



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANO/MICROPARTÍCULAS CONTENDO BENZONIDAZOL ASSOCIADO A COMPOSTOS SINÉRGICOS NATURAIS OU SINTÉTICOS PARA O TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.

Isadora Zanella Rambo (PIBIC/CNPq-UEM), Elizandra Aparecida Britta (Pós-doutoranda), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde.

Ciências da Saúde, Farmácia, Análise e controle de medicamentos.

Palavras-chave: nanopartículas, *Trypanosoma cruzi*, β -carbolínico.

Resumo:

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e é uma endemia mundial. Tratamentos convencionais são utilizados, porém são restritos para a fase aguda da doença, além de serem tóxicos para o organismo. Por isso, novas alternativas estão em desenvolvimento para a melhora da terapêutica, sendo uma delas a utilização de micro e nanopartículas contendo uma combinação de fármacos. Neste trabalho serão apresentadas a produção, caracterização, atividade antitripanossoma e avaliação do potencial hemolítico da suspensão de nanopartículas a partir do copolímero em bloco PEO-PLA, contendo as substâncias benzonidazol (BZD) e β -carbolínico em comparação com as drogas livres.

Introdução

De endemia sul-americana, a doença de Chagas é considerada a doença parasitária com alta taxa de mortalidade no mundo, com cerca de 10 milhões de casos de infecção e 14 mil mortes por ano. É uma doença negligenciada, por atingir as comunidades mais pobres.¹ O agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que no hospedeiro vertebrado se encontra na forma intracelular amastigosta e extracelular tripomastigota. O indivíduo se infecta após a picada do inseto triatomíneo, vetor da doença. No início da infecção, a carga parasitária é muito alta, podendo ocorrer morte (fase aguda). Já na fase crônica da doença, o número de parasitas é menor. O tratamento



estabelecido para esta enfermidade são os medicamentos Benzonidazol (Rochagan[®]) e Nifurtimox (Lampit[®]). Ainda que efetivos na fase aguda, não são eficazes na fase crônica da doença, além de serem tóxicos para o organismo.² Portanto, novos métodos estão sendo utilizados para otimizar o tratamento, e um deles é a utilização de micro e nanopartículas.³

Sendo assim, este estudo foi realizado visando uma alternativa para melhorar o tratamento da doença de Chagas. As nanopartículas neste estudo são feitas a base de copolímero em bloco, PEO(2000) - PLA(1400), contendo as substâncias benzonidazol (BZD) e *N*-butil-1-(4-dimetilamino)fenil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolínico-3-carboxamida (β -carbolínico). Foram preparadas por nanoprecipitação, realizados testes de caracterização e de atividade do fármaco.

Materiais e métodos

Na preparação das nanopartículas, foi utilizado 6 mg do polímero PEO(2000) - PLA(1400), 0,6 mg de benzonidazol, 0,6 mg do β -carbolínico e 3 mL de acetona P.A. A solução foi agitada por 24 h a 400 rpm. Após esse processo, esta solução foi gotejada em 4 ml de água Milli-Q, ocorrendo a nanoprecipitação das partículas. A solução com nanopartículas foi agitada em 700 rpm até evaporação completa da acetona.

Para a caracterização, foi determinado o tamanho médio das nanopartículas por dispersão dinâmica da luz (DLS), potencial zeta (ζ) e índice de polidispersão por Zetasizer Nano Série (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Sua morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (JEOL JM 1400 TEM).

Para o ensaio antiproliferativo monitorado, um inóculo inicial de 1×10^6 células/ml em meio de LIT de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, foram colocadas em placa de 24 poços estéreis na presença de várias concentrações da solução de nanopartículas, e dos fármacos associados livres (50; 10; 5; 1; 0,1 $\mu\text{g/ml}$). O crescimento foi avaliado através da contagem em câmara de Neubauer após 24, 48, 72 e 96 h de incubação. A atividade antitripanossoma foi expressa através do percentual de inibição de crescimento em relação ao controle. O ensaio de parasitas viáveis foi realizado com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com um inóculo inicial de 2×10^6 células/ml em meio DMEM. Foram usadas as concentrações de 20; 10; 5; 1 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ da suspensão de nanopartículas, dos fármacos associados livres, e do benzonidazol. A contagem de tripomastigotas viáveis foi feita após 24 h de incubação.

Por fim, o ensaio de hemólise foi realizado com sangue do tipo O+, testando a formulação nas concentrações de 128, 64, 32 e 16 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados foram obtidos por espectrofotômetro em placa (BIO TEK - Power Wave - XS).



Resultados e Discussão

O tamanho das partículas foi de 194,6 nm, sendo este o resultado da média de três leituras pela técnica do DLS. O Potencial Zeta foi de +5,40 mV. E o índice de polidispersão foi 0,211. As imagens obtidas pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) mostram a morfologia esférica das nanopartículas.

A Tabela abaixo apresenta o resultado do antiproliferativo monitorado. O experimento realizado apresentou resultados semelhantes entre a suspensão de nanopartículas e a substância livre. Mais testes são necessários para confirmar este resultado.

Tabela 01: Ensaio antiproliferativo monitorado sobre as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* do benzonidazol e β -carbolínico, e dos dois compostos encapsulados em nanopartículas de PEO(2000) – PLA (1400)

Tempo (h)	Suspensão de nanopartículas	Benzonidazol + β -carbolínico
	IC ₅₀ (μ g/ml)	IC ₅₀ (μ g/ml)
24	35	47
48	9	7,4
72	3,5	3,1
96	3,3	3,7

A suspensão de nanopartículas se mostrou mais eficaz no experimento de viabilidade, pois foi necessária uma concentração menor ($EC_{50}=1,26 \pm 1,6 \mu$ g/ml) para matar 50% das formas tripomastigotas do *T. cruzi* quando comparada com as substâncias livres (Benzonidazol $EC_{50}=1,8 \pm 1,47 \mu$ g/ml, e Benzonidazol+ β -carbolínico $EC_{50}=2,36 \pm 0,72 \mu$ g/ml).

Na hemólise, os compostos β -carbolínico, Benzonidazol, Benzonidazol + β -carbolínico, e a suspensão de nanopartículas apresentou hemólise inferior a



2%, ou seja, tanto a suspensão de nanopartículas quanto a droga livre não causa danos significativos para as hemáceas.

Conclusões

Os estudos na literatura mostram que o emprego de sistemas nanoestruturados como carreadores de substâncias ativas para o tratamento da doença de Chagas é uma alternativa. Neste trabalho foi demonstrada a atividade antitripanossoma *in vitro* da suspensão de nanopartículas contendo Benzonidazol e β -carbolínico, porém, mais estudos são necessários para comprovar sua eficácia frente ao *T.cruzi*.

Agradecimentos

Ao CNPq, ao Laboratório de Inovação Tecnológica de Fármacos e Cosméticos, e ao Jean Henrique da Silva Rodrigues.

Referências

1. Drugs for Neglected Disease initiative. GENEBRA, 17 de maio de 2010. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/2010/211-17-05-10-resolucao-sobre-a-doenca-de-chagas-na-oms.html>>. Acesso em 12/06/2015.
2. NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
3. STRECK, L., et.al. Validação do método analítico por espectrofotometria UV para sistema emulsionado lipídico contendo Benzonidazol. **Química Nova**, v.34, n. 8, p. 1459-1463, 2011.