

## DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO BENZONIDAZOL E $\beta$ -CARBOLÍNICO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TRYPANOSOMA E DO POTENCIAL HEMOLÍTICO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS A PARTIR DO COPOLÍMERO EM BLOCO PEO-PCL

Amanda Beatriz Kawano Bakoshi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Júlia Gasparino de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jéssica Carreira de Paula (Coorientadora), Danielle Lazarin-Bidóia (Coorientadora), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: amandabakoshi@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

### Ciências Biológicas III / Microbiologia Aplicada

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, nanopartículas.

### Resumo

As doenças negligenciadas acometem milhões de pessoas no mundo todo, principalmente nas regiões subdesenvolvidas, e dentre essas doenças pode ser citada a doença de Chagas, a qual possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. O tratamento é baseado nos fármacos benzonidazol e nifurtimox, que apresentam eficácia limitada e severos efeitos tóxicos. Desta forma, a fim de melhorar a terapia tradicional, existe uma grande busca por novas alternativas e/ou compostos, por exemplo pela associação de fármacos e também por meio da utilização de novas tecnologias, como é o caso da nanotecnologia farmacêutica. Assim, o objetivo deste estudo foi de desenvolver e caracterizar nanopartículas de copolímero em bloco PEO-PCL contendo benzonidazol (**Bz**) associado ao  $\beta$ -carbolínico **C4** para avaliação da atividade frente ao protozoário *T. cruzi*. O desenvolvimento das nanopartículas de PEO-PCL contendo **C4** e **Bz** foi realizado de maneira satisfatória, apresentando diâmetro médio de 42,32 nm, índice de polidispersão de 0,252 e potencial zeta de -5,76 mV. Frente à linhagem celular LLC-MK2 e hemácias, as nanopartículas não apresentaram toxicidade, sendo que quando testadas frente às formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, as nanopartículas contendo **C4** e **Bz** apresentaram atividade apenas contra tripomastigotas, com o EC<sub>50</sub> de 21,25  $\mu$ g/mL. Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que o índice de seletividade das nanopartículas contendo **C4** e **Bz** foram superiores aos dos compostos isolados.

### Introdução

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, e estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estão

infectadas, principalmente na América Latina; no entanto, a doença vem sendo cada vez mais encontrada em outros continentes (WHO, 2018). Os tratamentos disponíveis para a doença ainda são restritos, sendo utilizados comercialmente apenas o benzonidazol (**Bz**) e nifurtimox, os quais possuem eficácia limitada, especialmente na fase crônica da doença, apresentando efeitos colaterais sérios (COURA, 2009).

Algumas substâncias como  $\beta$ -carbolínicos atraem pesquisas por serem de fácil acesso e extraídos de diferentes organismos, como plantas e fungos. O composto tetra-hidro- $\beta$ -carbolínico *N*-butil-1-(4-dimetilamino) fenil-1,2,3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolínico-3-carboxamida (**C4**) apresentou atividade *in vitro* em trabalhos anteriores contra *T. cruzi*. Além disso, pesquisas relatam eficácia na associação entre **C4** e **Bz** (VALDEZ et al., 2012).

Dentre os sistemas de liberação de drogas, destaca-se a nanotecnologia, tida como promissora, pois permite o encapsulamento de drogas hidrofóbicas, aumentando a biodisponibilidade e solubilidade (KUMARI et al., 2010). Deste modo, o objetivo deste estudo foi desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo **C4** associado ao **Bz**, avaliar sua atividade anti-*Trypanosoma*, bem como seu potencial hemolítico.

## Materiais e métodos

As nanopartículas (NPs) foram preparadas pela técnica de nanoprecipitação seguido de evaporação do solvente. Uma solução orgânica de 20 mg/mL de copolímero foi preparada em acetona, na presença ou na ausência de **C4** e **Bz** (5 mg/mL). A solução orgânica foi gotejada sobre 4 mL de água Milli-Q® (18.2  $\Omega$ .cm), sob agitação magnética constante de 750 rpm, com uma taxa de gotejamento de 5.08 mL/h. Após isso, a solução foi mantida em temperatura ambiente por 24 h para a evaporação da acetona.

As eficiências de encapsulação (EE %) do **C4** e **Bz** contidos nas NPs foram determinadas por espectrofotometria UV/Vis, por meio da equação da reta. O **C4** e **Bz** não encapsulados foram separados por meio de filtração/centrifugação. A EE% foi determinada de acordo com a fórmula:  $EE \% = (\text{Conc. inicial} - \text{Conc. não encapsulada}) / \text{Conc. inicial} \times 100$ .

A caracterização das NPs foi realizada determinando o tamanho médio por espalhamento de luz (DLS), índice de polidispersão e o potencial zeta ( $\zeta$ ). Ademais, a morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Para determinar a atividade antiproliferativa, formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram tratadas com as NPs vazias e com NPs contendo **C4** e **Bz** em concentrações de 10-1000  $\mu\text{g/mL}$ , incubadas a 28 °C por 96 h e a leitura foi feita pelo método XTT/PMS, determinando a concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC<sub>50</sub>). Para determinar a viabilidade das formas tripomastigotas, as células foram adicionadas a placas de 96 poços, tratadas com as NPs (10-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas a 37° C por 24 h; com isso, foi calculada a concentração efetiva em 50% (EC<sub>50</sub>).

Para avaliar a citotoxicidade das NPs, células LLC-MK2 foram cultivadas em placas de 96 poços a 37° C por 24 h, tratadas com as NPs

(10-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas sob as mesmas condições durante 96 h; determinou-se a concentração citotóxica em 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) por meio do método de MTT. Para avaliar a atividade hemolítica, foram incubadas hemácias com NPs (50-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) por 96 h a 37 °C. Depois, foi realizada a leitura do sobrenadante em 540 nm e a porcentagem de hemólise foi calculada.

## Resultados e Discussão

Os parâmetros obtidos na análise da caracterização das NPs estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta da suspensão de NPs de copolímero PEO (5000)-PCL (10000) vazias e NPs contendo **C4** e **Bz**.

Parâmetros	NPs com C4 e Bz	NPs vazias
Diâmetro médio (nm)	42,32 $\pm$ 1,33	40,22 $\pm$ 0,87
Índice de polidispersão	0,252 $\pm$ 0,007	0,202 $\pm$ 0,02
Potencial zeta (mV)	-5,76 $\pm$ 1,47	-5,77 $\pm$ 0,86

Com os resultados obtidos, foi possível observar que as NPs demonstraram um perfil monomodal, ou seja, apresentaram uma distribuição de tamanho estreito. Em relação ao diâmetro médio, os valores obtidos por meio da leitura realizada em DLS foi de 42,32 nm, resultado que corrobora com os obtidos pelo MET, tendo em vista que por esta técnica foi possível visualizar NPs com diâmetro próximo a 50 nm. O potencial zeta obtido foi satisfatório, uma vez que a faixa considerada ideal para NPs na literatura é de  $|30|$  mV. A eficiência de encapsulação obtida foi de 56%.

A avaliação da atividade das NPs frente a *T. cruzi* está retratada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Atividade *in vitro* das NPs de copolímero PEO (5000)-PCL (10000) vazias e NPs contendo **C4** e **Bz** frente ao protozoário *T. cruzi*.

	Atividade hemolítica	Citotoxicidade LLC-MK2/96 h	Epimastigota $\text{IC}_{50}/96$ h	IS	Tripomastigota $\text{EC}_{50}/24$ h	IS
<b>NPs com C4 e Bz</b>	>1000	950 $\pm$ 70,71	>1000	ND	21,25 $\pm$ 5,3	44,7
<b>NPs vazias</b>	435 $\pm$ 60,62	>1000	>1000	ND	>1000	ND

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$ , média  $\pm$  desvio padrão. O índice de seletividade (IS) foi obtido pela equação:  $\text{IS} = \text{CC}_{50} / \text{EC}_{50}$ .

Pela avaliação da citotoxicidade e da atividade hemolítica, foi possível observar que as NPs não apresentaram toxicidade frente às células testadas. Ademais, as NPs não revelaram atividade contra epimastigotas, a forma proliferativa do protozoário; entretanto, exibiu atividade contra tripomastigotas, sendo este um resultado interessante, uma vez que é forma infectante e de grande interesse para o estudo do *T. cruzi*. Comparou-se os

efeitos citotóxicos sobre as células LLC-MK2 e a atividade contra tripomastigotas por meio do índice de seletividade (IS), e o valor obtido foi de 44,7, o qual mostra que as NPs contendo **C4** e **Bz** são mais seletivas contra o parasita do que contra células de mamíferos. O IS do **C4** encapsulado foi maior do que o IS do **C4** livre, o qual apresenta um valor de IS de 10,27 (VALDEZ et al., 2009).

## Conclusões

As NPs de PEO-PCL contendo **C4** e **Bz** foram produzidas de forma satisfatória, uma vez que o diâmetro médio foi reduzido, além de exibirem um perfil monomodal. Além disso, os resultados obtidos nos testes biológicos permitem concluir que as NPs apresentam uma boa atividade frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*, e não apresentam citotoxicidade frente às células LLC-MK2 e hemácias. Sendo assim, o sistema de NPs de PEO-PCL contendo **C4** e **Bz** pode ser promissor.

## Agradecimentos

CNPq, CAPES, FINEP, COMCAP-UEM, Universidade Estadual de Maringá, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

## Referências

COURA, J R. **Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.

WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**, 2018.

KUMARI, A. et al. **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.

VALDEZ, R. H. et al. **Biological activity of 1, 2, 3, 4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi***. Acta tropica, v. 110, n. 1, p. 7-14, 2009.

VALDEZ, R. H. et al. **In Vitro and In Vivo Trypanocidal Synergistic Activity of *N*-Butyl-1-(4-Dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -Carboline-3-Carboxamide Associated with Benznidazole**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, n. 1, p. 507-512, 2012.