais significativa que o fármaco livre, provavelmente devido à entrega do fármaco dentro da célula.

Um dos critérios para produção de sistemas terapêuticos guiados a células infectantes ou cancerígenas é o índice de seletividade, que é calculado pela relação entre as CI_{50} da célula-alvo e da célula hospedeira. São considerados sistemas seletivos aqueles que apresentam índice de seletividade >10 (PEREIRA, 2015; VAN DE VEN et al., 2011)). Nesse estudo, utilizamos os dados de concentração inibitória de 50% da cultura de tripomastigota e LLC-MK2 para obtenção dos índices de seletividade de BZ@CaCO₃ e BZ (RIBEIRO et al., 2014).

BZ@CaCO₃ apresentou um alto índice de seletividade para *Trypanosoma cruzi*, causando inibição do crescimento de tripomastigotas em concentrações bem inferiores às observadas para LLC-MK2. O índice de seletividade de BZ foi 12 vezes menor que o da sua nanopartícula, não apresentando boa seletividade. De forma semelhante, estudo *in vitro* comparando efeito leishmanicida da saponina β -escina com a sua nanopartícula de PLGA demonstrou que a nanopartícula é quatro vezes mais seletiva para as formas promastigotas de *Leishmania* que a saponina livre (VAN DE VEN et al., 2011). Ribeiro (2014) comprovou em teste *in vitro* com *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi* que o índice de seletividade da anfotericina nanoparticulada em condroitina e quitosana é 10 vezes maior que o da anfotericina livre.

Nesse estudo foi observado efeito sobre tripomastigota usando BZ@CaCO₃ em concentrações muito inferiores às concentrações tóxicas em LLC-MK2, como mencionado anteriormente. Dessa forma, observa-se que a toxicidade efetiva das nanopartículas contendo benzonidazol é menor do que a toxicidade de BZ livre, o que é confirmado pelos índices de seletividade. Isso se deve ao fato de que, para obter os mesmos efeitos, são usadas concentrações muito inferiores de BZ quando associado ao CaCO₃, em comparação ao uso do BZ livre.

Em se tratando da forma intracelular de *T. cruzi*, forma amastigota, a BZ@CaCO₃ foi capaz de reduzir o percentual de células infectadas e o número de amastigotas por célula, diminuindo conseqüentemente o índice de sobrevivência. A redução do índice de sobrevivência dos grupos tratados com BZ@CaCO₃ nas concentrações de 8,7 e 17,4 $\mu\text{g/mL}$ foi semelhante às observadas para os grupos tratados com BZ (56,7 e 113,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Dessa forma, foi observado que as nanopartículas contendo benzonidazol apresentam potência aproximadamente 7 vezes maior em relação ao BZ em formas intracelulares. Levando em consideração o teor de 25%, o efeito anti-amastigota de BZ@CaCO₃ foi obtido com concentração efetiva de benzonidazol 26 vezes menor. Sanchez (2002) evidenciou em estudos

in vitro que nanopartículas de nifurtimox apresenta efeito anti-amastigota semelhante ao nifurtimox livre em concentrações bem mais baixas. Mondal (2013) constatou em teste *in vitro* que nanopartículas de andrographolide (diterpeno extraído das folhas de *Andrographis paniculata*) apresentam maior efeito tripanocida sobre formas amastigotas em cepas resistentes de *Leishmania donovani* que o andrographolide livre.

O melhor efeito das nanopartículas como sistema de liberação quando comparada ao fármaco livre pode estar associado a diversos aspectos inerentes a partícula como tamanho nanométrico, características de superfície (porosidade e carga) e entrega direcionada do fármaco na célula alvo (WEI et al., 2010). Estudos que caracterizam a nanopartícula utilizada nesse trabalho ainda não foram concluídos. No entanto, podemos sugerir que o efeito tripanocida acentuado da BZ@CaCO₃ deve estar relacionado ao seu tamanho nanométrico e sua composição. O tamanho nanométrico e a encapsulação em carbonato de cálcio podem estar facilitando a entrada da nanopartícula no parasito e na célula infectada potencializando o efeito do benzonidazol (ROMERO; MORILLA, 2010).

Ensaio de citometria de fluxo com os marcadores de fluorescência 7-amino actinomicina D (7-AAD) e anexina V- ficoeritrina (Anexina V-PE) foram realizados objetivando investigar os possíveis mecanismos de morte induzidos pela nanopartícula. Culturas da forma epimastigotas foram tratadas com BZ e BZ@CaCO₃ e nos dois tratamentos foi observado aumento da marcação por 7-AAD, sugerindo morte celular por necrose. Esse fluorocromo tem sido amplamente usado para determinar o potencial necrótico de substâncias, uma vez que tem a característica de marcar especificamente o DNA de células com lesão de membrana (KUMAR et al., 2015).

A morte celular por necrose é comumente caracterizada por aumento rápido de volume citoplasmático, colapso de organelas e ruptura de membrana (KRYSKO et al., 2008). A perda do controle oxidoreduzidor intracelular é um importante mecanismo associado à ação de fármacos citotóxicos (WAYPA; SMITH; SCHUMACKER, 2016), incluindo o benzonidazol. Tem sido descrito que o mecanismo de ação do benzonidazol está estritamente associado à indução de stress oxidativo no parasito (MAYA et al., 2007), causando a redução de nitrocompostos e à ligação à macromoléculas de *T. cruzi*.

Em continuidade aos estudos de mecanismo de ação, parasitos tratados com BZ@CaCO₃ e BZ foram submetidos à análise por citometria de fluxo para avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial, usando a rodamina 123. Foi observado, em ambos os grupos, uma redução do acúmulo da fluorescência mitocondrial. Como descrito previamente, a

rodamina 123 se acumula em mitocôndrias intactas, emitindo fluorescência vermelha. A redução dessa fluorescência indica que a morte celular induzida pelo benzonidazol livre e nanoparticulado está relacionada à interferência no metabolismo mitocondrial (KUMAR et al., 2015).

A mitocôndria é uma organela essencial para a sobrevivência das células, exercendo papel central nos mecanismos de produção de energia. Mecanismos de sinalização mitocondrial são sensíveis à redução do ATP e, conseqüentemente, ativam as vias de fosforilação oxidativa (WEN et al., 2016). Dessa forma, fármacos capazes de interferir nesses mecanismos podem causar lesão celular decorrente do colapso da produção de ATP.

Durante o metabolismo aeróbico, diversos agentes oxidantes são produzidos na mitocôndria de *T. cruzi*, incluindo radicais superóxido e peroxinitrito. Esses radicais podem causar disfunção mitocondrial. Entretanto, o parasito possui mecanismos de proteção a esses oxidantes, incluindo uma superóxido dismutase mitocondrial dependente de ferro (FeSOD-A). Em condições normais, peroxinitrito e superóxido competem pelo sítio catalítico da enzima e se mantêm em equilíbrio (PIACENZA et al., 2009; WAYPA; SMITH; SCHUMACKER, 2016).

É possível que o benzonidazol exerça seu efeito sobre *T. cruzi* através de lesão mitocondrial, interferindo, portanto na produção de energia. Acredita-se ainda que a produção de metabólitos nitrogenados induzidas pelo benzonidazol pode causar um desbalanceamento do controle desses agentes oxidantes, provocando o acúmulo de ânion superóxido na mitocôndria de *T. cruzi* e, conseqüentemente, colapso na produção de ATP.

BZ@CaCO₃ apresentou efeito semelhante sobre a mitocôndria, fortalecendo a sugestão de que os efeitos encontrados para essa substância são induzidos pelo benzonidazol contido nessa nanopartícula, em concentrações aproximadamente 25 vezes menores.

Em vista dos resultados apresentados, sugere-se que a nanoparticulação do benzonidazol em carbonato de cálcio seja um modelo de sistema terapêutico promissor, causando morte das três formas de vida do parasito em concentrações bem inferiores às necessárias para se observar o mesmo efeito em benzonidazol livre. Os dados do presente trabalho poderão ser úteis para o desenvolvimento de novos sistemas nanoparticulados e para a investigação dos efeitos *in vivo* dessa nanopartículas, quanto à eficácia terapêutica e toxicidade.

7 CONCLUSÃO

O benzonidazol nanoparticulado apresenta efeito tripanocida sobre as três formas de *Trypanosoma cruzi*, sendo esse efeito mais potente e mais rápido do que o observado para benzonidazol em sua forma livre, os dois tratamentos promovem alterações celulares indicativas de necrose envolvendo dano mitocondrial, demonstrando assim que a entrega de fármacos por meio de nanosistemas é uma ferramenta eficaz para potencializar o efeito terapêutico de fármacos pouco seletivos. Os dados do presente trabalho poderão ser úteis para o desenvolvimento de novos sistemas nanoparticulados e para a investigação dos efeitos *in vivo* dessa nanopartícula, quanto a eficácia terapêutica e toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABE, F. et al. Trypanocidal Constituents in Plants 1 . Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco , Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol . Pharm. Bull**, v. 25, n. 9, p. 1188–1191, 2002a.
- ABE, F. et al. Ursolic Acid as a Trypanocidal Constituent in Rosemary. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n.11, p1485-1487, 2002b.
- ADADE, C. M.; CHAGAS, G. S. F.; SOUTO-PADRÓN, T. *Apis mellifera* venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1444–61, 2012.
- AFONSO, A M.; EBELL, M. H.; TARLETON, R. L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 11, p. e1881, 2012.
- ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A. et al. Applications of Flow Cytometry to Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 167–195, 2000.
- ALVES, C. R. et al. *Trypanosoma cruzi* : Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 44–52, 2007.
- BAHARARA, J. et al. Anti-Angiogenesis Effect of Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized Using *Saliva Officinalis* on Chick Chorioalantoic Membrane (CAM). **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13498–13508, 2014.
- BARACCA, A. et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1606, n. 1-3, p. 137–146, 2003.
- BARTH, W. Nanotecnologia “Há muito espaço lá embaixo”. **Rev Trim**, v. 36, n. 153, p. 669–695, 2006.
- BD PHARMINGENTM. **Technical Data Sheet- PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I**. Disponível em: <<http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/559763.pdf>>. Acesso em: 5 nov. 2015.
- BEARD, C. B. et al. Chagas Disease in a Domestic Transmission Cycle in Southern-USA. **Emerging Infectious Disease**, v. 9, n. 1, p. 103–105, 2003.
- BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Experimental parasitology**, v. 131, n. 1, p. 57–62, 2012a.
- BEHESHTI, N. et al. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: in vitro and in vivo studies. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 27, n. 3, p. 203–7, 2013.
- BENINCASA, M. et al. Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Carbon Nanotubes. **ACS Nano**, v. 5, n. 1, p. 199–208, 2011.
- BEZERRA, E. M. et al. Optical Absorption of the Antitrypanocidal Drug Benznidazole in Water. **Molecules**, p. 4145–4156, 2014.
- BIRADAR, S. et al. Optimization of process parameters of polymer solution mediated growth of calcium carbonate nanoparticles. **Iop Publishing Nanotechnology**, v. 23, 2012.

- BISOGLI, E. et al. Ensinos e aprendizagem de conceitos matemáticos relacionados à nanociência por meio da modelagem matemática. **Acta Scientiae**, v. 14, n. 2, p. 200–214, 2012.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Chagas heart disease pathogenesis: One mechanism or many. **NIH Public Access**. v. 8, n. 6, p. 510–518, 2010.
- BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.
- BORGHETTI, F.; GUAZZELLI, M. J. Manual de Bolso das Tecnologias em Nanoescala ... e a Teoria do “ Little BANG ”Intercâmbio, Informações, Estudos e Pesquisas. **ETC group**, [s.l: s.n.], 2005.
- BRANQUINHO, R. T. et al. Sesquiterpene lactone in nanostructured parenteral dosage form is efficacious in experimental Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2067–75, 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de vigilância em Saúde. Doença de Chagas. Caderno 10. 2012. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_doenca_de_chagas.pdf.
 Acesso em: 29 nov. 2015.
- BRAUKAISER. Microscope use in brewing. **BRAUKAISER**. Disponível em:
 <http://braukaiser.com/download/Neubauer_hemocytometer.pdf>. Acesso em: 16 out. 2015.
- BRAZÃO, V. et al. Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease. **Immunobiology**, v. 220, n. 5, p. 626–633, 2015.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. [s.l: s.n.], 2000.
- BURDA, C. et al. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical review**, v. 105, n. 4, p. 1025–1102, 2005.
- CAMARGO, E. . Growth and Differentiation in Trypanosoma Cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in LiquidMedia. **Rev do inst de medicina tropical de são paulo**, v. 6, p. 93–100, 1964.
- CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 331–335, 1999.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 44, p. 29–37, 2002.
- CAO, G. Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. **Imperial College Press**, 2004.
- CARNEIRO, Z. A et al. In vitro and in vivo trypanocidal activity of H2bdtc-loaded solid lipid nanoparticles. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2847, 2014.
- CASTRO, D. P. et al. Trypanosoma cruzi : Ultrastructural studies of adhesion , lysis and biofilm formation by Serratia marcescens. **Experimental Parasitology** v. 117, p. 201–207, 2007.

- CECILIO, A. B. et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A2 from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus. **Toxins**, v. 5, p. 1780–1798, 2013.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1–170, 1909.
- CHEANG, T. et al. Calcium carbonate/CaIP6 nanocomposite particles as gene delivery vehicles for human vascular smooth muscle cells. **Journal of Materials chemistry**, v. 20, p. 8050–8055, 2010.
- CHEN, S. . et al. Co-delivery of genes and drugs with nanostructured calcium carbonate for cancer therapy. **Jornal The Royal Society of Chemistry**, v. 2, 2012.
- COURA, J. R. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 113–122, 2007.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5–13, 2010.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Review Article / Artigo de Revisão Chagas disease . What is known and what should be improved : a systemic review Doença de Chagas . O que é conhecido e o que deve ser melhorado : uma visão sistêmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286–296, 2012.
- DA SILVA, C. F. et al. In vitro and in vivo activity of the chloroaryl-substituted imidazole viniconazole against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 141, n. 03, p. 367–373, 2014.
- DA SILVA, R. et al. Trypanocidal structure-activity relationship for cis- and trans-methylpluviatolide. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1890–1894, 2008.
- DE ANDRADE, A. R. **Aplicação da citometria de fluxo para otimização do método de determinação da potência da alfaepoetina humana recombinante em bio-manguinhos / fiocruz**. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado profissional em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.
- DE SOUZA, E. M. et al. Trypanocidal activity and selectivity in vitro of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 2, p. 429–35, 2011.
- DELAVARI, M. . et al. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iran J. Parasitol**, v. 9, n. 1, p. 6–13, 2014.
- DIAZ, J. H.; HISTORY, T.; BURDEN, D. Recognizing and Reducing the Risks of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) in Travelers. **J. Travel. MED** v. 15, n. 3, p. 184–195, 2008.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. DNDi, 2015. Disponível em: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html> Acesso em : 09 de nov. de 2015.
- FUJIWARA, M. . et al. Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 14–22, 2008.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 22–7, 2010.

HALAMODA-KENZAOU, B. et al. Dispersion Behaviour of Silica Nanoparticles in Biological Media and Its Influence on Cellular Uptake. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. e0141593, 2015.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. et al. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas ' disease. **Antimicrob Chemother**, v.67, p. 1261–1266, 2012.

HERNÁNDEZ-CHINEA, C. et al. In vitro activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-c]quinolines on *Leishmania mexicana*. **Parasitology International**, v. 64, n. 6, p. 479–483, 2015.

HIGAKI, M. D. M. . et al. Transdermal Delivery of CaCO₃ -Nanoparticles Containing Insulin. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 8, n. 3, p. 369–374, 2006.

HIGINO, T.M.M. **Novas perspectivas de fármacos com propriedade tripanocida: estudos biológicos de compostos heterocíclicos**. 2012.84p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012. Disponível em: <http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2012higino-tmm.pdf> Acesso em: 16 out.2013.

INOVECARE. **INOVECARE**. Disponível em: <<http://www.inovecare.com/pesquisa.html>>. Acesso em: 19 out. 2015.

JOUBE, N. et al. The involvement of CD146 and its novel ligand galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 288, n. 4, p. 2571–2579, 2013.

KESSLER, R. L. et al. Trypanosoma cruzi response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55497, 2013.

KROUBI, M. et al. Development of a nanoparticulate formulation of diminazene to treat African trypanosomiasis. **Nanotechnology**, v. 21, n. 50, p. 505102, 2010.

KRYSKO, D. V et al. Apoptosis and necrosis : Detection , discrimination and phagocytosis. **Science Direct**, v. 44, p. 205–221, 2008.

KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 45–51, 2015.

LIANG, P. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Facile preparation of heparin / CaCO₃ / CaP hybrid nano-carriers with controllable size for anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 783–788, 2013.

LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas ' disease : Has the human pathogen , Trypanosoma cruzi , learned how to modulate signaling events to subvert host cells ? **New biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 837–843, 2010.

MACEDO, S. R. A. et al. The pentavalent antimonial therapy against experimental *Leishmania amazonensis* infection is more effective under the inhibition of the NF-κB pathway. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 554–559, 2015.

MALEKI, S. D. et al. Application of Box-Behnken design to prepare gentamicin-loaded calcium carbonate nanoparticles. **Artif Cell Nanomed Biotechnol**, v. 12, n. 10, 2015.

- MANUJA, A. et al. Quinapyramine sulfate-loaded sodium alginate nanoparticles show enhanced trypanocidal activity. **Nanomedicine**, v. 9, p. 1625–1634, 2013.
- MARIN-NETO, J. A. et al. The BENEFIT trial : testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. June, p. 319–324, 2009.
- MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Cienc Cult**, v. 65, n. 3, 2013.
- MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601–620, 2007.
- MEIRA, C.S et al. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalisangulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosomacruzi*. **Phytomedicine**, v.22, p969-974, jul.2015.
- MENEZES, R.R.P.P. **Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothropoides insularis* sobre células RAW 264.7 *in vitro***. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.
- MONDAL, S. et al. In vitro susceptibilities of wild and drug resistant leishmania donovani amastigote stages to andrographolide nanoparticle: role of vitamin E derivative TPGS for nanoparticle efficacy. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e81492, 2013.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **J IMMUNOL METHODS**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MUÑOZ-SARAIVA, S. G. et al. Chronic Chagas ' heart disease : a disease on its way to becoming a worldwide health problem : epidemiology , etiopathology , treatment , pathogenesis and laboratory medicine. **Heart Fail**, v. 17, p. 45–64, 2012.
- NAYAK, T. R. et al. Thin Films of Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes as Suitable Scaffold Materials for Stem Cells Proliferation and Bone Formation. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7717–7725, 2010.
- NOGUEIRA, A. J. M. et al. Síntese, caracterização e estudo da atividade inibitória de novas dialquilfosforilarilidrazonas sobre o crescimento de tripanossomatídeos. **QUIM. NOVA**, v. 34, n. 8, p. 1365–1369, 2011.
- NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0116712, 2015.
- NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History : Implications for Policy Makers. p. 1177–1183, 2011.
- OLIVEIRA, M. F. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.
- OMS, Organização Mundial de saúde. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet, n.340. 2015. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 09 nov. 2015.
- PEREIRA, K. S. et al. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, v. 2, p. 228–446, 2009.

- PEREIRA, M. G. et al. Trypanosoma cruzi Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0128949, 2015.
- PEREIRA, T.P. **Efeito tripanocida da L-amino ácido oxidase isolada do veneno da bothrops marajoensis**. 2015. 82f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- PÉREZ-AYALA, A. . et al. Chagas disease in Latin American migrants : a Spanish challenge. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, p. 1108–1113, 2011.
- PETHERICK, A. After years of neglect, Brazil takes aim at Chagas disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 10, p. 1174, out. 2011.
- PIACENZA, L. et al. Fighting the oxidative assault : the Trypanosoma cruzi journey to infection a Noel Alvarez , Gonzalo Peluffo and Rafael Radi. **Science Direct**, v. 12, p. 415–421, 2009.
- QIAN, K. . et al. Preparation and characterization of nano-sized calcium carbonate as controlled release pesticide carrier for validamycin against Rhizoctonia solani. **Microchim Acta**, v. 173, p. 51–57, 2011.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 17 maio 2010.
- REN, X. M.; CHEN, C.; NAGATSU, M. Carbon nanotubes as adsorbents in environmental pollution management: a review. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 2, p. 395–410, 2011.
- RIBEIRO, C. M. **Efeito do Tratamento do Benzonidazol e da Terapia Antioxidante na Cardiopatia Chagásica Crônica**. [s.l.] Universidade de Santa Catarina, 2009.
- RIBEIRO, T. G. et al. Novel targeting using nanoparticles: An approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 877–890, 2014.
- ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 576–588, 18 mar. 2010.
- SÁNCHEZ, G. et al. Cytotoxicity and trypanocidal activity of nifurtimox encapsulated in ethylcyanoacrylate nanoparticles. **Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 39–45, 2002.
- SANDES, J. M. et al. Trypanosoma cruzi cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–9, 2014.
- SANTORO, G. F. et al. Trypanosoma cruzi: Activity of essential oils from Achillea millefolium L., Syzygium aromaticum L. and Ocimum basilicum L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 283–290, 2007.
- SESTI-COSTA, R. et al. Ruthenium Complex with Benznidazole and Nitric Oxide as a New Candidate for the Treatment of Chagas Disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, 2014.
- SHARMA, S. et al. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 120–139, 2015.

- SILVA, C. F. et al. Cellular Effects of Reversed Amidines on *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3803–3809, 2007.
- SOARES, R. O. A et al. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 381–387, 2011.
- SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Benzimidazole drug delivery by binary and multicomponent inclusion complexes using cyclodextrins and polymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 323–330, 2012.
- SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction. v. 2010, 2010.
- SUKHORUKOV, G. B. . et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. **Journal of Materials chemistry**, v. 14, p. 2073–2081, 2004.
- UENO, Y. . et al. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. **Jornal of controlled release**, v. 103, p. 93–98, 2004.
- UNCITI-BROCETA, J. D. et al. Specific Cell Targeting Therapy Bypasses Drug Resistance Mechanisms in African Trypanosomiasis. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, p. e1004942, 2015.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease : controversies and advances. v. 19, n. 11, p. 495–501, 2005.
- VAN DE VEN, H. et al. PLGA nanoparticles loaded with the antileishmanial saponin β -aescin: factor influence study and in vitro efficacy evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 122–32, 2011.
- VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoide-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. **Parasitology international**, v. 59, n. 2, p. 154–8, 2010.
- VERMA, N. K. et al. Magnetic core-shell nanoparticles for drug delivery by nebulization. p. 1–12, 2013.
- WAYPA, G. B.; SMITH, K. A.; SCHUMACKER, P. T. O₂ sensing, mitochondria and ROS signaling: The fog is lifting. p. 1–14, 2016.
- WEI, W. et al. Preparation of Hierarchical Hollow CaCO₃ Particles and the Application as. p. 15808–15810, 2010.
- WEN, R. et al. Nanotechnology inspired tools for mitochondrial dysfunction related diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.
- WILLKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Curr top med chem**, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.
- XU, B. . et al. Liquid–gas dual phase microfluidic system for biocompatible CaCO₃ hollow nanoparticles generation and simultaneous molecule doping. **Chem Commun**, v. 48, p. 11635–11637, 2012.
- ZANETTI, M. Doença de Chagas: sinais e sintomas da fase aguda e crônica. 2012. Disponível em: <http://medifoco.com.br/doenca-de-chagas-sinais-e-sintomas-da-fase-aguda-e-cronica/> Acesso em: 16 nov 2015.

ZHAO, Y. et al. Synthesis of Superparamagnetic CaCO₃ Mesocrystals for Multistage Delivery in Cancer Therapy. **Small**, v. 6, n. 21, p. 2436–2442, 2010.