



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

LARISSA SILVA SAMPAIO



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO*, CITOTOXICIDADE E  
ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VITRO* DA LACTONA SESQUITERPÊNICA  
ISOLADA DE *LYCHNOPHORA TRICHOCARPHA*

Ouro Preto – MG, 2019

LARISSA SILVA SAMPAIO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO*, CITOTOXICIDADE E  
ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VITRO* DA LACTONA SESQUITERPÊNICA  
ISOLADA DE *LYCHNOPHORA TRICHOCARPHA*

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia  
da Universidade Federal de Ouro Preto como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros  
Teixeira

Co-orientador: Matheus Marques Milagre

Ouro Preto – MG, 2019

S192a Sampaio, Larissa.  
Avaliação da toxicidade aguda in vivo, citotoxicidade e atividade tripanocida in vitro da lactona sesquiterpênica isolada de *Lychnophora Trichocarpa* [manuscrito] / Larissa Sampaio. - 2019.

72f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Teixeira.  
Coorientador: Prof. MSc. Matheus Milagre.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Análises Clínicas.

1. Trypanosoma cruzi. 2. Testes de toxicidade. 3. Nanocápsulas. I. Teixeira, Luiz Fernando. II. Milagre, Matheus. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 57.083.36

Catálogo: [ficha.sisbin@ufop.edu.br](mailto:ficha.sisbin@ufop.edu.br)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Larissa Silva Sampaio**

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA *IN VIVO*, CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE TRIPANOCIDA *IN VITRO* DA LACTONA SESQUITERPÊNICA ISOLADA DE *LYCHNOPHORA TRICHOCARPHA*

Membros da banca

Fernanda Karoline Vieira da Silva Torchelsen UFOP - Doutoranda  
Luana Cristina Faria Carvalho- UFOP - Doutoranda  
Matheus Marques Milagre - Co-orientador - UFOP - Doutorando

Versão final

Aprovado em 18 de dezembro de 2019

De acordo

Prof. dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando de Medeiros Teixeira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/12/2019, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0029304** e o código CRC **DD3EDF23**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.204120/2019-90

SEI nº 0029304

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591649 - [www.ufop.br](http://www.ufop.br)

## **AGRADECIMENTOS**

Ninguém caminha sozinho, por este motivo começo o trabalho com o meu “Muito Obrigada!”.

Agradeço primeiro ao criador de todas as coisas, por Ele a minha fé nunca foi abalada.

Aos meus pais, Elza e José Luiz, agradeço pelo dom da vida. Para além deste, que foi o maior presente que poderia receber, me doaram amor, carinho, estrutura, educação, palavras positivas e coragem.

Agradeço aos meus irmãos pelo nosso laço. Jéssica, minha conselheira e companheira de vida, que sempre me acalma e coloca meus pensamentos no lugar, e Luiz Henrique, dono das brincadeiras e risadas, que fez a vida de todos nós muito melhor do que um dia poderíamos imaginar.

Agradeço ao meu amor, Ullysses, que entrou em minha vida para ensinar o significado de tranquilidade e companheirismo.

Deixo aqui também meus agradecimentos aos amigos de jornada, Arthur, Daiane, Grazi e Maíra. Com vocês a caminhada é mais leve.

Gostaria de agradecer à toda a equipe do LADOC, sem vocês esse trabalho não existiria (vocês são bons demais!!!).

E por fim, gostaria de deixar registrado um agradecimento especial aos meus mentores, Renata e Matheus, que com apoio, conselho, trabalho duro e conversa, me ensinaram muito além da ciência e fizeram tudo acontecer.

À todos o meu “Muito Obrigada!”.

“Tudo o que a mente humana pode conceber, ela pode conquistar.”

- HILL, Napoleon

## RESUMO

A doença de Chagas (Dch) permanece epidemiologicamente relevante e é considerada negligenciada pela OMS, causando elevada morbidade e mortalidade em plena idade produtiva. O mais grave é a falta de terapia profilática adequada e de tratamento etiológico efetivo para esta enfermidade. Os únicos medicamentos atualmente utilizados são o benznidazol (BZ) e nifurtimox (NF). Estes fármacos são administrados em esquema prolongado, causam graves efeitos colaterais e apresentam limitada eficácia terapêutica. Tendo em vista, os resultados pré-clínicos obtidos por nosso grupo e o depósito das patentes (PI11063025 e WO/2013/05989) envolvendo a lactona sesquiterpênica (LS) licnofolida (Lic) nanoencapsulada (NC), que apresentou elevada eficácia anti-*T. cruzi*, inclusive em cepas 100% resistentes ao tratamento usual BZ e NF, reduzindo a cardiotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, este projeto visa avançar nos estudos desta LS e formulação avaliando sua citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares cardíacas e hepáticas pelo método de Vermelho Neutro; os fenômenos de apoptose e necrose por coloração com Anexina V/iodeto de propídio por citometria de fluxo; possíveis interferências destes polímeros ou da LS no ciclo celular; realizar avaliação tripanocida contra formas amastigotas intracelulares e epimastigotas de *T. cruzi*; e também avaliar a toxicidade aguda *in vivo* da Lic-livre e Lic-NC em camundongos *Swiss*. BZ foi utilizado como grupo controle de referência para comparação. No teste de vermelho neutro, Lic-Livre e Lic-NC não se mostraram citotóxicas até 0,6 µg/mL em células H9c2 e até 2,4 µg/mL para as células HEPG2. Foi verificada maior interferência no ciclo celular de células H9c2 para a formulação nanoencapsulada quando comparada à LS livre. BZ foi o que apresentou maior alteração entre os grupos avaliados (200µg/mL e 400µg/mL). Não foi observado diferença significativa quanto às análises de apoptose e necrose para Lic-Livre e Lic-NC. Os testes em amastigota e epimastigota mostraram que Lic-Livre possui maior ação tripanocida *in vitro* quando comparada à Lic-NC. No teste de toxicidade aguda também não foi observado alterações significativas quanto os parâmetros avaliados. Dessa forma, licnofolida se mostrou eficaz em sua ação anti-*T. cruzi*, em sua forma livre e nanoencapsulada, com diminuição da citotoxicidade em NC quando comparadas. Ainda, em relação ao grupo controle BZ, Lic se mostrou menos citotóxica em todos os parâmetros avaliados. Assim, Lic-Livre e em nanocápsulas se mostraram seguras quanto ao uso em camundongos nas concentrações ótimas de uso da literatura.

**Palavras Chaves:** *Trypanosoma cruzi*, licnofolida, citotoxicidade, nanocápsulas

## SUMMARY

Chagas disease (Dch) remains epidemiologically relevant and is considered neglected by WHO, causing high morbidity and mortality at full working age. The most serious is the lack of adequate prophylactic therapy and effective etiological treatment for this disease. The only drugs currently used are benznidazole (BZ) and nifurtimox (NF). These drugs are administered on a prolonged schedule, cause serious side effects and have limited therapeutic efficacy. In view of the preclinical results obtained by our group and the filing of patents (PI11063025 and WO / 2013/05989) involving the sesquiterpene lactone (LS) nanoencapsulated lyncofolide (Lic), which showed high anti-*T. cruzi* efficacy, including strains 100% resistant to the usual BZ and NF treatment, reducing cardiotoxicity in vitro and in vivo, this project aims to advance the studies of this LS and formulation by evaluating its in vitro cytotoxicity in cardiac and hepatic cell lines by the Neutral Red method; apoptosis and necrosis phenomena by staining with Annexin V / propidium iodide by flow cytometry; possible interference of these polymers or LS in the cell cycle; perform trypanocidal evaluation against intracellular amastigotes and epimastigotes of *T. cruzi*; and also to evaluate the acute in vivo toxicity of Lic and Lic-NC in Swiss mice. BZ was used as a reference control group for comparison. In the neutral red test, Lic-Livre and Lic-NC were not cytotoxic up to 0.6 µg / mL in H9c2 cells and up to 2.4 µg / mL for HEPG2 cells. Greater interference in the H9c2 cell cycle was observed for the nanocapsulated formulation when compared to free LS. BZ presented the greatest alteration between the evaluated groups (200µg / mL and 400µg / mL). No significant difference was observed regarding apoptosis and necrosis analysis for Lic and Lic-NC. The amastigote and epimastigote tests showed that Lic has a higher trypanocidal action in vitro when compared to Lic-NC. In the acute toxicity test, no significant changes were observed regarding the evaluated parameters. Thus, lyncofolide was effective in its anti-*T.cruzi* action, in its free and nanoencapsulated form, with decreased cytotoxicity in NC when compared. In relation to the BZ control group, Lic was less cytotoxic in all evaluated parameters. Thus, Lic and nanocapsules proved to be safe for use in mice at optimal concentrations in the literature.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, lyncofolide, cytotoxicity, nanocapsules

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química do Benznidazol (A) e Nifurtimox (B) .....	10
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da lactona sesquiterpênica Licnofolida .....	11
<b>Figura 3</b> - Delineamento experimental da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> da lactona sesquiterpênica licnofolida e LIC-NC em células da linhagem H9c2e HEPG2.....	27
<b>Figura 4</b> - Delineamento experimental da atividade da lactona sesquiterpênica licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada, nanocapsula branca e de benznidazol sobre formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> . .....	29
<b>Figura 5</b> - Delineamento experimental da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> da lactona sesquiterpênica licnofolida e LIC-NC sobre amastigotas intracelulares em células da linhagem H9c2.....	31
<b>Figura 6</b> - Esquema do delineamento experimental utilizado no teste de toxicidade aguda in vivo da Licnofolida livre e em nanocápsulas segundo o guia do OECD/ANVISA, 2010..	32
<b>Figura 7</b> - Avaliação da citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de Licnofolida, Licnofolida em nanocápsulas, nanocápsulas vazias ou benznidazol em células da linhagem H9c2 pela metodologia Vermelho Neutro .....	34
<b>Figura 8</b> - Avaliação da citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de Licnofolida, Licnofolida em nanocápsulas, nanocápsulas vazias ou benznidazol em células da linhagem HEPG2 pela metodologia Vermelho Neutro. ....	36
<b>Figura 9</b> - Análise do ciclo celular de células HEPG2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 h. ....	38
<b>Figura 10</b> - Análise do ciclo celular de células HEPG2 tratadas com Licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol /24 .....	41
<b>Figura 11</b> - Análise do ciclo celular de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 h .....	42
<b>Figura 12</b> - Análise do ciclo celular de células H9c2 tratadas com Licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol / 24 h .....	43
<b>Figura 13</b> - Taxas de apoptose e necrose em gráfico de barras de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas.....	44
<b>Figura 14</b> - Histograma de pseudocores representativo das taxas de apoptose e necrose de células HEPG2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas .....	45
<b>Figura 15</b> - Taxas de apoptose e necrose em gráfico de barras de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas.....	46
<b>Figura 16</b> - Histograma de pseudocores representativo das taxas de apoptose e necrose de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas .....	47
<b>Figura 17</b> - Porcentagens (%) de viabilidade de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> após tratamento com Licnofolida livre (Lic), licnofolida nanoencapsulada (Lic-NC), nanocapsulas vazias (NC-BR) e benznidazol (BZ) por ensaio com resarzurina. CM: controle de morte. * P <0,05 comparado ao controle .....	48

<b>Figura 18</b> - Atividade da licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada, nanocapsulas vazias e do benznidazol sobre o índice de infectividade de células H9c2 pela cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	49
<b>Figura 19</b> - Peso corporal relativo de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas tratados com dose única de licnofolida livre, nanoencapsulada e nanocapsulas vazias, observados por 14 dias.....	54
<b>Figura 20</b> - Parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas obtidos 14 dias após o tratamento por via oral e intravenosa com Licnofolida livre, nanoencapsulada e nanocápsulas vazias.....	55
<b>Figura 21</b> - Parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swiss</i> machos e fêmeas 14 dias após administração oral de Licnofolida livre, nanoencapsulada e nanocápsulas vazias .....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Efeitos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> da Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ no tratamento de células H9c2 infectadas com a cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50
<b>Tabela 2 -</b> Índice de seletividade da Lic, Lic-NC e benznidazol (BZ) oriundos da relação da citotoxicidade (IC50%) e índice de inibição (IC50%) da infecção de células H9c2 com a cepa Y de <i>Tripanosoma cruzi</i> .....	51

## LISTA DE SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina transmaninase
<b>AST</b>	Aspartato transaminase
<b>BR</b>	Branca
<b>Bz</b>	Benznidazol
<b>CFR</b>	Reação de Fixação do Complemento
<b>CM</b>	Controle marcado
<b>CNM</b>	Controle não marcado
<b>CNT</b>	Controle não tratado
<b>CV</b>	Controle de vida
<b>DCh</b>	Doença de Chagas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desorribonucléico
<b>EDTA</b>	Ethylenediamine tetraacetic acid
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>ELISA</b>	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
<b>H9c2</b> cardiomiócitos)	American Type Culture Collection, (ATCC: CRL 1446 – Células
<b>HEPG2</b>	Hep G2 é uma linhagem imortal derivada do tecido hepático de um adolescente americano de 15 anos de idade, descendente de europeus, com carcinoma hepatocelular diferenciado (ATCC: HB-8065)
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>Hm</b>	Hemácias
<b>Ht</b>	Hematócrito
<b>IC50</b> 50%	Concentração da substância ativa que reduz o número de parasitas em
<b>IE</b>	Índice endocítico
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G
<b>IHA</b>	Imunofluorescência indireta
<b>IS</b>	Índice de Seletividade

<b>G1</b>	Gap 1
<b>G2</b>	Gap 2
<b>LADOC</b>	Laboratório de doença de Chagas, NUPEB, UFOP
<b>LAFEPE</b>	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
<b>LAPLAMED</b>	Laboratório de Plantas Medicinais
<b>Leuc</b>	Leucócitos
<b>LIC</b>	Licnofolida
<b>LS</b>	Lactona Sesquiterpênica
<b>M</b>	Mitose
<b>NC</b>	Nanocápsulas
<b>NIF</b>	Nifurtimox
<b>NOAL</b>	“No observed adverse effect level”
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PLAQ</b>	Plaquetas
<b>PLAPEG</b>	Ácido poli-lático associado ao polietilenoglicol
<b>qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
<b>RENAME</b>	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
<b>S</b>	Síntese
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>VN</b>	Vermelho Neutro
<b>WHO</b>	"World Health Organization"
<b>XD</b>	Xenodiagnóstico
<b>XO</b>	Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

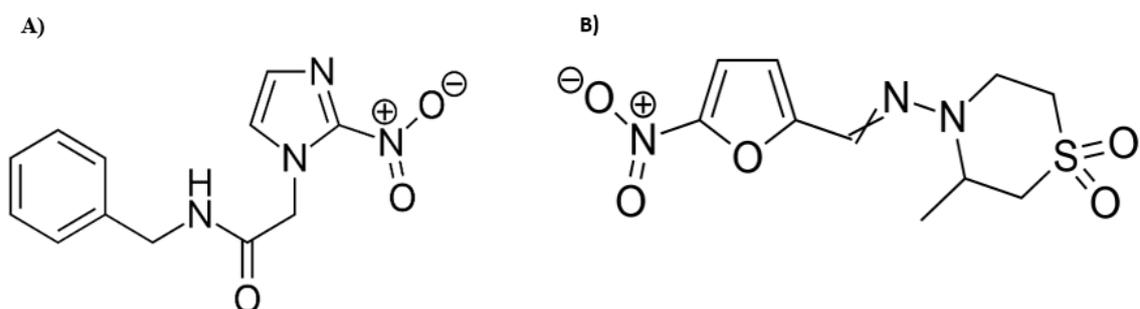
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1. Doença de chagas e <i>Trypanozoma cruzi</i> .....	12
2.2. Epidemiologia.....	13
2.3. Diagnóstico e prevenção.....	14
2.4. Tratamento da doença de Chagas atual e novas alternativas.....	16
2.5. Produtos naturais .....	18
2.6. Novos tratamentos .....	19
2.7. Lactona Sesquiterpênica: Licnofolida .....	20
3. JUSTIFICATIVA .....	22
4. OBJETIVO GERAL.....	23
4.1. Objetivos Específicos .....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1. Substâncias e fármaco utilizados.....	25
5.1.1. Licnofolida e formulações nanoestruturadas.....	25
5.1.2. Solução Licnofolida livre, LIC-NC e benznidazol.....	25
5.1.3. Benznidazol (BZ) .....	25
5.2. Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i> da licnofolida, Lic-NC e do benznidazol....	25
5.2.1. Cultivos de células H9c2 e HEPG2.....	25
5.2.2. Preparo das placas com as células H9c2 e HEPG2 .....	26
5.2.3. Ensaio de citotoxicidade da licnofolida e LIC-NC em células H9c2 e HEPG2 utilizando o vermelho neutro.....	26
5.2.4. Ensaio de toxicidade da goyazensiloda, licnofolida e LIC-NC em células H9c2 e HEPG2 utilizando o ensaio de ciclo celular .....	27
5.2.5. Ensaio de toxicidade licnofolida e LIC-NC em células H9c2 e HEPG2 utilizando o ensaio de apoptose necrose.....	28
5.2.6. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> de goyasensolida, licnofolida e LIC-NC sob formas epimastigotas .....	28
5.2.7. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> da licnofolida e LIC-NC sobre formas amastigotas intracelulares: definição da IC <sub>50</sub> .....	30
5.2.7.1 Índice de Seletividade.....	31
5.3. Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> da Licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada e nanocápsulas vazias.....	32
5.3.1. Análises hematológicas, hepática, renal e histopatologia .....	33

6. RESULTADOS .....	34
6.1. Resultados <i>in vitro</i> .....	34
6.1.1. Ensaio de citotoxicidade da licnofolida e LIC-NC em células H9c2 e HEPG2 utilizando o vermelho neutro .....	34
6.1.2. Ensaio de toxicidade licnofolida livre, nanoencapsulada e benznidazol em células HEPG2 e H9c2 utilizando o ensaio de ciclo celular.....	37
6.1.3 Ensaio de toxicidade da licnofolida e LIC-NC em células H9c2 e HEPG2 utilizando o ensaio de apoptose necrose.....	44
6.1.4. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> da licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas brancas e benznidazol sob formas epimastigotas .....	48
6.1.5. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> da licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas brancas e benznidazol sobre formas amastigotas intracelulares: definição do IC <sub>50</sub> .....	49
6.2. Resultados <i>in vivo</i> .....	51
6.2.1. Toxicidade aguda.....	51
6.2.1.1. Atividade dos tratamentos com formulações de Licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada e nanocápsulas vazias em camundongos saudáveis .....	51
7. DISCUSSÃO .....	58
8. CONCLUSÃO.....	64
9. REFERÊNCIAS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DCh), descoberta por Carlos Chagas em 1909, é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, de curso crônico e que permanece, ainda hoje, negligenciada, inclusive em relação ao seu tratamento. O parasito, é transmitido pela urina e/ou fezes contaminadas de seu vetor, o barbeiro, e ainda por mecanismos independentes.

Desde a sua descoberta, uma grande variedade de compostos foi investigada para seu tratamento, buscando sempre um agente quimioterápico seguro e eficaz (BAHIA et al., 2014). A doença de Chagas é considerada negligenciada e existem apenas dois fármacos disponíveis para tratamento, o derivado de nitroimidazólico-benznidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazole acetamide) (BZ) e o nitrofurano-nifurtimox (3-metil-4-nitrofurfurilidenoamino-tetra-hidro-4H-1,4-tiazina -1,1-dióxido) [NF (**Figura 1**)], sendo apenas BZ disponível no Brasil pela distribuição no Sistema Único de Saúde (SUS), de acordo com a RENAME.



**Figura 1** - Estrutura química do Benznidazol (A) e Nifurtimox (B)

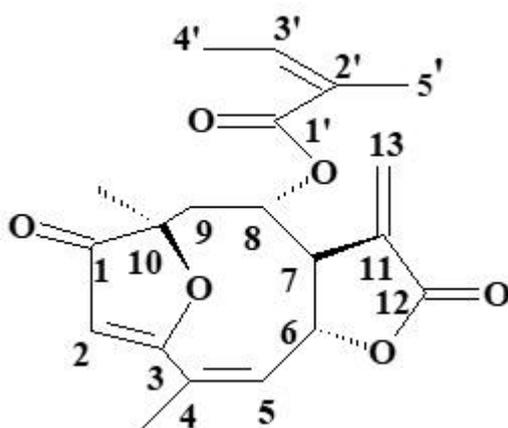
O tratamento da DCh é desafiador, onde os fármacos, por não permanecerem no meio intracelular, são efetivos apenas nas fases aguda e crônica recente, apresentando grandes limitações para o tratamento da fase crônica quando os índices de cura são inferiores (COURA e CASTRO, 2002, II CONSENSO 2015). Quando observado do ponto de vista dos efeitos colaterais, percebe-se que são muitos e bastante presentes, por exemplo dores de cabeça, náusea, neuropatia periférica, entre outros. Assim, a farmacoterapia fica comprometida como resultado da falta de adesão dos pacientes, o que implica na necessidade da busca de novas terapias mais seguras e eficazes.

Com base nisso, pode-se observar a necessidade da busca por outros compostos ativos contra o *T. cruzi*, a partir da compreensão da importância da presença do *T. cruzi* como

desencadeador e mantenedor da condição patológica, juntamente com avanços substanciais na compreensão dos mecanismos imunopatogênicos. Isso significou novo vigor aos estudos de novos alvos e estratégias terapêuticas para esta parasitose.

Neste contexto, os isolados de produtos naturais representam uma imensa fonte de compostos que poderiam potencialmente ser ativos contra protozoários (CROFT *et al*, 2005; SALEM e WERBOVETZ, 2006). A família Asteracea é a maior família de plantas conhecida até o momento que possui as lactonas sesquiterpênicas (LS) como marcadores químicos, sendo estas potencialmente ativas contra diversos tripanosomatídeos (BOHLMANN *et al.*, 1980). Algumas destas lactonas foram testadas *in vitro* e *in vivo* e apresentaram significativa atividade anti-*T. cruzi*. (SULSEN *et al*, 2008; SULSEN *et al*, 2011, Branquinho *et al* 2014, Mello *et al.*, 2016).

Logo, este trabalho apresenta a avaliação da citotoxicidade *in vivo* e toxicidade aguda *in vivo* de uma lactona sesquiterpênica, Licnofolida (Lic) livre e nanoencapsulada (Lic-NC), isolada da *Lychnophora trichocarpha*, (Figura 2) considerada ativa contra o agente etiológico da DCh em trabalhos anteriores.



**Figura 2** - Estrutura química da lactona sesquiterpênica Licnofolida

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Doença de chagas e o *Trypanozoma cruzi*

A doença de Chagas (DCh) é endêmica nas Américas Central e do Sul, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta endemia representa, na atualidade, um novo desafio mundial devido a sua expansão para países não endêmicos, como os Estados Unidos, Canadá, Japão, França, Espanha, Austrália e países asiáticos como resultado da migração de indivíduos infectados (SCHMUNIS e YADON, 2010; COURA, 2013), onde o parasito continua sendo transmitido por mecanismos independentes do inseto vetor, tais como transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplantes e uso compartilhado de seringas. Transmitida nas Américas por triatomíneos hematófagos da família *Reduvidae*, a DCh permanece negligenciada apesar de atingir cerca de 8 milhões de pessoas no mundo e causar cerca de 10.000 óbitos por ano (WHO, 2018).

A transmissão da DCh para o hospedeiro vertebrado ocorre quando as fezes e urina do triatomíneo contendo os tripomastigotas metacíclicos infectantes contaminam mucosas, conjuntivas e/ou superfícies corporais lesionadas. Além da transmissão vetorial, pode-se citar várias outras formas de transmissão do protozoário ao hospedeiro definitivo: transmissões congênita ou vertical; oral pela ingestão de alimentos, como açaí ou caldo de cana, que contenham fezes e/ou urina do barbeiro contaminadas pelo *T. cruzi*; por acidentes laboratoriais; transfusões sanguíneas ou transplante de órgão caso o doador esteja também infectado pelo *T. cruzi*. (WHO, 2018; COURA e DIAS, 2009)

Como porta de entrada para o agente etiológico da DCh, tem-se a mucosa oral e ocular e lesões na pele, que quando íntegra funciona como uma eficiente barreira ao *T. cruzi*. A transmissão da DCh para o hospedeiro vertebrado ocorre quando as fezes e urina contendo os tripomastigotas metacíclicos infectantes contaminam mucosas, conjuntivas e/ou superfícies corporais lesionadas. Essas formas evolutivas, ao penetrarem no hospedeiro, invadem os fagócitos mononucleares sendo capazes de escapar de seus mecanismos de destruição e se transformarem em amastigotas no citoplasma destas células, aproximadamente 35 horas pós-infecção. Após a multiplicação no citoplasma das células hospedeiras, se diferenciam em tripomastigotas, e posteriormente são liberados por ruptura celular alcançando o sistema circulatório, passando então a ser denominados tripomastigotas sanguíneos, potencialmente infectantes para qualquer célula nucleada (GARCIA e

AZAMBUJA 1997; LANA e MACHADO, 2017) ou para o inseto vetor durante o repasto sanguíneo, completando assim o ciclo evolutivo do parasito.

Após a infecção e um subsequente período de incubação, tem-se o início da fase aguda da DCh (PRATA, 2001). Essa fase da doença se apresenta, na grande maioria dos casos, na forma oligossintomática (PRATA, 2001). Quando sintomática pode apresentar manifestações clínicas tais como: febre, edema, mialgia, hipertrofia dos linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, e sintomas neurológicos. Na fase aguda podem ocorrer ainda os fenômenos de porta de entrada inicial do parasito, tais como o edema palpebral (sinal de Romaña) e subcutâneo (chagoma de inoculação), que auxiliam muito na suspeita clínica da DCh (PRATA, 2001). Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, as manifestações clínicas da fase aguda regridem e instala-se gradativamente a fase crônica, na qual a parasitemia é escassa e subpatente, mas persistente por toda a vida. A fase crônica pode ser subdividida em forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista. A forma indeterminada é definida como um estado no qual o indivíduo apresenta-se assintomático, mas com sorologia positiva, xenodiagnóstico e/ou hemocultura e PCR positivos ou não, dano cardíaco discreto causado pela persistente inflamação, que não reflete em alterações no ECG convencional, e em exames radiológicos do tórax e abdômen. A forma indeterminada dura cerca de 10 a 20 anos, ou mesmo pelo resto da vida do paciente (PRATA, 2001; RASSI *et al.*, 2010). Cerca de 30 a 40% dos indivíduos infectados evoluem para as formas sintomáticas da DCh crônica. A forma cardíaca, que ocorre em cerca de 30% dos casos, é caracterizada por sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e alterações eletrocardiográficas de gravidade variável. Ela é responsável pela maioria dos óbitos decorrentes da infecção chagásica, sendo considerada a forma clínica mais grave da doença pela ocorrência frequente do fenômeno de morte súbita (PRATA, 2001; RASSI *et al.* 2010). A forma digestiva (10% dos casos) é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais do esôfago e do cólon, principalmente. Pacientes com a forma mista apresentam sintomatologias cardíaca e digestiva associadas (PRATA, 2001; RASSI *et al.* 2010).

## **2.2. Epidemiologia**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2018), a DCh é encontrada nas áreas endêmicas, em 21 países da América-latina, além de estar presente em todo o mundo, com mecanismos de transmissão independentes do inseto vetor, onde o número estimado de pessoas infectadas pelo protozoário chega a cerca de 8 milhões. Dados de 2010

documentaram 5.742.167 pessoas infectadas por *T. cruzi*. Destas, 3.581.423 (62,4%) moravam em Países do Cone Sul, como Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821), o México (876.458) e a Bolívia (607.186) (DIAS, 2015).

A prevalência do *T. cruzi* é regular quando observados os parâmetros de idade, área geográfica e condição socioeconômica (SCHMUNIS, 2010), sendo que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), a doença é negligenciada devido à essa ligação aos fracos aspectos econômicos e sócio-culturais. Em relação à idade e área geográfica, pode-se observar alta prevalência da enfermidade em idosos e áreas urbanas (MARTINS-MELO et al, 2013). Essa porcentagem de prevalência pode variar de acordo com o tempo, dado que apresentou níveis mais baixos desde 2000 (MARTINS-MELO et al, 2013).

Devido a sua peculiar epidemiologia, a Dch continua sendo um complexo problema de saúde pública para os países endêmicos, a exemplo do Brasil. Assim sendo, pode ser caracterizada pela diversidade de situações de risco, tais como grande número de vetores e reservatórios potenciais, variadas formas de infecção, diferentes estoques do parasito que circulam nos ambientes domiciliares, peridomiciliares e silvestres, ausência de medidas profiláticas e de recursos terapêuticos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo (DIAS e SCHOFIELD, 2002).

### **2.3. Diagnóstico e prevenção**

Durante o período patente da fase aguda da infecção, o parasito hemoflagelado é presente na corrente sanguínea e, por esse motivo, opta-se pelo uso de metodologias parasitológicas diretas para sua detecção nos indivíduos. Dois possíveis testes muito empregados nestes casos são esfregaço sanguíneo e exame de sangue a fresco, sendo o último mais sensível e considerado de escolha (GOMES, 2009). Técnicas de maior sensibilidade nesta fase compreendem a hemocultura, PCR e o xenodiagnóstico, uma vez que a quantidade de sangue coletada, aliada a princípios distintos capazes de aumentar a chance de confirmação da presença do parasito, também podem ser empregadas. Na fase crônica os principais métodos para diagnóstico empregados são de princípios sorológicos (FIOCRUZ, 2017), o *T. cruzi* é encontrado no interior das células musculares, principalmente do músculo cardíaco (SIMÕES et al, 2018), sendo incomum e raro os momentos onde este parasito esteja livre na corrente sanguínea, local onde o sistema imunológico atua em seu combate continuamente.

Inicialmente, desde sua descoberta até 1960, a Dch era diagnosticada por xenodiagnóstico (XD) na fase aguda, enquanto na fase crônica se realizavam reações de fixação do complemento (CFR), um diagnóstico sorológico (GOMES, 2009). No segundo período, estabelecido entre 1960 e 1975, para a fase aguda utilizavam-se primeiramente o método esfregaço de sangue e inoculação em animal de laboratório, desenvolvidos por Chagas, e posteriormente foi convencionado o uso do método de Strout's sendo a hemocultura realizada na fase crônica (GOMES, 2009). Após o estabelecimento deste teste, metodologias de princípios distintos e sensibilidade elevada foram acrescentadas, surgindo então a hemaglutinação indireta (IHA), imunofluorescência indireta IFI e o teste imunoenzimático de ELISA para diagnóstico na fase crônica da infecção (GOMES, 2009).

Já no terceiro período desde a descoberta da doença, datado de 1975 até os dias atuais, estão sendo adaptados e utilizados métodos mais modernos de diagnóstico tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Agora métodos como reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) são utilizados, considerados métodos extremamente sensíveis e quantitativos, específicos e promissores para detecção da DCh, apesar de seu elevado custo de operação (GOMES, 2009; MUÑOS, MURCIA E SEGOVIA, 2011).

Durante a fase aguda, quando se tem um resultado negativo na pesquisa parasitária direta, pode ser realizado a busca por anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgM em sangue periférico, sendo o resultado positivo neste teste, junto de sinais e sintomas característicos, indicativo de fase aguda da DCh. Esse teste é feito principalmente na fase crônica recente, quando a probabilidade dos resultados da pesquisa parasitológica direta serem negativos é maior (DIAS et al, 2015).

Segundo Cançado (1999) e Gomes (2009), pelo fato da fase crônica da DCh ser caracterizada por níveis baixos de parasitos circulantes e níveis altos de anticorpos anti- *T. cruzi* do tipo IgG, o diagnóstico deve ser, principalmente, sorológico, com testes de alta sensibilidade e especificidade (DIAS et al, 2015), por metodologias como imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (IHA) e ELISA.

Os sintomas iniciais da DCh são manifestações clínicas comuns a várias outras doenças, por esse motivo é importante realizar o diagnóstico diferencial com o objetivo de contribuir para um diagnóstico precoce e outras medidas adicionais (VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009).

## 2.4. Tratamento da doença de Chagas atual e novas alternativas

Como descrito por Coura (2009) e evidente até os dias atuais, apenas dois medicamentos são usados para o tratamento da DCh, tanto para a fase aguda quanto para a fase crônica da infecção. São eles: benznidazol (BZ) e nifurtimox (NIF), sendo apenas o primeiro comercializado no Brasil.

Ambas as terapias não atendem ao que é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um bom medicamento, onde as características necessárias são: (I) Cura parasitológica tanto na fase aguda quanto crônica da infecção; (II) Ter máxima eficácia em dose única ou poucas doses; (III) ser de baixo custo e fácil aquisição; (IV) não possuir efeitos adversos ou teratogenicidade; (V) Desnecessária hospitalização para o tratamento; (VI) não indução de resistência (COURA E CASTRO, 2002; COURA, 2009).

NIF é um 5-nitrofurano (3-metil-4- (5'- nitrofurfurilideneamina) 1,1-dióxido de tetrahydro-4H-1,4-tiazina, derivado de 5-nitrofurfurilideno, e foi o mais ativo testado experimentalmente (COURA E CASTRO, 2002). Em seu mecanismo de ação, produz radicais nitro-aniônicos que, na presença de oxigênio, deixam o *T. cruzi* incapaz de desintoxicar os radicais livres (COURA, 2009). Já BZ é um 2- nitroimidazole (N-benzil-2-nitroimidazole acetamida) e mostrou alta atividade contra o *T. cruzi*, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (COURA E CASTRO, 2002). O mecanismo de ação deste fármaco está ligado a nitroredução de componentes do parasito e à ligação de metabólitos ao DNA nuclear, ao k-DNA e aos lipídeos e proteínas do parasito (COURA, 2009).

NIF e BZ possuem atividade tanto na fase aguda quanto crônica recente da infecção e os resultados obtidos em ambos os tratamentos variam de acordo com a fase da doença, período de tratamento e dose, assim como com a localidade geográfica em decorrência de distintas cepas existentes de *T. cruzi* (COURA E CASTRO, 2002). Apesar de apresentarem efeitos nas duas fases, estes são limitados no estágio crônico tardio. Portanto as principais indicações para o tratamento são fase aguda da infecção, forma de transmissão congênita, reativação associada com imunossupressão, infecções recentes e em situações de transfusões ou transplante de órgãos. A indicação dos fármacos para a fase crônica é questionável devido à baixa eficácia do tratamento (JORGE E CASTRO, 2000). Conforme Cançado (1999), a taxa de cura durante a fase aguda da doença é maior, diferente da fase crônica que possui lenta soroconversão negativa. Entretanto todos os infectados devem fazer o tratamento devido ao aumento da sobrevida e atraso no aparecimento de sintomatologia clínica, mesmo

que não haja cura (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA DOENÇA DE CHAGAS, 2018).

Devido ao mecanismo de ação pouco específico do BZ, são observadas elevadas reações adversas que culminam, muitas vezes, no abandono do tratamento por parte dos indivíduos chagásicos, tais como: (I) sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas, edema generalizado; (II) depressão do sistema imune; (III) polineuropatia e parestesia (COURA e CASTRO, 2002). O NF se notabiliza ainda mais pela vasta apresentação de efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais (anorexia, perda de peso, náusea, vômito e diarreia) que ocorrem em cerca de 70% dos pacientes (CASTRO *et al.*, 2006). Os efeitos neurotóxicos incluem dor de cabeça, mialgia, irritabilidade, insônia, desorientação e tremores. Alguns efeitos mais sérios, porém mais raros, são parestesias, polineuropatia e neurites periféricas (PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2015).

A alta reatividade dos metabólitos formados por meio do mecanismo de ação do NF e BZ faz com que estes possam atuar também em outros sistemas, especialmente do hospedeiro (humano). Estudos tóxicos experimentais com ambos os compostos anti-*T. cruzi* evidenciaram efeitos mais graves que os demonstrados na clínica, tais como efeitos deletérios em tecidos da adrenal, do cólon, do esôfago e de glândulas mamárias. O NF apresentou neurotoxicidade, danos testiculares e toxicidade ovariana. No caso do BZ, houve uma competição do metabolismo de muitos xenobióticos biotransformados pelo sistema citocromo P450. Além disso, ambos exibiram significativo efeito mutagênico e ainda tumorigênicos ou carcinogênicos (CASTRO *et al.*, 2006). Além de todos esses efeitos colaterais descritos, ambos requerem longos períodos de tratamento (BZ 60 dias e NF até 90 dias), sendo que todos esses aspectos colaboram para a baixa adesão dos pacientes no tratamento desta enfermidade (ESPUELAS *et al.*, 2012).

O ponto mais complexo do tratamento da DCh é a avaliação de cura e deve ser avaliado tanto a cura parasitológica, que representa a eliminação total dos parasitos da corrente sanguínea e dos tecidos, quanto a clínica, que representa a eliminação total dos sinais e sintomas (Coura e Castro, 2002). Para considerar a cura deve-se obter testes parasitológicos, sorológicos e PCR negativados (DIAS *et al.*, 2015).

Estas informações ilustram as limitações do tratamento disponível atualmente e evidenciam a necessidade da avaliação de novos fármacos que apresentem atividade anti-*T. cruzi* ou de novos regimes de tratamento. Por muitos anos, devido a hipóteses que atribuíam à auto-imunidade o papel de mantenedora das lesões teciduais características da doença

(CUNHA NETO e KALIL, 1995), o papel do parasito como condição essencial para desenvolvimento da patologia foi subestimado, levando à atrasos significativos no que tange à pesquisa por novas estratégias terapêuticas para a DCh. Conseqüentemente, o interesse em pesquisa e desenvolvimento de seu tratamento etiológico foi desestimulado. Aliado a isso, a DCh é caracterizada como uma doença negligenciada do ponto de vista terapêutico, devido à falta de investimento em novas terapias por parte da indústria farmacêutica, o que decorre das características socioeconômicas da população majoritariamente afetada e da evolução dos programas de controle da DCh existentes nos países endêmicos (SCHOFIELD, 2006). Adicionalmente, a ausência de marcadores de cura e da progressão da patologia, que culminam na falta de estímulo quanto a indicação do tratamento da DCh por parte da classe médica, também dificultam o desenvolvimento de testes clínicos de novos fármacos, limitando sua pesquisa. A tudo isto acrescenta-se a falta de estímulo quanto a indicação do tratamento da DCh por parte da classe médica.

Esse conjunto de fatores limitaram, em parte, a busca por novos alvos e estratégias terapêuticas mais eficazes por vários anos. Entretanto, o atual cenário dos estudos sobre a quimioterapia da DCh é mais animador. Com isso, recentemente novas opções de tratamento foram propostas, incluindo os inibidores da síntese do ergosterol, em particular os inibidores da enzima C14- $\alpha$ -dimetilase (CYP51) e a pesquisa por novas substâncias e de produtos naturais que possuam atividade anti-*T. cruzi*.

## **2.5. Produtos naturais**

Na natureza são produzidas a maioria de substâncias orgânicas, sendo o reino vegetal o maior responsável por essa multiplicidade. Produtos derivados de plantas representam uma imensa fonte de compostos que poderiam ser potencialmente ativos contra protozoários (CROFT *et al*, 2005; SALEM e WERBOVETZ, 2006). Apesar dos produtos de origem natural terem sido extensivamente estudados, ainda existem inúmeros compostos a serem descobertos e avaliados quanto sua ação anti-*T. cruzi*.

Desde a antiguidade são usados pela humanidade para fins medicinais, estética, aroma ou outros. Segundo Bolzani e colaboradores (2006), a ingestão de ervas e folhas com o objetivo de alívio e cura talvez fora uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais observadas.

Segundo Coura e Castro (2002), os produtos naturais representam metade dos produtos farmacêuticos em uso na atualidade, mas houve uma mudança devido ao avanço das

pesquisas para a descoberta de novos fármacos e síntese de novas moléculas. Apesar das moléculas sintéticas predominarem o mercado atual, as substâncias naturais vêm recuperando seu espaço na indústria através da busca por terapias naturais ou como ponto de partida para criação de novas moléculas bioativas (BOLZANI, 2006).

Chiari (1996) observou em triagem *in vitro* de extratos ativos da planta da família *Asteracea* que 11 (23%) das espécies de plantas utilizadas foram ativas contra o *T. cruzi*, dentre elas: *Eremanthus glomerulatus*, *Lychnophora passerina*, *L. pinaster* e *L. trichocarpha*. Cinco destas onze lactonas eliminaram 100% dos parasitos (cepa Y e CL) nas duas concentrações testadas (12.0 mg/mL e 6.0 mg/mL). Ainda, em avaliações *in vivo*, sangue com tripomastigotas sanguíneos retirados de camundongos na fase aguda da infecção foram tratados previamente com os extratos e posteriormente inoculados em camundongos não infectados, sendo eficiente para inibir o parasito e não gerar infecção nos animais saudáveis, sendo *L. passerina* e *Vernonia pedunculata* as mais ativas.

## 2.6. Novos tratamentos

No Brasil apenas o BZ é disponibilizado pelo SUS. Na Argentina, Chile e Uruguai também apenas este medicamento disponível para o tratamento da DCh, sendo poucos outros compostos testados em pacientes chagásicos (COURA E CASTRO, 2002). De acordo com Muños, Murcia e Segovia (2011) desde que foi percebido as limitações terapêuticas de BZ e NIF, há a busca de outras abordagens para a terapia da DCh.

Para desenvolver um novo fármaco os pesquisadores devem, primeiro, fazer a descoberta de uma estrutura química principal, com um apropriado grupo farmacofórico que tenha a atividade biológica desejada e que deve ser mantido durante as transformações químicas. O desenvolvimento desse composto envolve algumas etapas como: (I) isolar ou sintetizar o composto; (II) Analisar a atividade biológica em testes *in vitro* e *in vivo*; (III) identificar as diferenças entre o parasito e o hospedeiro; (IV) relação estrutura/atividade visando os melhores parâmetros farmacocinéticos; (V) estudos estruturais; (VI) produção de compostos com variadas estruturas químicas (COURA E CASTRO, 2002). Jorge e Castro (2000) consideram um desafio utilizar tanto uma abordagem racional quanto uma abordagem empírica para a produção de novos fármacos com as melhores características.

De acordo com Silva e colaboradores (2013), a busca por novas terapias é uma forma de se desviar da baixa tolerância e eficácia limitada do tratamento atual, principalmente ao

se analisar a fase crônica da infecção, e também é um meio de oferecer outra alternativa para pacientes refratários ao BZ.

Em estudos envolvendo quimioterapia da Dch, Romanha e colaboradores (2010) determinaram alguns critérios a serem avaliados: para a realização de todo o procedimento de estudo *in vitro* deve-se (I) definir a linhagem celular a ser usada assim como a cepa e a forma dos parasitos; (II) automatizar os procedimentos; (III) determinar pontos importantes no estudo como IC<sub>50</sub> (a concentração de substância que elimina 50% dos parasitos), índice de seletividade (IS) e comparar esses pontos com o fármaco padrão, o BZ. Para realizar a evolução dos estudos *in vitro* para *in vivo*, Romanha e colaboradores (2010) ainda determinaram outros critérios a serem avaliados, como (IV) aspectos éticos em relação ao uso de animais durante a experimentação afim de usar um número reduzido destes; (V) limitação de infraestrutura; (VI) custo e tempo envolvidos para o laboratório; (VII) risco de infecção humana. Já durante os estudos *in vivo* os critérios a serem avaliados são: (I) determinação da toxicidade aguda em modelos murinos [dose máxima tolerada (MTD)]; (II) redução de parasitemia na fase aguda e critérios de corte para seleção de compostos; (III) marcadores parasitológicos na fase aguda (cepas parcialmente sensíveis e resistentes de *T. cruzi*) e critérios de corte para seleção.

## 2.7. Licnofolida

Os produtos naturais de maior grupo já conhecido são os sesquiterpenos, cuja maioria são lactonas sesquiterpênicas (LS). Essas são importantes marcadores taxonômicos da família *Asteraceae* (SEAMAN, 1982) e já possuem alguns efeitos farmacológicos observados, como: anti-inflamatório (HALL ET AL., 1980; ABAD ET AL., 1994, LYSS ET AL., 1997), ANTITUMORAL (LEE ET AL., 1977; WOERDENBAG, ET AL. 1994), e efeitos antimicrobianos (GIESBRECHT ET AL., 1990; TOWERS ET AL., 1977; CHIARI ET AL., 1991; 1996).

Chiari e colaboradores (1991) fizeram uma busca por compostos tripanocidas a partir de um teste empírico com substâncias naturais, o que o levou a quatro substâncias altamente ativas, sendo três flavonoides e uma delas uma lactona sesquiterpênica, 15-desoxygoyzensolide, encontrada em plantas da família *Asteraceae*.

Oliveira e colaboradores, em 1996, testaram aleatoriamente grande quantidade de espécies de plantas. Destas, 45 foram ativas contra o *T. cruzi* e 3 pertencem ao gênero

*Lychnophora*, restrito ao Brasil em plantas popularmente conhecidas como "candeia", "arnica" ou "arnica da serra" e usadas como anti-inflamatórios e anti-reumático inicialmente.

Um teste feito por Chiari e colaboradores, em 1996, com 47 espécies, teve resultado anti-*T. cruzi* positivo em 11, dentre estas 3 são do gênero *Lychnophora* (*Lychnophora passerina*, *L. pinaster*; *L. trichocarpha*) e a *L. passerina* se mostrou a espécie mais ativa contra o parasito causador da Dch. Dessas plantas analisadas foram investigadas substâncias tripanocidas presentes sendo encontrados as sesquiterpenelactonas goyazensolide, eremantholide C e lychnopholide como substâncias promissoras. Nenhuma delas possui hidrossolubilidade como característica (CHIARI et al, 1996), fator importante no momento da produção da nanocapsula de núcleo oleoso. A licnofolida (LIC), isolada da *Lychnophora trichocarpha*, apresenta atividade tripanocida, mas possui atividade terapêutica limitada devido às suas características físico-químicas associadas, como alta lipofilia (log P 5.03) e consequentemente baixa solubilidade aquosa, além de instabilidade em meio alcalino. Esses fatores dificultam a administração oral da substância (BRANQUINHO et al, 2014). Visto que as restrições da substância a impedem de ser absorvida pelo organismo, uma solução apresentada é o sistema carreador de fármacos, onde a substância é nanoencapsulada por um polímero. Quando administrado por via intravenosa, LIC reduziu a parasitemia e aumentou a sobrevida, mas não promoveu a cura. Diferente disso, quando LIC foi encapsulada em nanocápsulas poliméricas houve maior redução da parasitemia e aumento da sobrevida e também altas porcentagens de cura, portanto foi altamente eficaz contra infecção por *T. cruzi* em camundongos. (MELLO et al, 2016)

### 3. JUSTIFICATIVA

A doença de chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é considerada uma doença negligenciada. Existem hoje no mercado apenas dois fármacos ativos contra o *T. cruzi*, que são o benznidazol e o nifurtimox, onde apenas o primeiro preconizado no Brasil. A quimioterapia da doença de Chagas com estes fármacos é de difícil adesão devido aos seus recorrentes efeitos colaterais e, ainda, são ativos apenas nas fases aguda e crônica recente da doença, onde a parasitemia encontra-se patente, não possuindo ação significativa contra as formas teciduais do parasito encontradas na fase crônica da doença (COURA e CASTRO, 2002, DIAS, 2015). Essa falha na quimioterapia da doença de Chagas, aliado ao desinteresse das indústrias farmacêuticas e órgãos governamentais em combatê-la, demonstra a necessidade de se buscar novas substâncias que sejam ativas contra o *T. cruzi* tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença e que apresentem menor frequência de efeitos adversos. Sabendo disso, este trabalho se justifica avaliar a atividade tripanocida *in vitro* da lactona sesquiterpênica licnofolida (LIC), isolada da *Lychnophora trichocarpha*, sendo a LIC já extensamente estudada *in vivo* pelo nosso grupo de pesquisa, com resultados bastante promissores, alcançando taxas de até 100% de cura em camundongos na fase crônica da doença (BRANQUINHO et al 2014; MELLO et al., 2016). Este é um estudo preliminar, onde a lactona será estudada *in vitro* e *in vivo* para comprovação de seus efeitos anti-*T. cruzi*, bem como avaliação de sua possível toxicidade para as células hospedeiras.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Avaliar toxicidade *in vivo* e a citotoxicidade e atividade tripanocida *in vitro* da lactona sesquiterpênica licnofolida (livre e em nanocápsulas) contra as formas epimastigotas e amastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

#### **4.1. Objetivos Específicos**

**a)** Realizar estudo de citotoxicidade *in vitro* da licnofolida livre e licnofolida nanoencapsulada através das técnicas de Vermelho Neutro em células cardíacas H9c2 e hepáticas HEPG2;

**b)** Avaliar a atividade da licnofolida livre e licnofolida nanoencapsulada quanto a possíveis interferências nos estágios do ciclo celular de células cardíacas H9c2 e hepáticas HEPG2;

**c)** Avaliar a citotoxicidade de licnofolida livre e licnofolida nanoencapsulada por ensaio de apoptose e necrose.

**d)** Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de licnofolida livre e licnofolida nanoencapsulada contra a forma epimastigota da cepa Y de *T. cruzi*.

**e)** Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* de licnofolida livre e licnofolida nanoencapsulada contra amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi* em células H9c2 e estabelecer os índices de seletividade (IS).

**f)** Avaliar os sinais de toxicidade aguda da licnofolida quanto aos parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos *Swiss*

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Substâncias e fármaco utilizados**

#### **5.1.1. Licnofolida e formulações nanoestruturadas**

Licnofolida foi isolada a partir da *Lychnophora trichocarpa Spreng* como descrito por Branquinho e colaboradores, 2014 e quantificada pelo método cromatográfico em coluna de filtração de sílica gel.

#### **5.1.2. Solução Lic, Lic-NC e benznidazol.**

Foram feitas soluções estoques de Lic-NC em água, Lic e benznidazol (controle) isolados e purificados dissolvidos em DMSO na concentração de 1,0 mg/mL para os experimentos *in vitro*. Posteriormente foram feitas diluições seriadas em meio DEMEM F12 10% SFB, de modo que a concentração final de DMSO seja sempre inferior a 1%.

As soluções de LIC e LIC NC serão produzidas como descrito por Branquinho e colaboradores (2014).

#### **5.1.3. Benznidazol**

O fármaco utilizado como referência na determinação da eficácia da Lic foi o BZ (2-nitroimidazol-(N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida). O BZ foi doado pela LAFEPE/PE (laboratório responsável pela sua produção no Brasil), e seu isolamento e purificação para efetivação dos testes *in vitro* foi realizado como descrito por Branquinho e colaboradores (2014).

### **5.2. Estudo da atividade citotóxica *in vitro* da Lic, Lic-NC, NC-BR e do benznidazol**

Células da linhagem H9c2 (*American Type Culture Collection*, ATCC: CRL 1446) e células da linhagem HEPG2 (célula epitelial isolada de hepatoblastoma primário humano) foram tratadas com Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ em diferentes concentrações para estabelecer o limiar de citotoxicidade da substância em relação ao fármaco de referência BZ, e também determinar os seus efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras.

#### **5.2.1. Cultivos de células H9c2 e HEPG2**

As células H9c2 e HEPG2 foram mantidas em meio DMEM high glucose líquido suplementado com 10% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina. Garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo as células foram mantidas em estufas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura foi

tripsinizada semanalmente e repicada até as células atingirem confluência ideal para realização dos experimentos.

### **5.2.2. Preparo das placas com as células H9c2 e HEPG2**

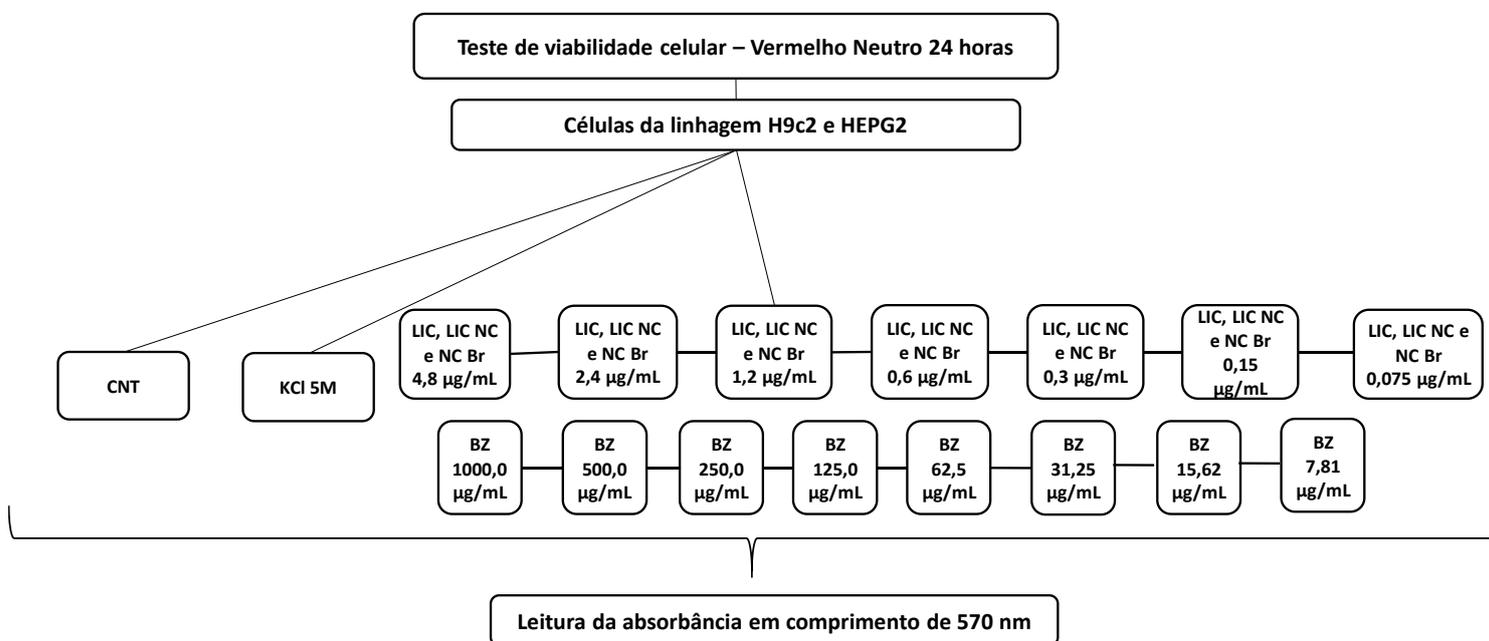
Para preparar as placas testes, as garrafas de cultura celular de 75 cm<sup>2</sup> onde estão as células foram lavadas com PBS estéril, em seguida foi adicionado 3 mL de Tripsina e incubada a 37°C por 5 min. Ao final desse tempo foram adicionados 6 mL de DMEM high glicose, com o intuito de interromper a atividade da enzima. Todo o conteúdo foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e, posteriormente, o sedimento ressuspendido em 1 mL de meio DMEM high glicose. Foi usado o Azul de Trypan® para a contagem de células na câmara de Neubauer. O número de células H9c2 e HEPG2 plaqueadas (10.000 células por poço) foi determinado de acordo com metodologia padronizada no Laboratório de Doença de Chagas (LADOC) baseada em MOSMANN, (1983). As placas com o conteúdo celular foram incubadas por 24h em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C para sua adesão. Após o tempo de incubação proposto o meio de cultura foi descartado e foi adicionado a cada poço da placa cinco concentrações crescentes e equidistantes das substâncias ativas diluídas em DMEM high glicose. Como controles foram utilizados o fármaco de referência (BZ) em cinco diferentes concentrações também crescentes e equidistantes, meio de cultura (controle não tratado - CNT) e solução de KCl 5M como controle de morte celular. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade.

### **5.2.3. Ensaio de citotoxicidade da Lic, Lic-NC e NC-BR em células H9c2 e HEPG2 utilizando o vermelho neutro**

O vermelho Neutro é um teste que avalia dano lisossomal. Consiste na avaliação da capacidade de as células capturarem e armazenarem o corante Vermelho Neutro (hidroclorato de 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-fenazina) nos lisossomas.

Ao realizar o processo descrito no item 5.2.2, foi adicionado 200µL de solução de vermelho neutro na concentração de 50µg/mL em cada poço. Essas microplacas foram incubadas novamente em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 3 horas. Então, o sobrenadante é retirado e 100 µL da solução de fixação [formaldeído (40% v/v), CaCl<sub>2</sub> (10%) e água] foram adicionados a cada poço e deixados por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado, e adicionado 150 µL da solução de distain (50 mL de álcool etílico 96%, 49 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético glacial) para solubilização do corante vermelho neutro. Os

valores de absorvância foram medidos em um espectrofotômetro (Spectra Max340PC384, Molecular Devices), no comprimento de onda de 570 nm (Figura 3). Todo o teste foi realizado em triplicata.



**Figura 3** - Delineamento experimental da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* da lactona sesquiterpênica licnofolida e LIC-NC em células da linhagem H9c2e HEPG2.

Vermelho Neutro: (hidroclorato de 3-amino-7-dimetil-amino-2-metil-fenazina); CNT: Controle não tratado (células incubadas apenas com meio de cultura Lic, Lic-NC e NC-BR): Lic; Lic-NC; NC-BR; KCl 5M: Controle de morte celular (solução de cloreto de potássio na concentração de 5 mol/L; BZ: Benznidazol (fármaco de referência); Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 5.2.4. Ensaio de toxicidade da lic, Lic-NC e NC-BR em células H9c2 e HEPG2 utilizando o ensaio de ciclo celular

As células nas diferentes fases do ciclo celular apresentam diferentes variações de tamanho e de granulosidade que permitem a análise quantitativa destas por meio da citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo.

Para a análise da cinética do ciclo celular  $2 \times 10^5$  células foram semeadas por poço em placas de 12 poços. Após 24 h as células foram tratadas com Lic (0,25 µg/mL, 0,40 µg/mL, 0,70 µg/mL), Lic-NC (0,30 µg/mL, 0,50 µg/mL, 0,80 µg/mL) e NC-BR (0,50 µg/mL, 0,80 µg/mL). As células foram soltas utilizando solução de 0,25% tripsina/EDTA 1X (Invitrogen), ressuspendidas em meio fresco e centrifugadas a 1500 rpm, 10 minutos. O

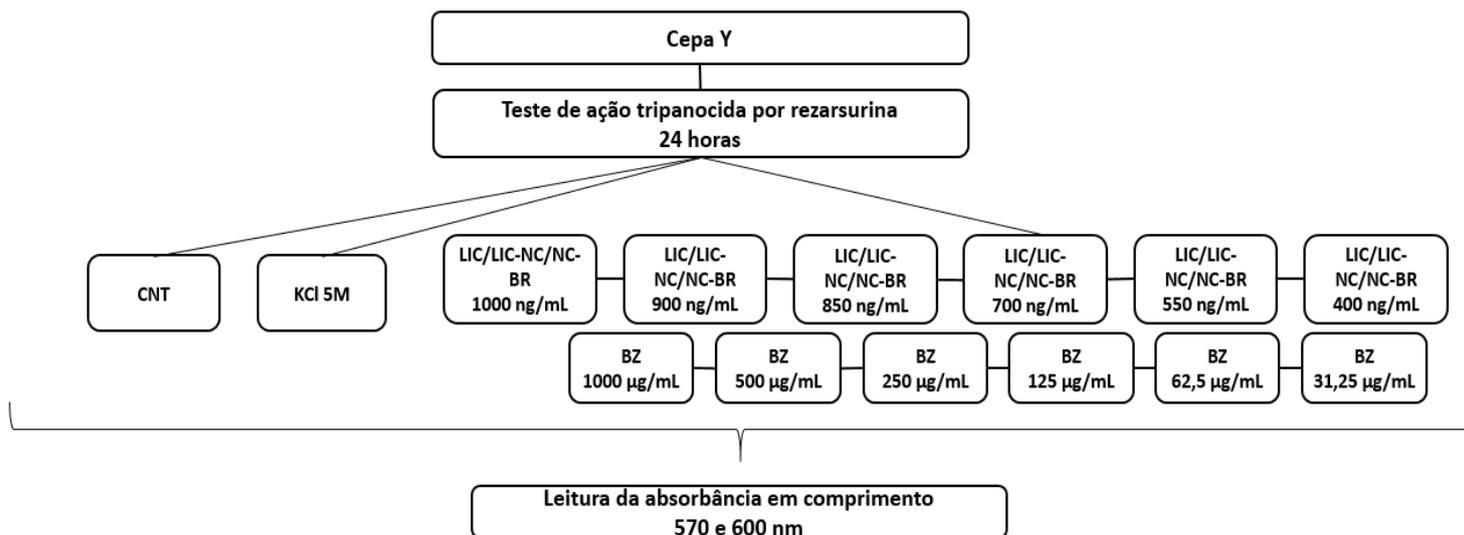
sedimento foi ressuspendido em 200 µl de EHF (50 µg/ml de iodeto de propídio, citrato de sódio a 0,1% e 0,1% de Triton X-100), colocado em gelo e protegido da luz durante pelo menos 30 minutos. A porcentagem de células na fase G0/G1, S e G2 / M foi medida usando a versão 4.2.1 GUAVA Cytosoft software.

#### **5.2.5. Ensaio de toxicidade Lic, Lic-NC e NC-BR em células H9c2 e HEPG2 utilizando o ensaio de apoptose necrose**

As taxas de apoptose foram avaliadas usando o kit FITC de Anexina V-FITC/ Iodeto de Propídio. As células foram semeadas a uma densidade de  $2 \times 10^5$  / placa em placas de 12 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com diferentes concentrações de Lic (0,25 µg/mL, 0,70 µg/mL), Lic-NC (0,30 µg/mL, 0,80 µg/mL), NC-BR (0,30 µg/mL, 0,8 µg/mL) e BZ (200 µg/mL) por 24 h. Após o tratamento, as células foram destacadas usando tripsina e centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. As células foram lavadas com solução de Hank's e centrifugadas (1500 rpm, 10 min). Posteriormente, as células foram marcadas com iodeto de propídio e anexina V, seguindo as instruções do kit. A porcentagem de células não marcadas ou marcadas por iodeto de propídio e / ou anexina V foi medida usando um citômetro de fluxo (BD FACSCalibur) e analisada usando o software Cell Quest. Localizado no Multiusuário do NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (NUPEB/UFOP). O status celular foi definido, de acordo com o kit utilizado, da seguinte forma: as células não coradas foram classificadas como "vivas"; as células coradas apenas pela anexina V foram classificadas como "apoptóticas precoces"; as células coradas pela anexina V e pelo iodeto de propídio foram classificadas como "apoptóticas tardias"; e as células coradas apenas com iodeto de propídio foram classificadas como "necróticas". Dados de 50.000 células foram coletados em cada arquivo de dados e as análises realizadas em triplicado (ALMEIDA et al, 2019).

#### **5.2.6. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* de Lic, Lic-NC e NC-BR sob formas epimastigotas**

Para avaliação inicial de efeito da lactona sesquiterpênica livre e nanoencapsulada em *T. cruzi* foi avaliado a ação dos compostos sob culturas de epimastigotas deste parasito em meio LIT segundo o delineamento experimental (**Figura 4**).



**Figura 4** - Delineamento experimental da atividade da lactona sesquiterpênica licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada, nanocapsula branca e de benznidazol sobre formas epimastigotas do *T. cruzi*.

Inicialmente foi ajustado o número de parasitos para a concentração de  $1,0 \times 10^6/\text{mL}$ . 100µL dessa suspensão foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços. A seguir, concentrações crescentes das drogas, isoladamente, foram adicionadas aos poços contendo os parasitos num volume de 100 µL.

As concentrações de LIC e BZ testadas foram: 1000 ng/mL, 900 ng/mL, 850 ng/mL, 700 ng/mL, 550 ng/mL e 400 ng/mL. Para BZ foram 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL. Foram testados em paralelo, Controles Negativos: (Meio LIT), controles de redução da droga (LIT + droga) e Controles Positivos (LIT + parasitos). As placas foram incubadas em estufa BOD, a 28°C por 24 horas. Após esse período foram adicionados 20 µL de resazurina/poço. Após 3 horas as placas foram lidas em leitor de microplacas (Bio-Rad modelo 680) utilizando filtros de 570nm e 600nm.

Os cálculos dos percentuais de redução do corante e de inibição da proliferação do parasito foram realizados segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[ \frac{A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ Tratado}}{A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ Controle}} \right] \times 100.$$

Sendo:  $A_{570}$  = absorbância a 570nm,  $A_{600}$  = absorbância a 600nm e  $R_0$  = fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de parasitos [ $R_0 = (A_{570} / A_{600})$ ].

A partir do percentual de inibição de cada concentração dos fármacos, foi calculada o  $IC_{50}$  (concentração inibitória do fármaco, que induz 50% do efeito analisado, inibição da

proliferação parasitária), utilizando o programa *CompuSyn*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com no mínimo 2 repetições.

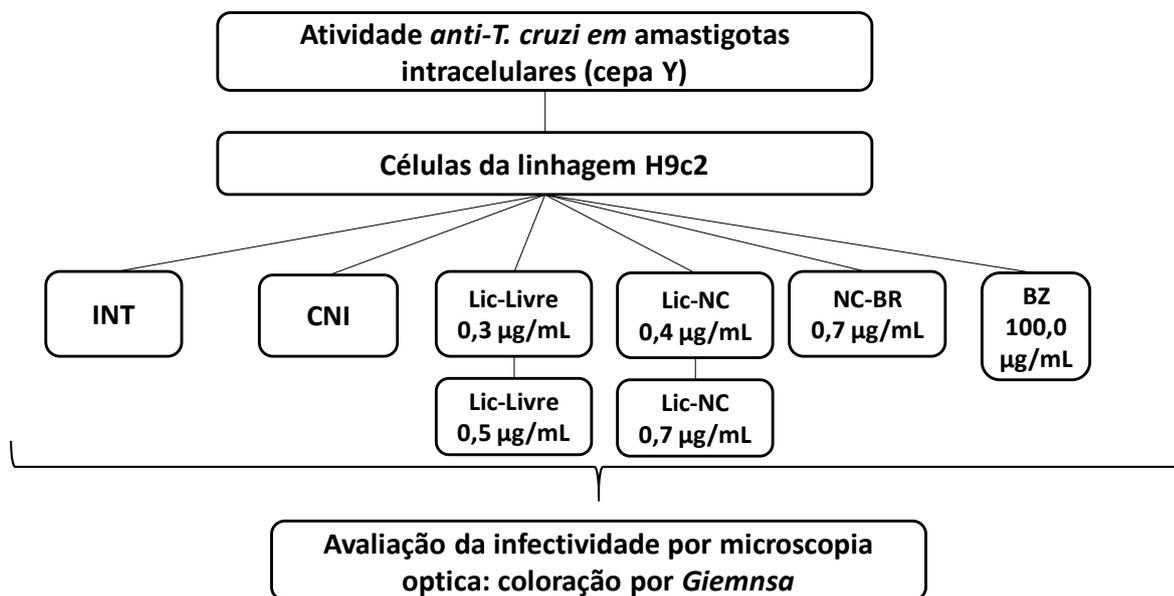
#### **5.2.7. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* da Lic, Lic-NC e NC-BR sobre formas amastigotas intracelulares: definição da IC<sub>50</sub>**

A avaliação do efeito do tratamento com Lic, Lic-NC e NC-BR sobre amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* (isolado parcialmente resistente ao BZ) foi realizada em células da linhagem H9c2. Para isto  $1,0 \times 10^4$  células foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de 13mm de diâmetro, dispostas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e posteriormente infectadas com formas tripomastigotas originadas de cultura da cepa Y (isolado resistente ao BZ) em células H9c2 (cultivadas em meio DMEM F12 suplementado com 5% de SFB) na razão de 10:1 parasitos/células. Após 24 horas de interação o sobrenadante foi removido e cada poço foi lavado três vezes com PBS 1x estéril para remoção dos parasitos não internalizados. Meio de cultura fresco contendo ou não as substâncias LIC, LIC-NC e BZ em diferentes concentrações foram adicionados a cada poço na proporção de 1mL/poço. As células foram novamente incubadas por 24 e 48h, a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. As concentrações iniciais de LIC, LIC-NC e BZ foram definidas a partir de experimentos preliminares com Vermelho Neutro. As lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS 1x estéril, fixadas com metanol por cinco minutos e em seguida coradas com solução de *Giemsa* (10% em água destilada). Após secagem das lamínulas e montagem em lâmina com Entellan (Merck) foi determinada a porcentagem de células infectadas em uma contagem aleatória ao microscópio óptico (aumento de 100x) de no mínimo 200 células. Apenas as formas do parasito com morfologia característica das formas amastigotas foram consideradas na avaliação da infecção.

O índice endocítico (IE) é uma relação matemática que corresponde à medida da porcentagem de células infectadas com as formas amastigotas multiplicadas pelo número de amastigotas por célula. Esse índice é usado para determinar a atividade da substância em diferentes concentrações sobre a forma amastigota do *T. cruzi*. Com isso foi calculado o percentual de inibição da infecção das células tratadas em relação àquelas infectadas e não tratadas.

Esse percentual de inibição foi então utilizado para a construção de curvas de dose-efeito e cálculo da IC<sub>50</sub> com auxílio dos softwares *Graph Pad Prism 6* e *CompuSyn*. Todos

os experimentos com amastigotas serão realizados em triplicata, com no mínimo duas repetições (Figura 5).



**Figura 5** - Delineamento experimental da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* da lactona sesquiterpênica licnofolida e LIC-NC sobre amastigotas intracelulares em células da linhagem H9c2

INT: Controle infectado e não tratado (células infectadas e incubadas apenas com meio de cultura); Lic: Licnofolida livre; Lic-NC: Licnofolida Nanoencapsulada; NC-BR: nanocapsula branca CNI: Controle não infectado (células não infectadas e não tratadas); BZ: Benznidazol (fármaco de referência);

### 5.2.7.1 Índice de Seletividade

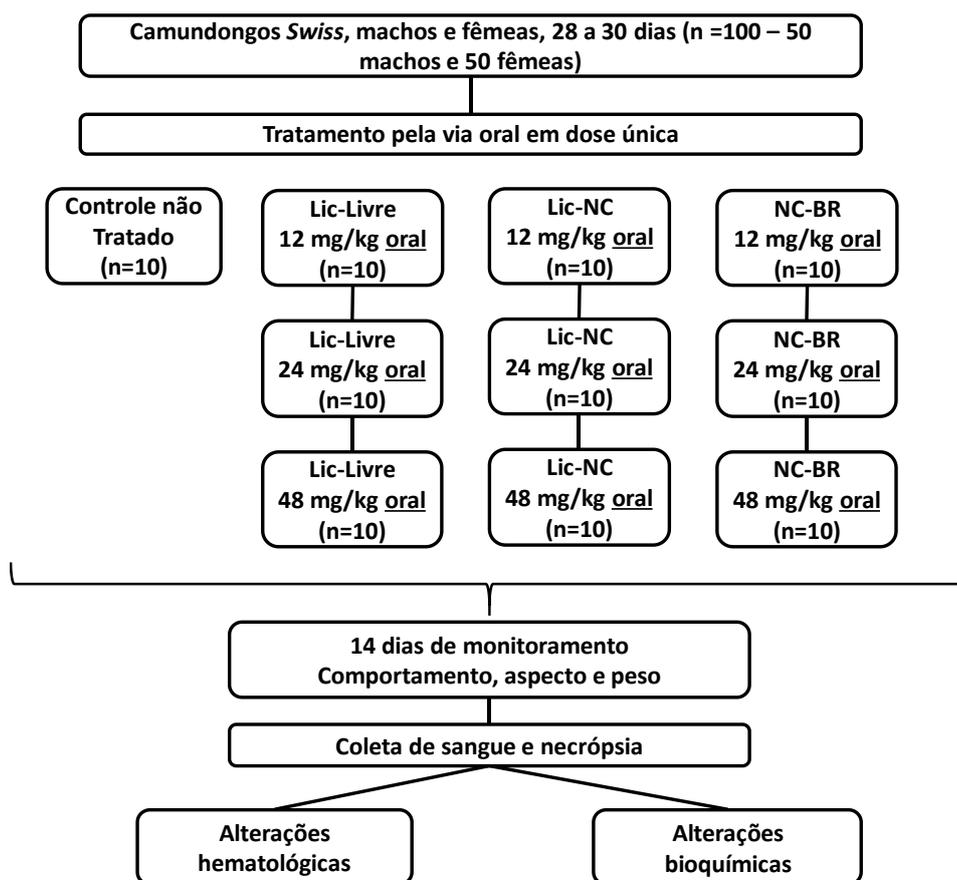
O índice de seletividade (IS) das amostras testadas foi obtido a partir do cálculo da razão entre o valor de  $IC_{50}$  do ensaio de VN (concentração do fármaco ou substância ativa que reduz a viabilidade celular em 50%) e o valor de  $IC_{50}$  do teste de atividade anti-*T. cruzi* (concentração da substância ativa que reduz o número de parasitas em 50%).

Conforme recomendado para a triagem de drogas contra a doença de Chagas (ROMANHA, 2010), uma substância promissora deve: (I) ser ativa contra parasitos na corrente sanguínea e parasitos intracelulares (II) ser ativa contra um grande número de parasitos isolados, incluindo aqueles que expressam resistência natural ao BZ e NF; (III) apresentar eficácia igual ou melhor quando comparada aos medicamentos de referência e (IV) apresentar um elevado IS ( $\geq 50$ ).

### 5.3. Avaliação da toxicidade aguda *in vivo* da Lic, Lic-NC e NC-BR

Não havendo relatos na literatura sobre os efeitos da administração da licnofolida livre e nanoencapsulada, bem como dose e diluentes empregados na sua formulação, os parâmetros utilizados para a avaliação da toxicidade aguda incluíram: avaliação dos sinais clínicos (efeito *NOAEL* – *No Observed Adverse Effect Level*), peso corporal, análise hematológica, bioquímica e mortalidade.

Para avaliar a toxicidade hepática e renal, camundongos *Swiss* ( $n = 10$ ), machos e fêmeas, foram distribuídos em 10 grupos experimentais, sendo os compostos administrados em doses únicas de 12 mg/kg, 24 mg/kg e 48 mg/kg, pela via oral. O grupo controle foi mantido sem tratamento (**Figura 6**). Após a administração, os animais foram monitorados por 14 dias quanto às alterações dos sinais de toxicidade, peso corporal e comportamento.



**Figura 6** - Esquema do delineamento experimental utilizado no teste de toxicidade aguda *in vivo* da Licnofolida livre e em nanocápsulas segundo o guia do OECD/ANVISA, 2010.

n: número; Lic: tratamento com Licnofolida livre nas determinadas concentrações; Lic-NC: tratamento com Licnofolida nanoencapsulada nas determinadas concentrações; NC-BR: tratamento com as nanocápsulas vazias nas determinadas concentrações; oral: tratamento pela via oral.

### **5.3.1. Análises hematológicas e bioquímicas**

Todas as análises foram realizadas nos animais que sobreviveram após os 14 dias do tratamento com os compostos Lic-livre, Lic-NC e NC-BR. Os camundongos foram anestesiados com cetamina 60 mg/kg e xilazina 7,5 mg/kg, e amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA 0,18% (para análises hematológicas realizadas no mesmo dia) e tubos sem anticoagulante (para análises bioquímicas), onde os respectivos plasmas e soros foram separados e armazenados a -20°C até o momento da análise.

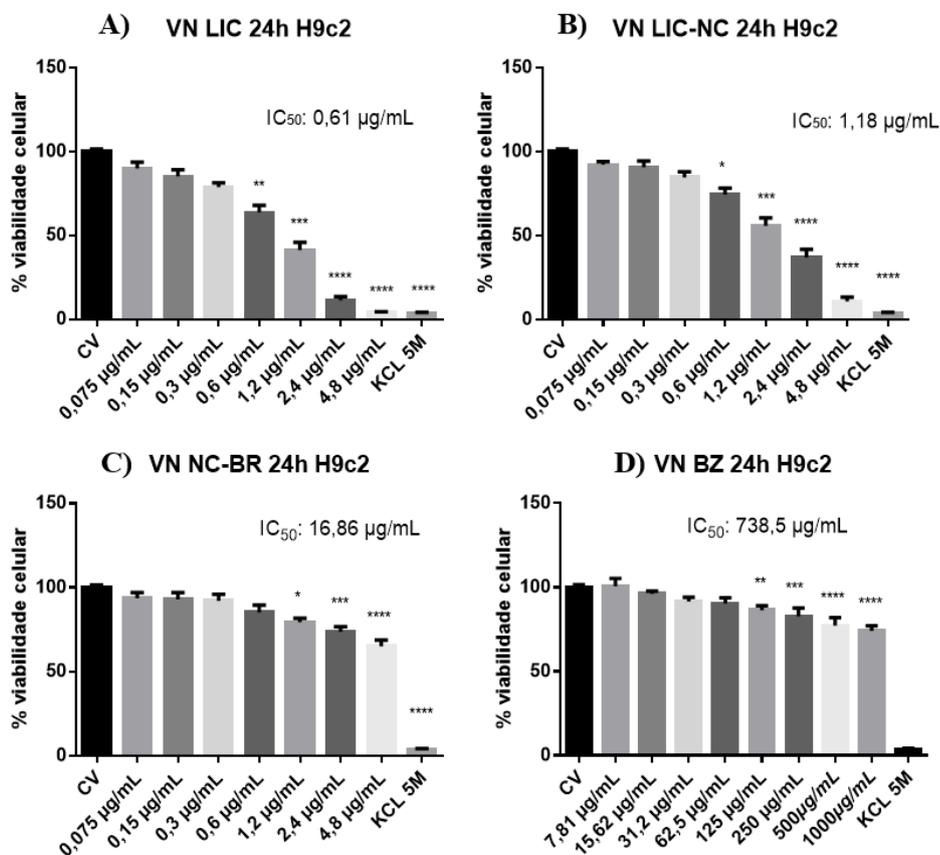
Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram a contagem de hemácias (Hm), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), leucócitos (Leuc) e plaquetas (PLAQ). As alterações da função hepática e a nefrotoxicidade foram avaliadas bioquimicamente. A nefrotoxicidade foi avaliada pela determinação das concentrações de creatinina e ureia no soro. Foram realizadas as medidas da alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST). Todas as análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotometria utilizando um auto-analisador (Wiener Lab modelo CM200) e kits de diagnóstico de análise cinética da linha Cristal, doados pelo laboratório Bioclin-Quibasa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os resultados foram expressos como média do grupo  $\pm$  desvio padrão.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados *in vitro*

#### 6.1.1. Ensaio de citotoxicidade da Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ em células H9c2 e HEPG2 utilizando o vermelho neutro

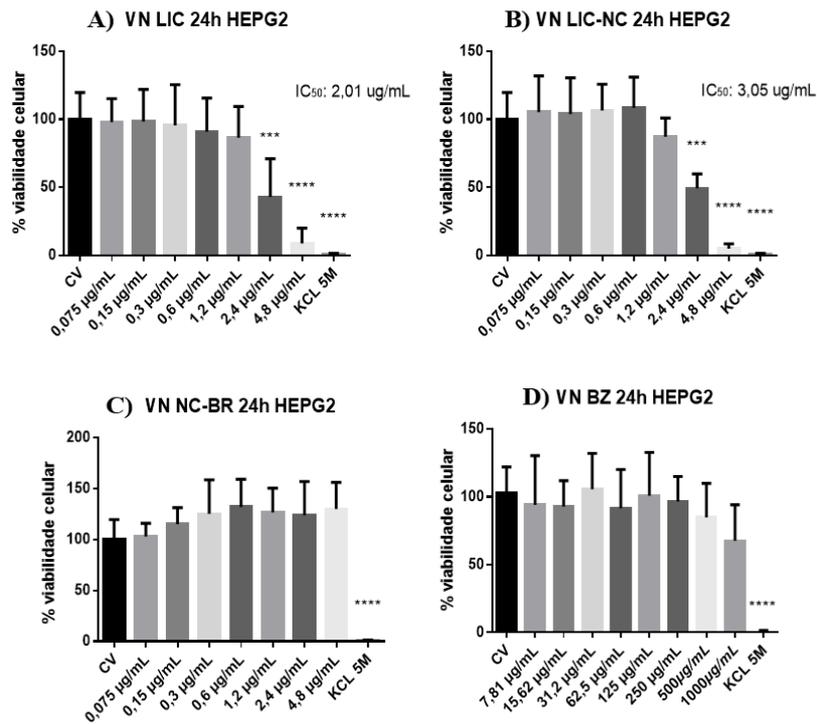
No ensaio para observação da citotoxicidade lisossomal pelo vermelho neutro foi observado que as concentrações de até 0,3 µg/mL de Lic-livre e Lic-NC não foram citotóxicas para as células da linhagem H9c2 após 24 horas de tratamento, levando à diferenças estatísticas quando incubadas com concentrações a partir de 1,2 µg/mL em relação ao controle de viabilidade [(CV) **Figura 7 A - 7 B**]. As células do grupo controle tratadas com NC-BR apresentaram citotoxicidade a partir da concentração 1,2 ug/mL, enquanto o grupo controle tratado com BZ apresentou citotoxicidade a partir de 125 ug/mL (**Figura 7 C e 7 D**).



**Figura 7** - Avaliação da citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de Licnofolida, Licnofolida em nanocápsulas, nanocápsulas vazias ou benznidazol em células da linhagem H9c2 pela metodologia Vermelho Neutro

A) Percentual de viabilidade das células da linhagem H9c2 tratadas com diferentes concentrações de Lic e incubadas por 24h; B) Percentual de viabilidade das células da linhagem H9c2 tratadas com diferentes concentrações de Lic-NC após 24h; C) Percentual de viabilidade das células da linhagem H9c2 tratadas com diferentes concentrações de NC-BR e incubadas por 24h; D) Percentual de viabilidade das células da linhagem H9c2 tratadas com diferentes concentrações de BZ e incubadas por 24h; KCl: controle de morte celular (100%); IC = IC<sub>50</sub>: concentração do composto capaz de induzir a morte celular em 50%; CV – Células controles de viabilidade. A leitura da reação foi feita em 570 nm; \* indica diferença significativa em relação ao controle não tratado, ao nível de  $p < 0,05$ .

De acordo com o teste Vermelho Neutro realizado em linhagem celular HEPG2 (**Figura 8**), os grupos Lic e Lic-NC apresentaram viabilidade celular próxima do controle de vida nas 5 menores concentrações avaliadas (0,075 µg/mL, 0,15 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,6 µg/mL e 1,2 µg/mL) apresentando diminuição significativa nas concentrações de 2,4 µg/mL e 4,8 µg/mL em relação ao grupo controle de viabilidade celular (CV) (**Figura 8 A e 8 B**). Ao se observar o grupo de células controles tratadas com NC-BR, é possível observar um aumento no número de células em relação ao CV, porém não significativo (**Figura 8 C**). Ainda, não houve diferença significativa do tratamento em relação ao CV no grupo de células tratadas com BZ (**Figura 8 D**).



**Figura 8-** Avaliação da citotoxicidade induzida por diferentes concentrações de Licnofolida, Licnofolida em nanocápsulas, nanocápsulas vazias ou benznidazol em células da linhagem HEPG2 pela metodologia Vermelho Neutro.

A) Representação gráfica das porcentagens de viabilidade das células da linhagem HEPG2 tratadas com diferentes concentrações de Licnofolida e incubadas por 24h; B) Representação gráfica das porcentagens de viabilidade das células da linhagem HEPG2 tratadas com diferentes concentrações de Licnofolida nanoencapsulada após 24h; C) Representação gráfica das porcentagens de viabilidade das células da linhagem HEPG2 tratadas com diferentes concentrações de nanocápsulas brancas e incubadas por 24h; D) Representação gráfica das porcentagens de viabilidade das células da linhagem HEPG2 tratadas com diferentes concentrações de Benznidazol e incubadas por 24h; KCl: controle de morte celular (100%); IC = IC<sub>50</sub>: concentração do composto capaz de induzir a morte celular em 50%; CV – Células controles de viabilidade. A leitura da reação foi feita em 570 nm; \* indica diferença significativa em relação ao controle não tratado, ao nível de  $p < 0,05$ .

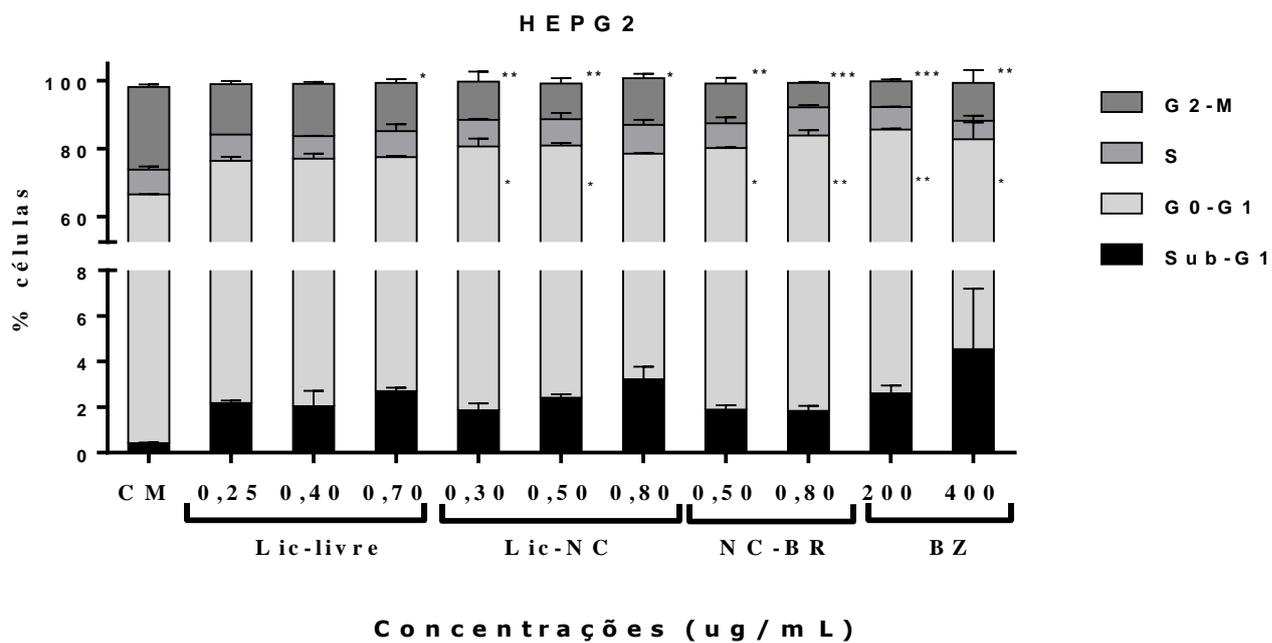
A partir da observação dos valores de viabilidade celular foi possível calcular, utilizando o software CompuSym, os valores de concentrações inibitórias de 50 % (IC<sub>50</sub>), concentração onde há morte de 50% das células do ensaio das substâncias as quais foram utilizadas para avaliação da atividade anti-*T. cruzi*. Assim, para as células H9c2, foram observados valores de IC<sub>50</sub> de 0,61 µg/mL e 1,18 µg/mL nos tratamentos com Lic-livre e Lic-NC, respectivamente. Nas células dos grupos controles tratados por 24h com NC-BR e BZ, foram observadas IC<sub>50</sub> de 16,86 µg/mL e 738,5 µg/mL, respectivamente (**Figura 7**).

Na análise das células HEPG2, observou-se IC<sub>50</sub> de 2,01 µg/mL para Lic-livre e de 3,05 µg/mL para Lic-NC. Nas células dos grupos controles tratadas por 24h com NC-BR e BZ, não foi possível se obter os valores de IC<sub>50</sub> (**Figura 8**).

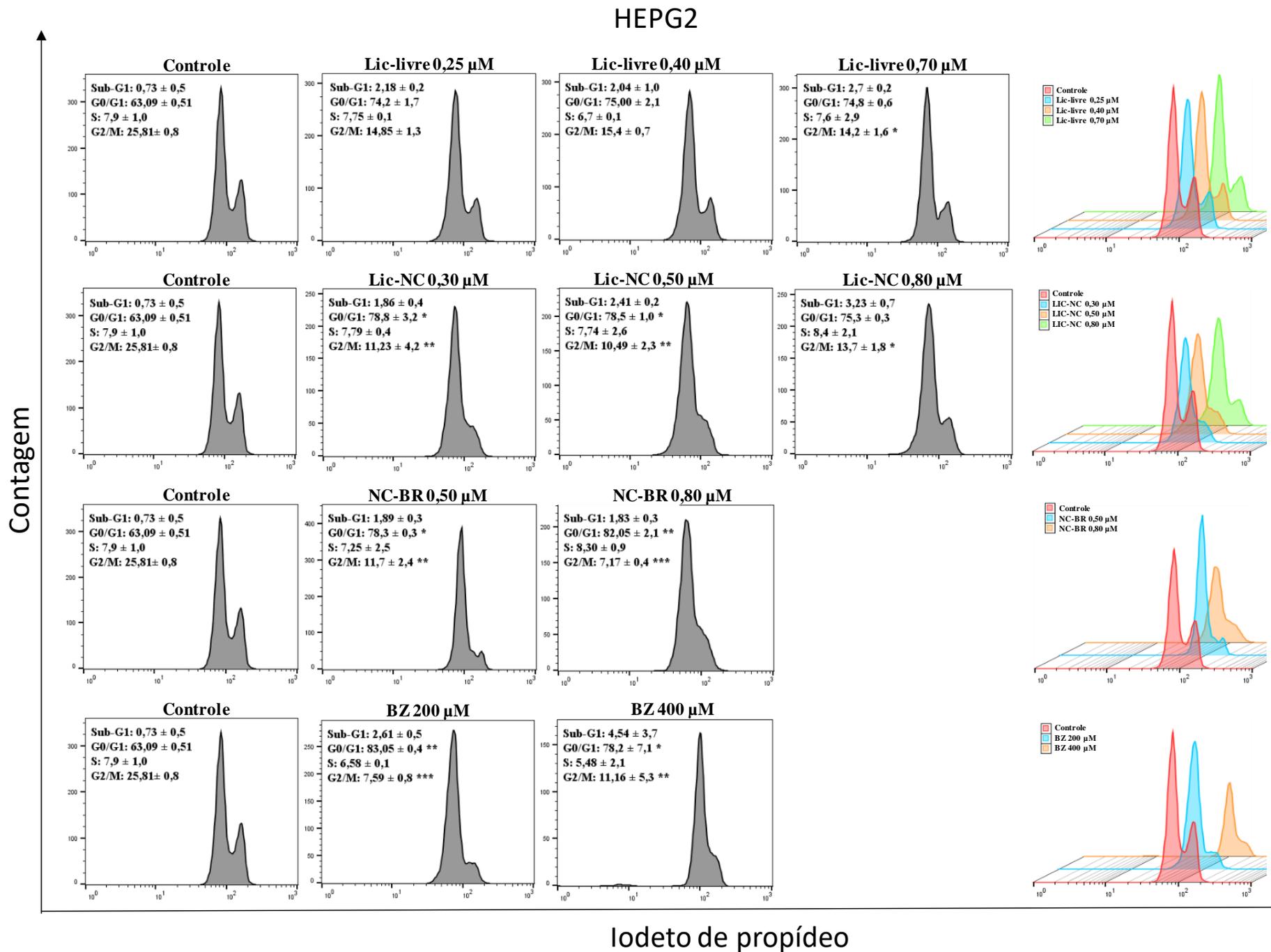
Foram assim definidas as concentrações de Lic-livre e Lic-NC para avaliação da atividade anti-*T. cruzi in vitro* em amastigotas intracelulares em células H9c2, bem como ensaios de citotoxicidade adicionais em ambos os tipos celulares.

### **6.1.2. Ensaio de citotoxicidade Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ em células HEPG2 e H9c2 utilizando o ensaio de ciclo celular**

O ensaio de ciclo celular é feito para realizar a identificação de possíveis interferências na multiplicação celular que a LIC ou as nanocápsulas possam causar. Utilizando o iodeto de propídeo para marcação do material genético, e assim quantificá-lo, evidenciou-se uma maior população, estatisticamente diferente, de células na fase G0-G1 (fase em que ocorre a multiplicação de organelas e aumento do volume celular) nos grupos de células HEPG2 tratadas com Lic-NC nas concentrações de 0,30 e 0,50 µg/mL (**Figura 9**). Também houve maior população nos grupos tratados com o controle NC-BR nas concentrações de 0,50 µg/mL e 0,80 µg/mL, bem como BZ 200 µg/mL e BZ 400 µg/mL. Ao se avaliar os parâmetros G2-M (parâmetro referente às células proliferativas em fase mitótica), foi possível perceber uma diminuição em todos os grupos experimentais, sendo significativas nas células tratadas com Lic-livre 0,70 µg/mL e em todas as concentrações testadas para Lic-NC, NC-BR e BZ. Não houve variação nas etapas Sub-G1 (diploide e de baixa síntese de material genético com possível necrose celular) e S (início da fase proliferativa) do ciclo celular para nenhum dos grupos de tratamento em teste. Todos os parâmetros comparativos para resultados estatísticos foram feitos em comparação ao grupo controle de células marcadas e não tratadas (CM). (**Figura 9**)

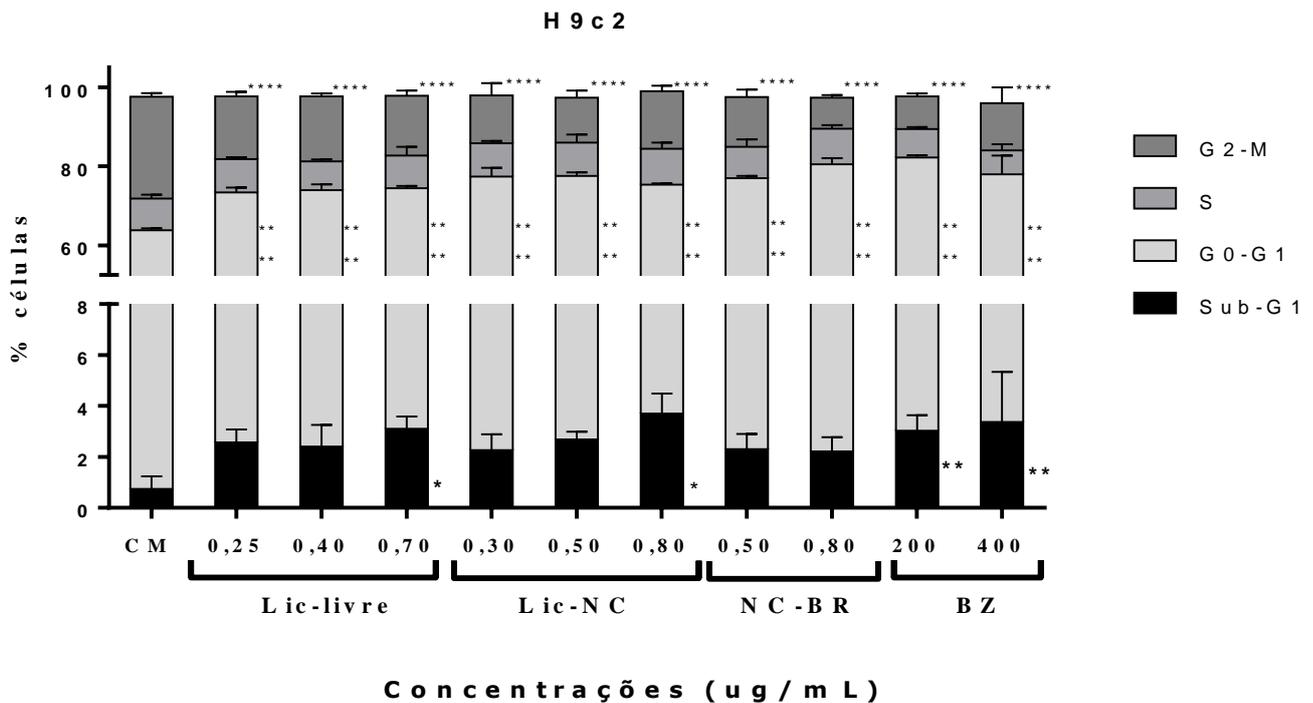


**Figura 9** - Análise do ciclo celular de células HEPG2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 h.



**Figura 10-** Análise do ciclo celular de células HEPG2 tratadas com Licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol /24

Com relação aos resultados obtidos com as células cardíacas H9c2, observa-se um aumento significativo no parâmetro Sub-G1 (diploide e de baixa síntese de material genético com possível necrose celular) dos grupos tratados com Lic-livre 0,70 µg/mL e LIC-NC 0,80 µg/mL em relação ao grupo controle CM. Também, houve aumento significativo de todos os grupos em tratamentos testes quanto ao parâmetro G0-G1, fase em que ocorre a multiplicação de organelas e aumento do volume celular. Ao se analisar a parte do ciclo celular voltada à fase proliferativa G2-M, observa-se uma diminuição do número de todas as células dos grupos tratados em relação ao grupo controle CM (**figura 11**). Não houve diferença significativa quanto ao parâmetro S do ciclo celular em nenhum tratamento avaliado (**figura 11**).



**Figura 11** - Análise do ciclo celular de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benzidazol por 24 h

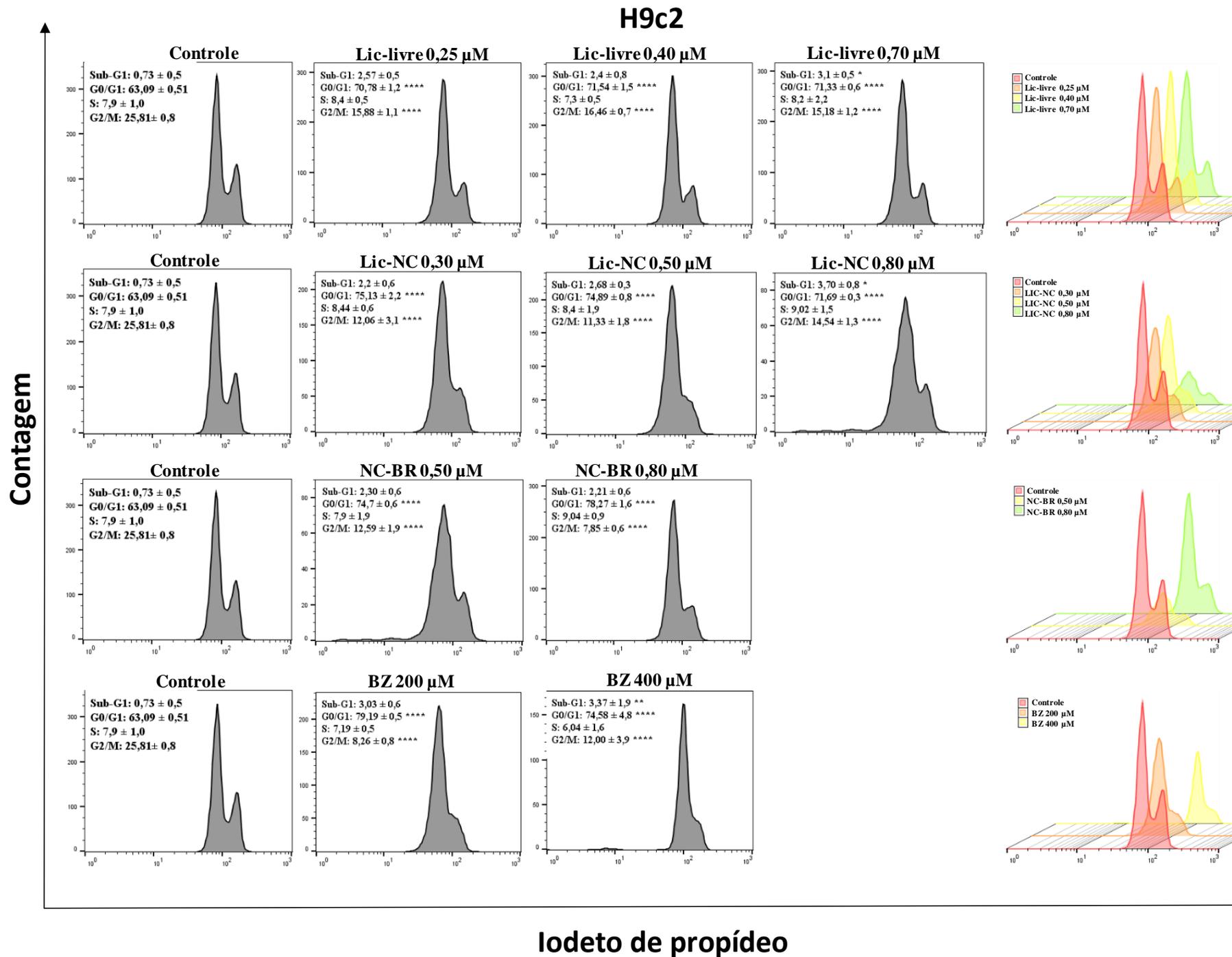
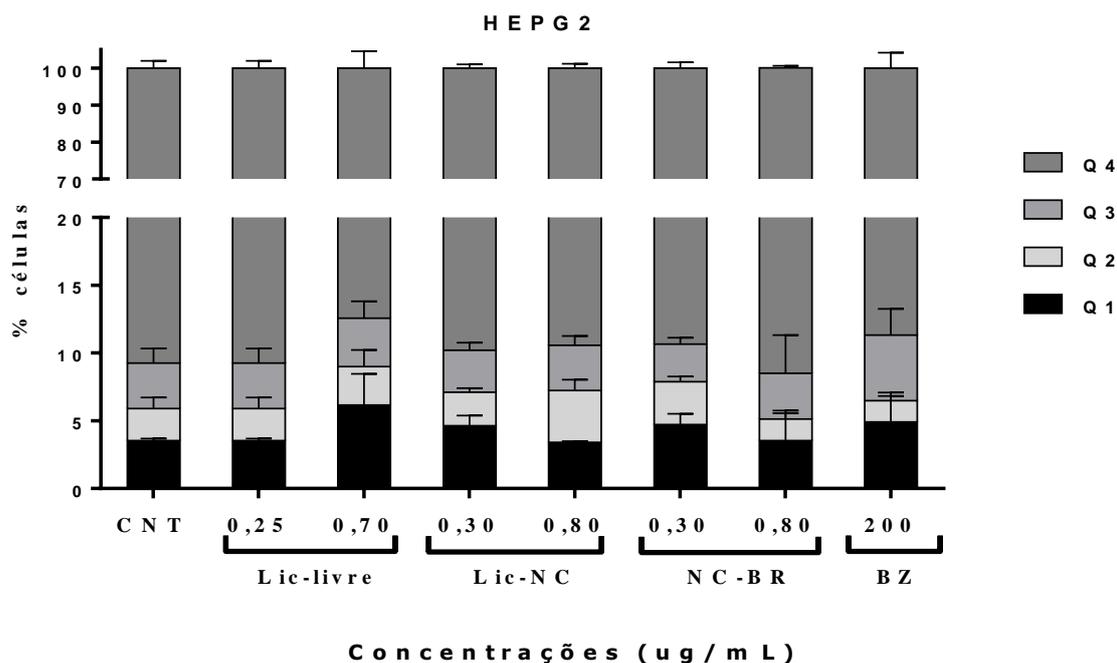


Figura 12 - Análise do ciclo celular de células H9c2 tratadas com Licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol / 24 h

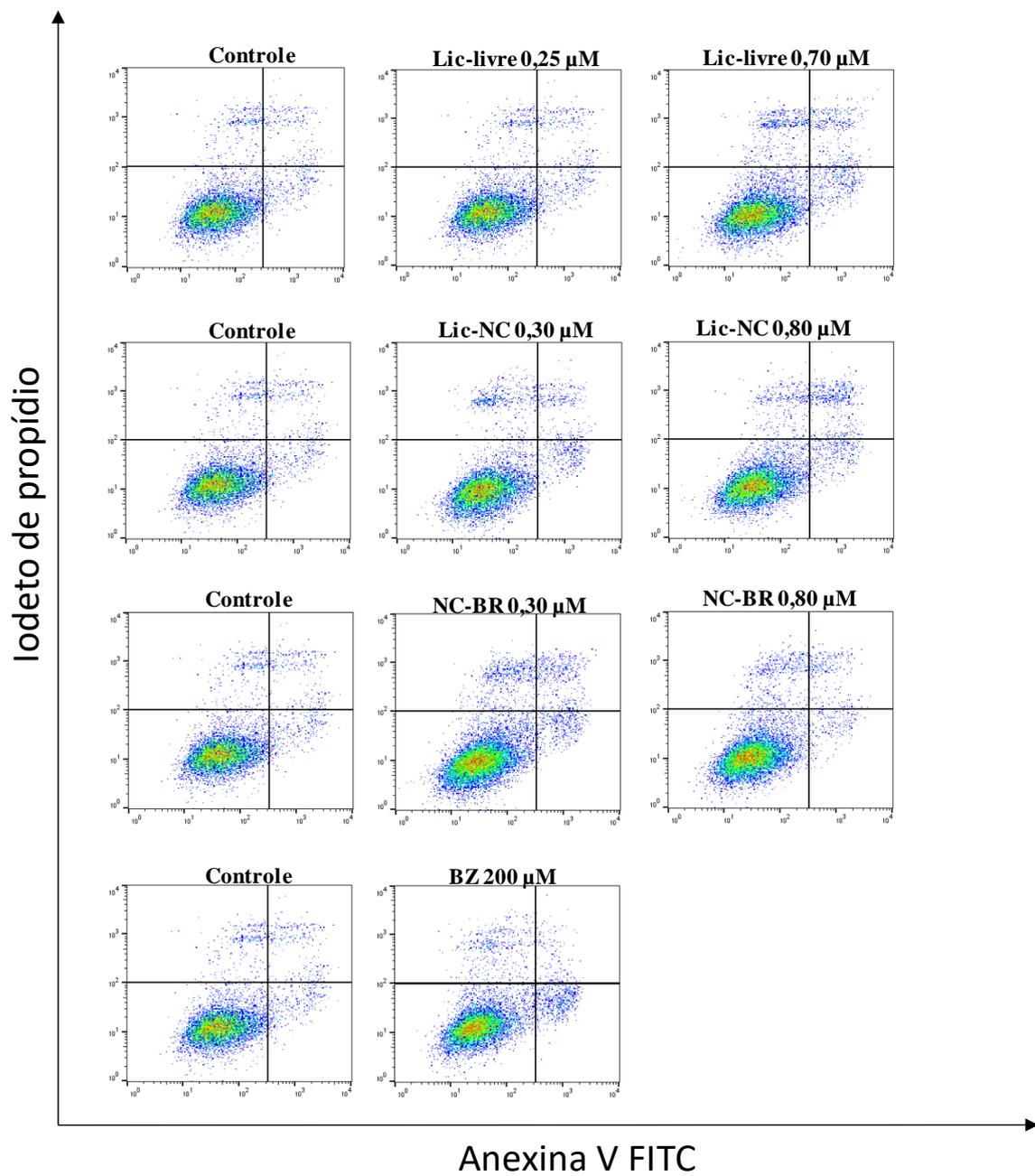
### 6.1.3 Ensaio de toxicidade da Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ em células H9c2 e HEPG2 utilizando o ensaio de apoptose necrose

Não foram observadas alteração significativa nas taxas de apoptose ou necrose nas células HEPG2 após o tratamento com os compostos avaliados (Figuras 13 e 14).



**Figura 13** - Taxas de apoptose e necrose em gráfico de barras de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas.

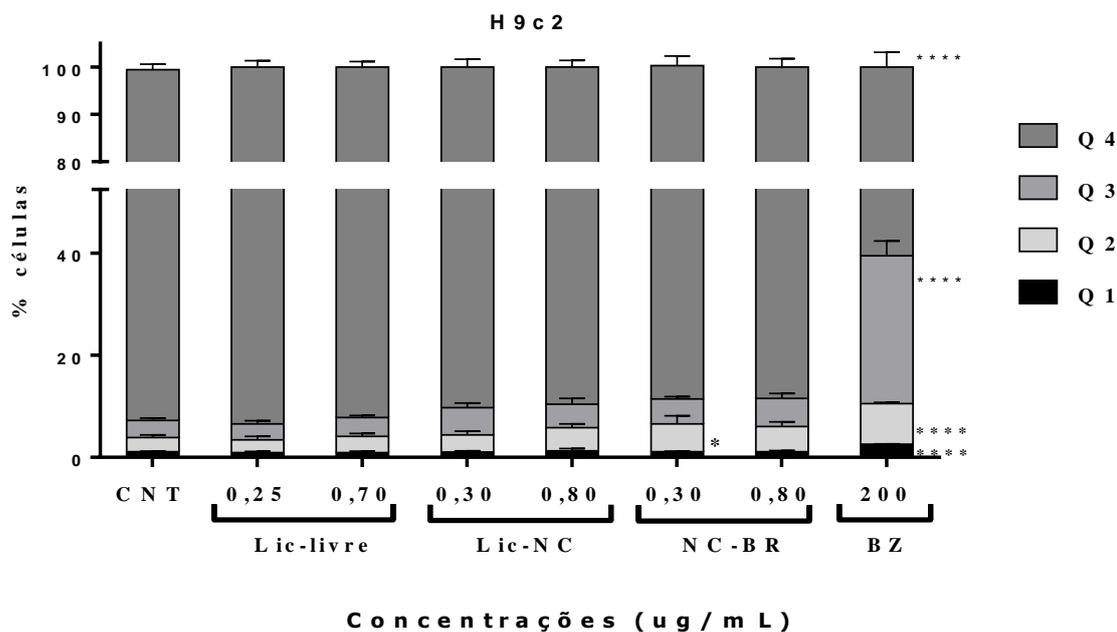
Controle: células não tratadas. Q1: Células em estado de necrose; Q2: Células em apoptose tardia; Q3: Células em apoptose recente; Q4: Células saudáveis. \* P <0,05 comparado ao controle.



**Figura 14** - Histograma de pseudocores representativo das taxas de apoptose e necrose de células HEPG2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas

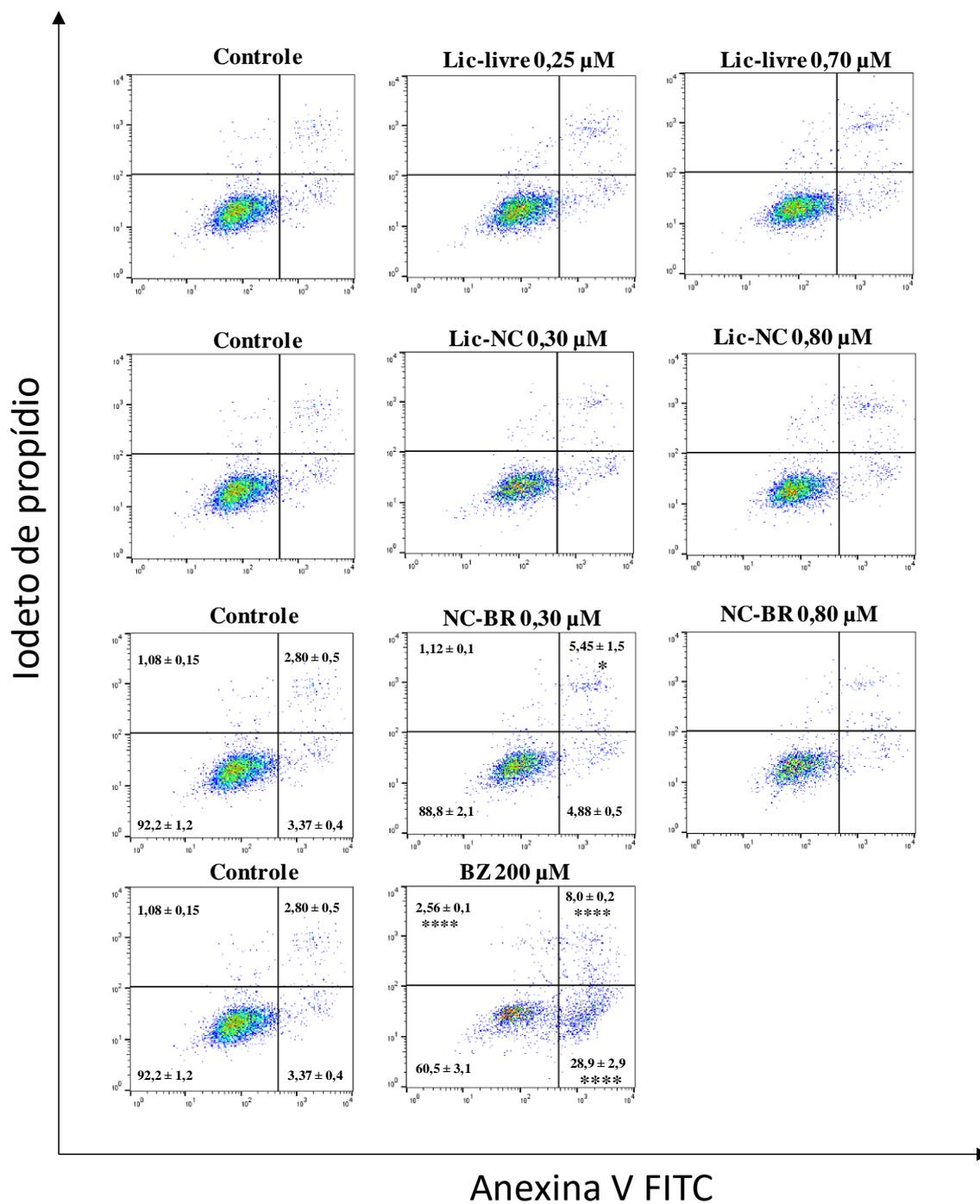
Controle: células não tratadas. \*  $P < 0,05$  comparado ao controle.

Na análise das células H9c2, foram observadas taxas aumentadas de apoptose tardia (Q2) após o tratamento com NC-BR 0,30  $\mu$ M e BZ 200  $\mu$ M, sendo a apoptose recente (Q3) também encontrada em BZ 200  $\mu$ M. Ainda, foi detectada uma taxa de necrose (Q1) aumentada após o tratamento com BZ 200  $\mu$ M, ausente em todos os demais grupos tratados (Figuras 15 e 16).



**Figura 15** - Taxas de apoptose e necrose em gráfico de barras de células H9c2 tratadas com licnfolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas

Controle: células não tratadas. Q1: Células em estado de necrose; Q2: Células em apoptose tardia; Q3: Células em apoptose recente; Q4: Células saudáveis. \* P <0,05 comparado ao controle.

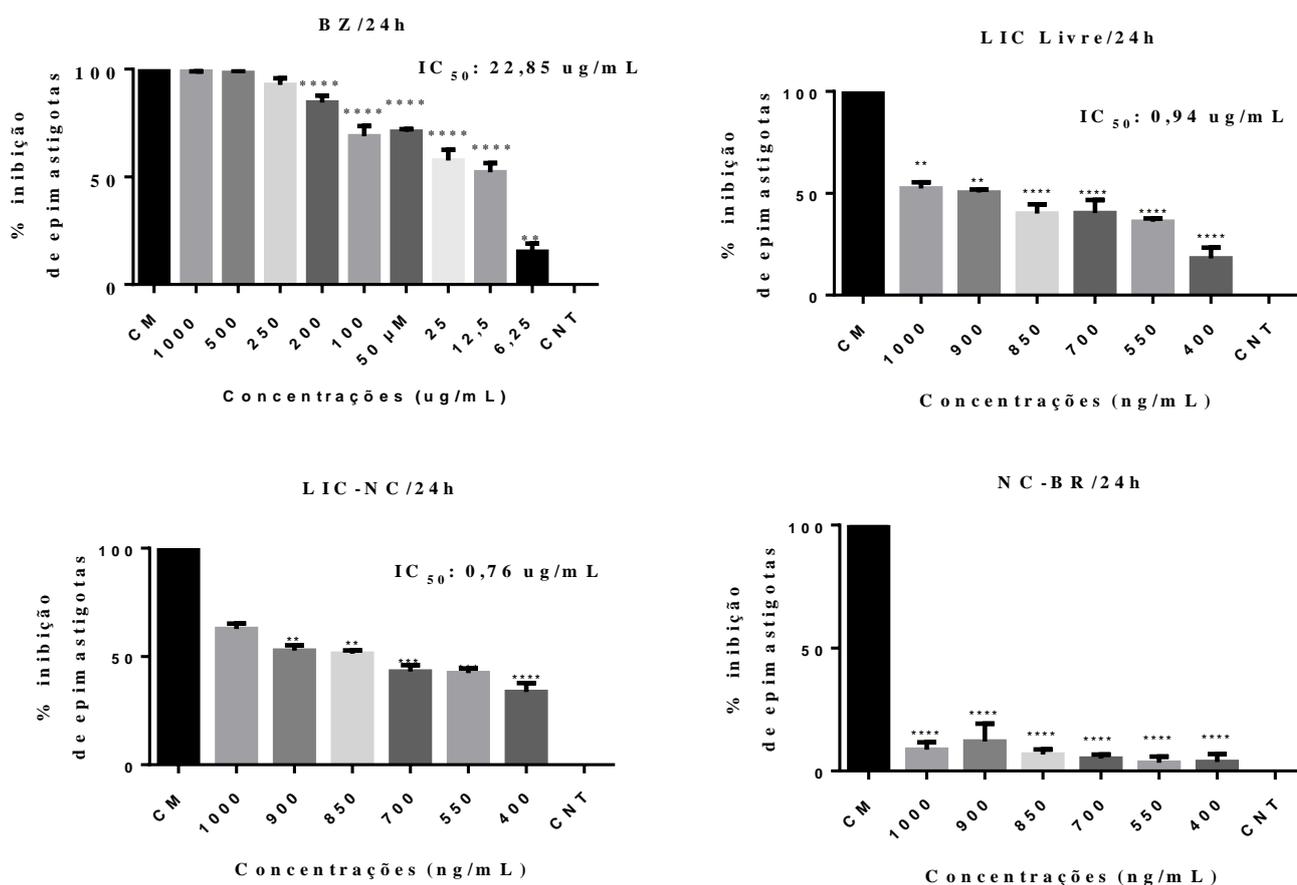


**Figura 16** - Histograma de pseudocores representativo das taxas de apoptose e necrose de células H9c2 tratadas com licnofolida livre, nanoencapsulada, nanocápsulas vazias e benznidazol por 24 horas

Controle: células não tratadas. \* P < 0,05 comparado ao controle.

#### 6.1.4. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* da Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ sob formas epimastigotas

A Lic-livre foi capaz de inibir parcialmente as formas epimastigotas do *T. cruzi* (Figura 17), chegando em até 50% em suas maiores concentrações, porém significativamente inferior ao grupo controle de morte dos parasitos. Lic-NC, de forma semelhante à Lic-livre, obteve êxito em até 58% de inibição dos parasitos, sendo este resultado estatisticamente semelhante ao obtido pelo grupo controle de morte. Ao se analisar BZ, houve inibição de até 100% nas concentrações de 1000 ug/mL e 500 µg/mL, sendo ativo em até 50% em concentrações de 12,5 ug/mL. As formulações NC-BR não foram capazes de inibir essa forma do parasito significativamente em relação ao controle (Figura 17).



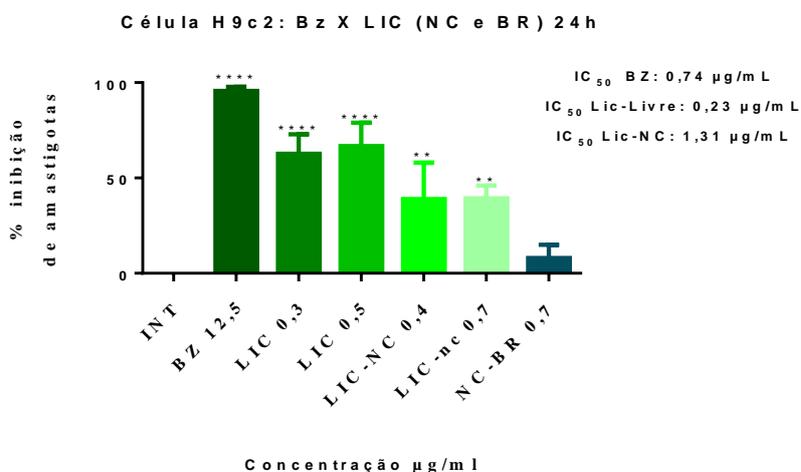
**Figura 17** - Porcentagens (%) de viabilidade de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* após tratamento com Licnofolida livre (Lic), licnofolida nanoencapsulada (Lic-NC), nanocapsulas vazias (NC-BR) e benznidazol (BZ) por ensaio com resazurina. CM: controle de morte. \* P <0,05 comparado ao controle

Utilizando o software Compusyn, foi calculada a redução da viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* e obtido o IC<sub>50</sub>%. Para Lic-livre, o IC<sub>50</sub> foi de 0,94 µg/mL, enquanto para LIC-NC obteve-se 0,76 µg/mL. BZ apresentou IC<sub>50</sub> de 22,85 µg/mL. Não foi possível calcular o IC<sub>50</sub> das formulações NC-BR uma vez que sua atividade tripanocida não foi significativa, inviabilizando os resultados.

### 6.1.5. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* da Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ sobre formas amastigotas intracelulares: definição do IC<sub>50</sub>

A avaliação da atividade de Lic-livre, Lic-NC, NC-BR e BZ sob células H9c2 infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* foram estimadas pelo cálculo de porcentagem de inibição do índice endocítico (**IE: Índice Endocítico = % infecção x nº de amastigotas por célula infectada**) bem como o cálculo para % inibição do índice endocítico = **100 – (IE<sub>tratado</sub> / IE<sub>controle</sub>) x 100**). Nas células H9c2 infectadas e incubadas apenas com o meio de cultura (células Infectadas e não tratadas – INT), houve IE de 50% (dados não mostrados).

De acordo com o gráfico de % de inibição de amastigotas pela concentração da substancia testada (**Figura 18**), BZ teve a maior capacidade de inibição de amastigota, seguido por Lic-livre 500 µg/mL e Lic-livre 300 µg/mL. Os valores de % de inibição de amastigotas foram iguais para Lic-NC 400 µg/mL e Lic-NC 700 µg/mL. Por fim, houve valores de % de inibição de amastigotas próximo de zero e índice de infectividade próximo de 100% quando testada NC-BR 700 µg/mL.



**Figura 18** - Atividade da licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada, nanocapsulas vazias e do benznidazol sobre o índice de infectividade de células H9c2 pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Um total de  $1,0 \times 10^4$  células foram infectadas e posteriormente incubadas na presença de concentrações decrescentes de licnofolida livre, licnofolida nanoencapsulada e benznidazol por 24 horas. INT: controle infectado não tratado; BZ: Benznidazol; LIC: Licnofolida; IC<sub>50</sub> = Concentração efetiva: concentração da droga que reduz em 50% o número de parasitos; \* indica diferença significativa em relação aos compostos administrados em relação ao grupo INT (controle infectado e não tratado) ( $p < 0,05$ ).

A partir da observação dos valores de viabilidade celular foi possível calcular, utilizando o software CompuSym, os valores de concentrações inibitórias de 50 % (IC<sub>50</sub>), concentração onde há morte de 50% dos parasitos intracelulares do ensaio, das substâncias analisadas, sendo mostrados na **tabela 1**.

**Tabela 1-** Efeitos anti-*Trypanosoma cruzi* da Lic, Lic-NC, NC-BR e BZ no tratamento de células H9c2 infectadas com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Substância	IE (%)	% Inibição do índice endocítico	IC <sub>50</sub>
LIC 300 µg/mL	42,40	63,05	0,23 µg/mL
LIC 700 µg/mL	37,67	67,18	
LIC-NC 400µg/mL	70,13	38,88	1,31 µg/mL
LIC-NC 700 µg/mL	72,30	36,99	
NC-BR 700 µg/mL	119,93	0	-
INT	114,75	0	-
BZ 12,5 µg/mL	4,33	96,22	0,74 µg/mL

Dados de IE: Índice endocítico (%) e de % de inibição do IE foram feitos em relação ao controle INT (controle infectado não tratado); IE: Índice Endocítico = % **infecção x nº de amastigotas por célula infectada**; % Inibição do índice endocítico =  $100 - (IE_{tratado} / IE_{controle}) \times 100$ ; Lic: Licnofolida; NC: Nanocápsulas; BZ: Benznidazol; Os valores foram calculados utilizando a média da triplicata de experimentos independentes. O IC<sub>50</sub> foi calculados a partir do software *CompuSyn*.

A partir dos valores de IC<sub>50</sub> dos testes de VN e atividade tripanocida, foram calculados os índices de seletividade (**IS = razão entre a IC de 50% da inibição das células obtido pelo teste de citotoxicidade por VN dividido pelo IC de 50% obtido pelos compostos contra as formas amastigotas do *T. cruzi***) de cada composto após 24 de incubação. Quanto mais elevada for esta

relação, maior a segurança no uso dos compostos testados em relação às células hospedeiras. Os resultados estão expressos na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Índice de seletividade da Lic, Lic-NC e benznidazol (BZ) oriundos da relação da citotoxicidade (IC50%) e índice de inibição (IC50%) da infecção de células H9c2 com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Fármaco	IC <sub>50</sub> – VN	IC <sub>50</sub> - Infecção in vitro	Índice de Seletividade
Lic-Livre	0,61 µg/mL	0,23 µg/mL	2,65
Lic-NC	1,18 µg/mL	1,31 µg/mL	0,90
BZ	738,5 µg/mL	0,74 µg/mL	997,97

Índice de seletividade ( $IS = IC_{50} \text{ em MTT} / IE_{50} \text{ em células infectadas}$ ); IC: concentração inibitória; IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando-se o software *CompuSyn*; ; Lic: Licnofolida; NC: Nanocápsulas; BZ: Benznidazol; Os valores foram calculados utilizando a média da triplicata de no mínimo dois experimentos independentes.

## 6.2. Resultados *in vivo*

### 6.2.1. Toxicidade aguda

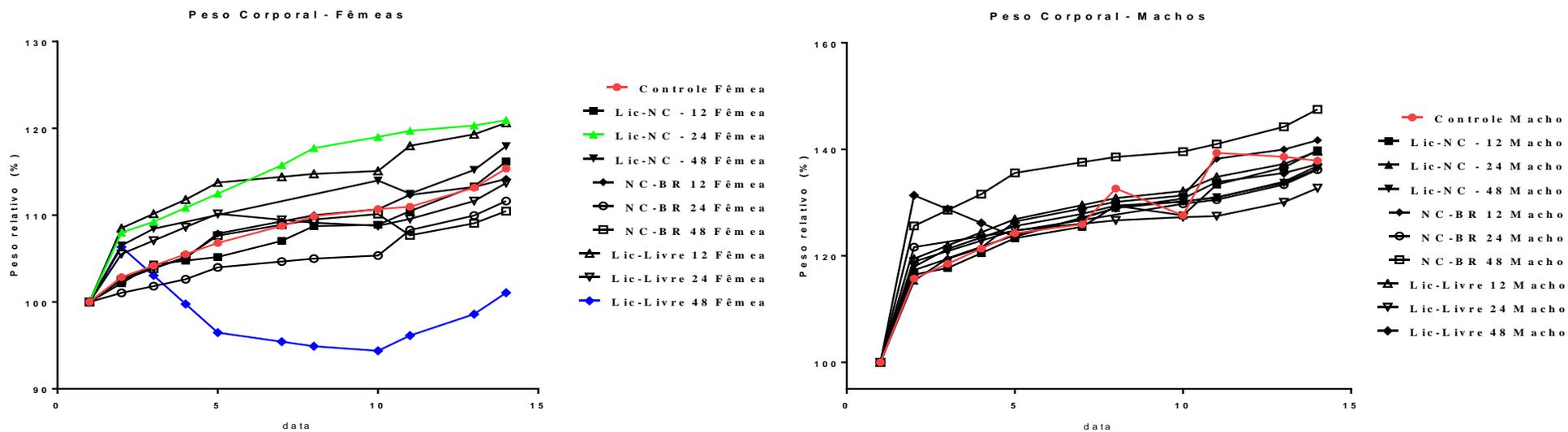
#### 6.2.1.1. Atividade dos tratamentos com formulações de Lic, Lic-NC e NC-BR em camundongos saudáveis

Para avaliar a atividade dos tratamentos com formulações de Lic-livre, Lic-NC e NC-BR em camundongos saudáveis, alguns aspectos de toxicidade aguda foram avaliados com o objetivo de analisar possíveis alterações comportamentais, aspectos físicos, peso, alterações bioquímicas e hematológicas.

Não foram observados sinais de toxicidade ou alterações comportamentais após o tratamento com os compostos avaliados. Somente Lic-livre em sua dose mais elevada (48 mg/kg) causou prostração e tremores após sua administração, sendo cada sinal sendo observado paralelamente entre os grupos de animais machos e fêmeas avaliados. No entanto, esses efeitos foram transitórios e desapareceram principalmente na quarta hora após a administração do composto nos animais machos, e em seis dias na fêmea avaliada.

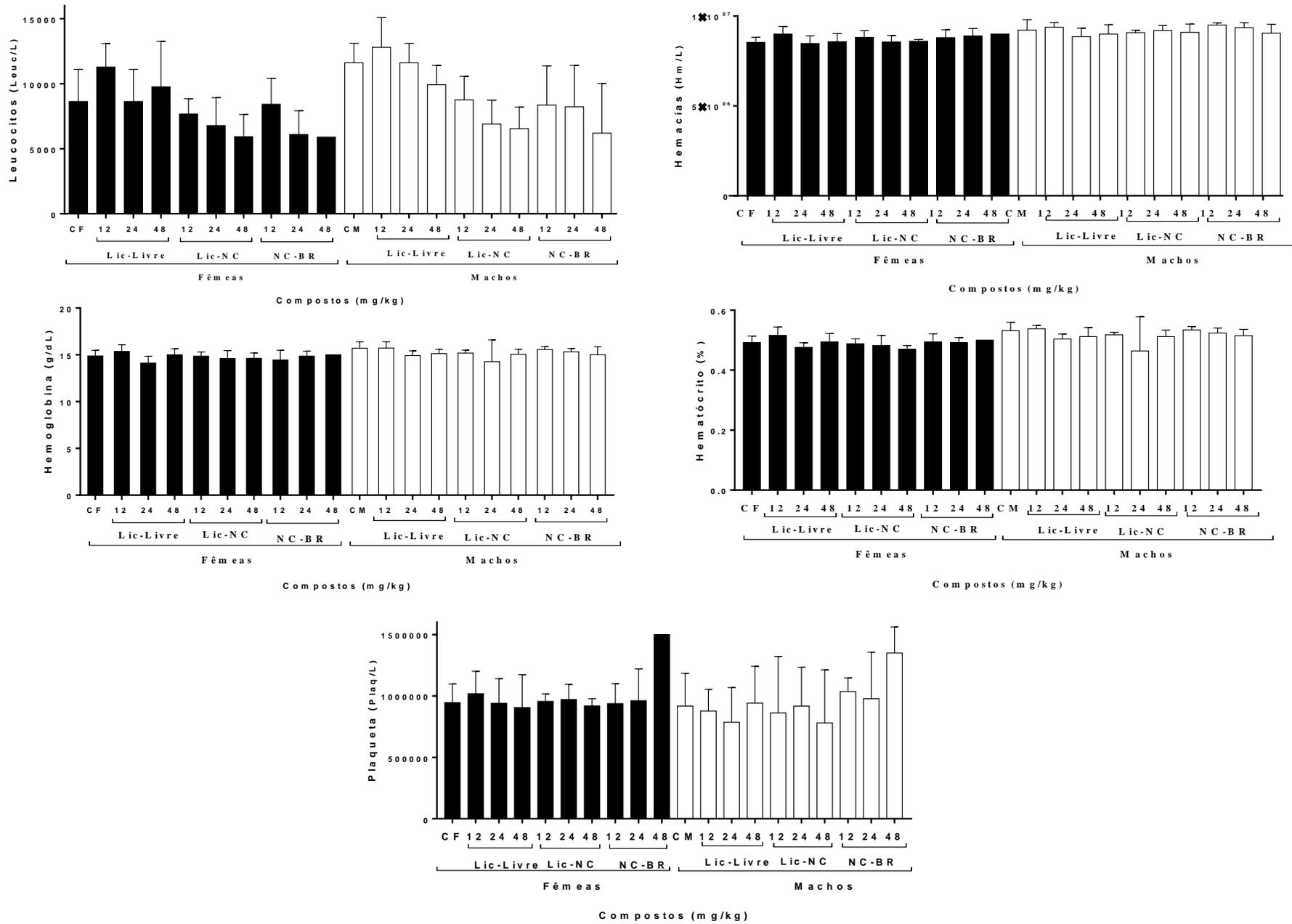
Nenhuma morte foi registrada dentro de 24 horas após a administração dos compostos, e o controle em animais de ambos os sexos. Após esse período, quatro fêmeas e três machos, em um total de dez animais, morreram no 2º dia após o tratamento com Lic-livre 48 mg/kg.

Camundongos machos e fêmeas tratados com Lic-livre, Lic-NC, NC-BR e controles nas três doses avaliadas apresentaram ganho de peso durante todo o período experimental. Apenas o grupo de fêmeas tratadas com Lic-livre 48 mg/kg apresentou diminuição do peso na primeira semana de tratamento, tendo a retomada do ganho de massa corporal a partir do 8º dia pós tratamento (**Figura 19**). Em contrapartida, apenas o grupo de animais fêmeas tratadas com Lic-NC 24 mg/kg apresentou aumento médio de peso corporal significativo em relação ao controle de animais não tratados, sendo o grupo com maior peso médio a partir do 7º dia pós tratamento (**Figura 19**). A análise estatística revelou que o tempo, não os tratamentos, foi o responsável pelo aumento do peso dos animais dos demais grupos. O aumento foi o mesmo nos grupos tratado e controle (**Figura. 19**). Os tratamentos não afetaram o peso relativo dos órgãos, a ingestão de alimentos e água (dados não mostrados).



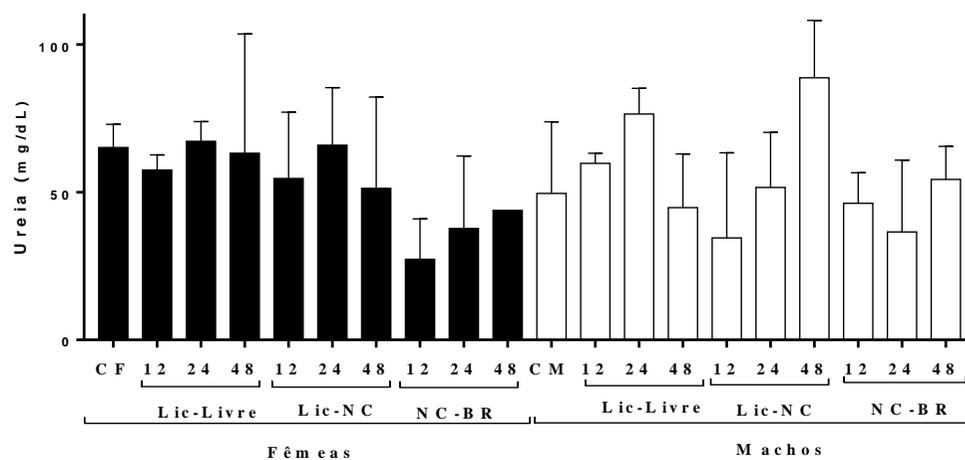
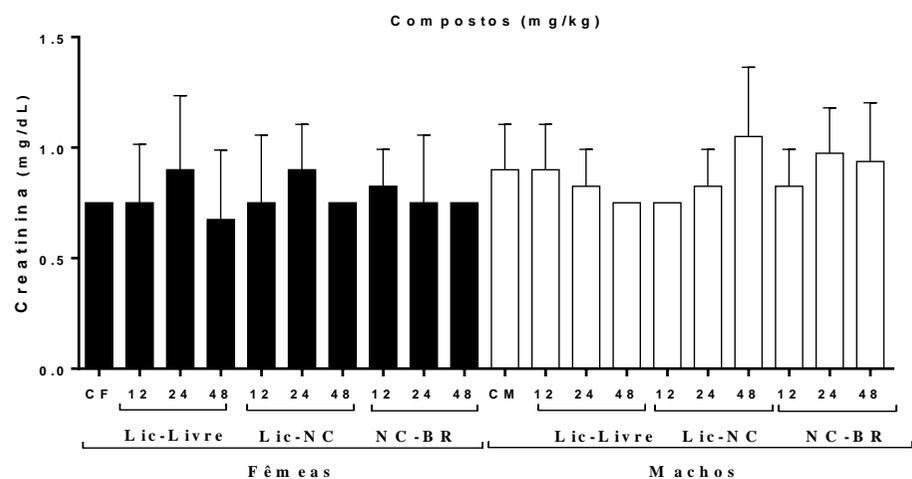
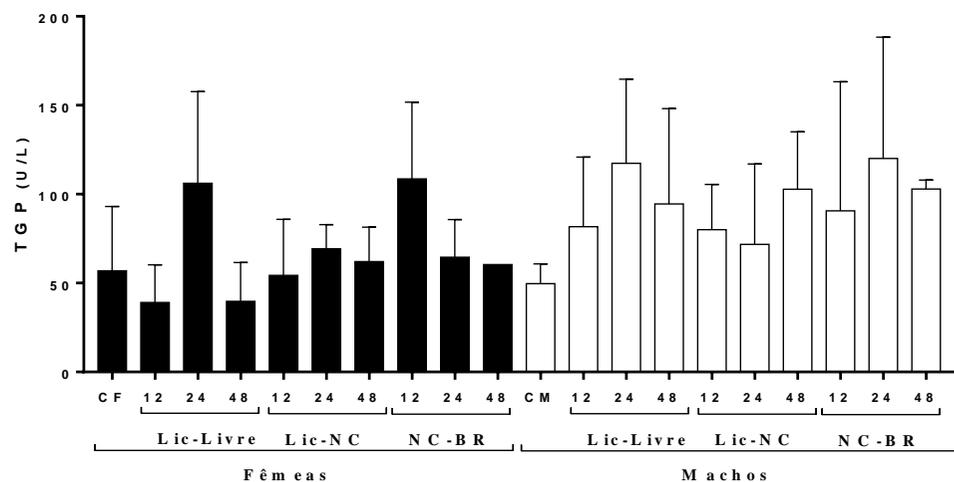
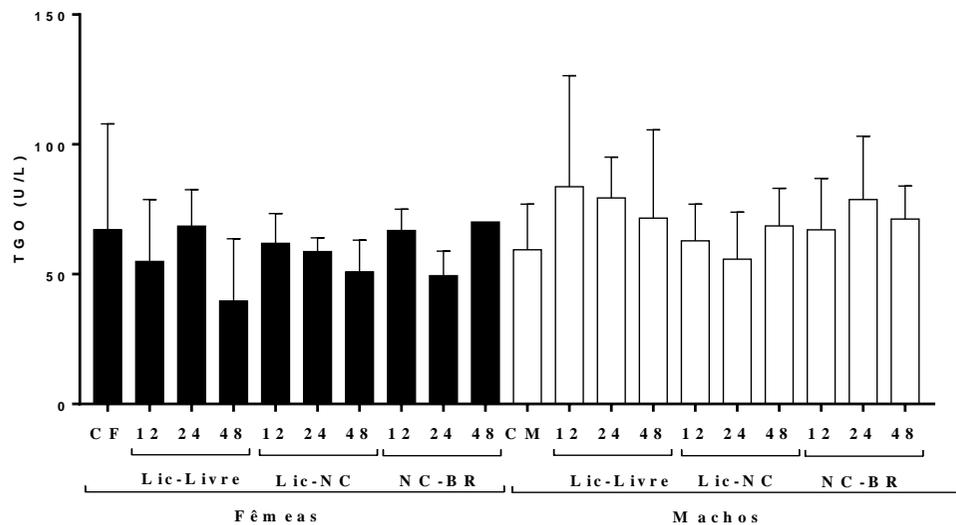
**Figura 19** - Peso corporal relativo de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com dose única de licnofolida livre, nanoencapsulada e nanocapsulas vazias, observados por 14 dias

Nenhum dos tratamentos com Lic-livre, Lic-NC ou NC-BR nas três doses utilizadas produziram alterações nos parâmetros hematológicos avaliados em comparação ao grupo controle de animais não tratados. **(Figura 20).**



**Figura 20** - Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss machos e fêmeas obtidos 14 dias após o tratamento por via oral e intravenosa com Licnofolida livre, nanoencapsulada e nanocápsulas vazias

De forma semelhante, os compostos avaliados em todas as doses também não produziram alterações estatisticamente significativas nas proteínas ALT, AST, creatinina e uréia (**Figura 21**).



**Figura 21** - Parâmetros bioquímicos de camundongos Swiss machos e fêmeas 14 dias após administração oral de Licnofolida livre, nanoencapsulada e nanocápsulas vazias

TGO = transaminase glutâmico-oxalacética; TGP = transaminase glutâmico-pirúvica; os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (n = 10).

## 7. DISCUSSÃO

A Dch está presente em 21 países, principalmente na América Latina e se manifesta em 8 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2018), número inferior ao real devido à subnotificação ou ausência de diagnósticos.

Quando diagnosticada, existem dois medicamentos para o tratamento da enfermidade, benznidazol (BZ) e nifurtimox (NIF), sendo apenas o BZ disponível no Brasil e distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (RENAME, 2019).

O tratamento é desafiador, visto que ambas as substâncias usadas contra o *T. cruzi* (NF e BZ) são ativas apenas na fase aguda da doença, quando os parasitos se encontram presentes na corrente sanguínea, e seu tratamento é marcado por inúmeros efeitos adversos (COURA e CASTRO, 2002). Em função disso, Urbina (2009) deixa claro a necessidade de pesquisa por novas substâncias menos tóxicas e mais seguras.

Uma das alternativas é a busca por substâncias naturais sendo, algumas, como as do gênero *Lychnophora*, tendo sua atividade anti-*T. cruzi* já relatadas *in vitro* (OLIVEIRA et al, 1996) e *in vivo* (BRANQUINHO et al, 2014). Segundo Romanha (2010), os testes *in vitro* são importantes para avaliar a citotoxicidade de tais substâncias com suposta atividade tripanocida, assim como avaliar sua capacidade de evoluir nos estudos, alcançando os testes *in vivo*.

No contexto deste trabalho é estudada a substância Licnofolida, extraída da *Lychnophora trichocarpha*, em sua forma livre (Lic) e nanoencapsulada (Lic-NC). Também, a avaliação da toxicidade do polímero através de nanocápsulas vazias (NC-BR), e a comparação de todo o estudo com o fármaco de referência, Benznidazol (BZ).

Para tais avaliações foi feito, primeiramente, o ensaio de citotoxicidade em células H9c2 e HEPG2 utilizando o vermelho neutro. Em células H9c2 e HEPG2 (**Figuras 7 e 8**), foi possível observar que Lic-NC possui menor citotoxicidade que sua forma livre, sendo que em ambas as duas primeiras concentrações (0,075 µg/mL e 0,15 µg/mL) e as cinco primeiras (0,075 µg/mL, 0,15 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,6 µg/mL e 1,2µg/mL), respectivamente, se aproximaram do controle de vida (**Figuras 7 e 8**), resultado este, já esperado pelo grupo de pesquisa, visto que a nanocapsula tem por característica o aumento da biodisponibilidade da substância. Assim, sua concentração é liberada de forma gradual, o que reduz seu efeito

tóxico *in vivo* (BRANQUINHO et al, 2014), e também *in vitro*, como aqui relatado. Licnofolida apresentou maior toxicidade em células da linhagem H9c2 que na linhagem HEPG2, fato este também esperado, por sua presente cardiotoxicidade já revelada em trabalhos anteriores de Branquinho e colaboradores (2017) e também como consequência do metabolismo da substância por células hepáticas. O gráfico de NC-BR, tanto para hepatócitos quanto para cardiomiócitos, mostra que o polímero usado, PLA-PEG, não foi citotóxico para as células, não mostrando nenhuma alteração significativa em relação ao controle de vida, concordando com o resultado demonstrado anteriormente por Oliveira e colaboradores (2017). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que o polímero possui apenas a função de compor a nanocápsula, não interagindo com a membrana celular. Para ambas as situações, o IC<sub>50</sub> de LIC-NC foi maior que o de Lic-livre, o que demonstra, mais uma vez, a capacidade da nanocapsula em atuar na forma de liberação retardada.

Durante a mitose, as células passam por um ciclo celular de diversas etapas, havendo, a cada uma destas, uma diferente função. As etapas S (onde ocorre a síntese do novo material genético) e M (mitose propriamente dita, onde ocorre a divisão celular) são intercaladas por outras duas etapas chamadas gaps, sendo G1 (antecede a fase S, onde ocorre a multiplicação das organelas e o aumento do volume celular), G2 (antecede a mitose e é onde ocorre uma discreta multiplicação do RNA e outras proteínas necessárias para a divisão celular) e G0 (momento posterior a mitose onde a célula se mantém por um tempo exercendo suas funções) (HARTWELL E WEINERT, 1989).

Na figura 9, quando mencionado o teste de ciclo celular em células hepáticas (HEPG2) é possível observar, na fase sub-G1 há ausência de necrose quando comparado com o controle não marcado (CNM), em todos os grupos experimentais. Este resultado é esperado já que não foram usadas concentrações citotóxicas da substância a ponto de induzir intensa morte celular. Na fase S, onde ocorre a multiplicação do DNA, não houve diferença significativa entre as células tratadas e o CM, mostrando que todas foram capazes de fazer síntese de novo DNA. Ao se observar as células nas fases G0-G1, onde há a multiplicação de organelas e aumento de volume celular, é possível observar uma elevação significativa do número de células em todas as concentrações de LIC-NC e NC-BR em relação ao controle marcado (CM) e na fase G2-M, onde ocorre a mitose, uma diminuição do mesmo grupo de células. Tal fato, maior número de células na fase G0-G1 que na fase G2-M, pode ser fundamentado em duas possíveis hipóteses.

A primeira hipótese levantada é de que as nanopartículas interfiram no fator de promoção da maturação celular (MPF). Durante todo o ciclo celular há a presença e a ação de duas proteínas, as ciclinas (com função de desencadear os eventos do ciclo celular) e as CDKs (com função de fosforilar a membrana celular). A ação conjunta dessas duas proteínas formam o chamado MPF, que possui como função dar início à mitose (Nobury e Nurse, 1992). As possíveis formas de alterações promovidas pela licnofolida no MPF precisam ser melhor pesquisadas e elucidadas pelo grupo de pesquisa.

Para que o processo de divisão celular ocorra corretamente, e não avance com defeitos em alguma estrutura ou mutações, foram desenvolvidos pontos de checagem ao final de cada etapa do ciclo celular (Hartwell e Weinert, 1989). A segunda hipótese se baseia no ponto de checagem G2, onde há, ao final da fase G2, uma verificação da integridade e replicação do DNA. Caso a verificação seja positiva, há a evolução para a mitose, mas em caso negativo, há a interrupção de seu ciclo por apoptose. Os testes cometa (avaliação da porcentagem de dano ao DNA celular causada pela substância) e o teste de apoptose e necrose (avaliação da porcentagem de morte celular por necrose ou por apoptose) serão fundamentais para a validação ou exclusão dessa hipótese.

Em células cardíacas H9c2 (**Figura 11**) o perfil de resposta do ciclo celular frente à diferentes concentrações das substâncias tiveram o mesmo padrão de resposta anterior, com excessão da fase sub-G1 que apresentou porcentagem de necrose, resultado esperado visto que Branquinho e colaboradores (2017) relatou cardiotoxicidade da licnofolida em estudos de avaliação da prevenção da cardiotoxicidade da licnofolida pelo uso de nanocápsulas poliméricas biodegradáveis.

Em contrapartida, ao se analisar os resultados de apoptose e necrose (**Figuras 13 e 15**), observou-se ausência de necrose em todos os grupos tratados com licnofolida. Tal achado poderia ser contornado com a utilização de maiores concentrações do composto nestes ensaios. Entretanto, BZ levou ao aumento a presença de necrose, apoptose recente e tardia nas células cardíacas H9c2 tratadas, resultado inovador na literatura.

A avaliação da atividade tripanocida da licnofolida foi feita inicialmente pelo teste de Resazurina (**Figura 17**), que mostrou mesma atividade tanto para Lic-livre quanto para Lic-NC, mostrando que o polímero de revestimento não impede a atividade anti-*T. cruzi* da substância. NC-BR não obteve resultados significativos, não possuindo ação tripanocida.

De acordo com a avaliação da substância contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, podemos observar que a licnofolida possui atividade superior em sua forma livre

quando comparada à nanoencapsulada. O baixo resultado de Lic-NC nos gráficos de % inibição de amastigota e índice de infectividade (**Figura 18**) podem estar relacionados ao fato de as células, por ser um sistema simples com a presença de metabolism celular apenas, não de metabolism de um organismo como um todo, não conseguirem liberar toda a quantidade de substância das nanocápsulas, não levando à correta entrega da substância em seu sítio ativo, os amastigotas.

O uso de plantas como medicamentos, alimentos funcionais e suplementos nutricionais aumentou em todo o mundo (Kohler e Baghdadi-Sabeti, 2011). Dentre elas, podemos citar as da família Asteracea, que possuem como um dos princípios ativos as Lactonas Sesquiterpenicas, com efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos, anti-hiperuricêmicos, inibidores de xantina oxidase (XO) e anti-*Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* (MICHEL et al., 2013; ARAÚJO et al., 2016).

Apesar do uso popular e dos efeitos biológicos, não existem muitos estudos ou dados sobre sua segurança. Portanto, a avaliação da toxicidade da lactona sesquiterpênica Licnofolida, em sua forma livre e nanoencapsulada, é indispensável.

Modelos animais são amplamente utilizados para avaliar a toxicidade preliminar, porque a identificação precoce de efeitos indesejáveis é geralmente preditiva da toxicidade em seres humanos e pode economizar tempo, recursos e esforços (Kramer et al., 2010). Neste estudo, vários parâmetros foram avaliados após a administração aguda *in vivo* de formulações de Lic-livre, Lic-NC e NC-BR, como possíveis alterações comportamentais, aspectos físicos, peso, alterações bioquímicas e hematológicas e mortalidade.

Doses crescentes de Lic-livre, Lic-NC e NC-BR foram utilizadas em camundongos *Swiss*, tratados pela via oral (**Figura 19**). As doses utilizadas para avaliação da toxicidade aguda foram traçadas a partir de experimentos prévios com a mesma formulação e substâncias obtidos em trabalhos anteriores de Branquinho et al, (2014) e Mello et al, (2016).

Em geral não foram observados sinais de toxicidade após a administração das formulações e durante os 14 dias avaliados quando comparados aos grupos controles. Entretanto, os camundongos tratados com a Lic-livre 48 mg/kg tiveram seus efeitos colaterais e mortalidade atribuídos à formulação de DMA-PEG, e não à dose utilizada, por se tratar de um maior volume de administração, demandando um número maior de operações de gavagem de uma substância viscosa. Ainda, não foram observadas alterações significativas dos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados entre nenhum dos

grupos de animais, reiterando novamente a hipótese de toxicidade imediata após administração, sendo a causa atribuída ao veículo.

A mortalidade é um critério importante na avaliação toxicológica (ASARE et al., 2012) e a administração aguda da licnofolida não induziu uma mortalidade significativa. Nenhuma morte foi registrada dentro de 24 horas após a administração aguda. No entanto, os resultados não mostraram relação dose-resposta e a mortalidade não estava claramente relacionada à administração da lactona.

O aumento ou diminuição do peso corporal pode indicar alterações fisiológicas significativas, como variações hormonais, distúrbios hepáticos e diminuição da absorção de proteínas, aminoácidos e outros nutrientes (LEE et al., 2012). Além disso, a redução do peso corporal pode afetar o peso dos órgãos internos (TEO et al., 2002) e é um parâmetro simples e sensível de toxicidade após a exposição a agentes tóxicos (THANABHORN et al., 2006).

De forma geral, quanto aos parâmetros de toxicidade aguda *in vivo* aqui avaliados, foi observado maior sensibilidade nos camundongos fêmeas quando comparados aos machos ao serem tratados com licnofolida livre ou nanoencapsulada, sendo aquelas os únicos a apresentarem diminuição significativa de peso e mortalidade associados, nas doses mais elevadas.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis para compostos tóxicos e um importante índice de estado fisiológico e patológico, tanto no homem quanto no animal (MUKINDA e SYCE, 2007). Diferenças entre os machos e fêmeas avaliados podem ser devidas à produção de hormônios, especialmente o estrogênio e seu efeito no equilíbrio das células B e T e no metabolismo das enzimas do citocromo P450 (AHMED et al., 1999; SIN et al., 2007), e são esperadas quando submetidos à situações de estresse. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas quanto aos parâmetros hematológicos avaliados.

Sabe-se que vários compostos tóxicos se acumulam no fígado onde ocorre a desintoxicação (CLARKE e CLARKE, 1977). A lesão hepática é geralmente avaliada pela determinação das transaminases séricas (ALT e AST) e também pela medição das proteínas totais. Não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos desses três marcadores da função hepática após a administração aguda da lactona sesquiterpênica e a análise histológica do fígado poderá elucidar melhor possíveis alterações teciduais, confirmando ou não que a administração das substâncias não causou danos hepáticos.

Os rins recebem cerca de 25% do fluxo sanguíneo cardíaco e qualquer substância que chegue à circulação sistêmica atingirá esse órgão. Portanto, são considerados alvos

frequentes de toxicidade (DEKANT e VAMVAKAS, 1996). A função renal foi avaliada pelos níveis séricos de uréia e creatinina e será realizada a análise histológica. Não foi observado alterações significativas nos níveis séricos destes marcadores, sendo necessária a análise histológica para sua confirmação.

Em conclusão, a dose efetiva de 12 mg/kg de licnofolida livre ou nanoencapsulada, bem como o controle tratado apenas com polímero, não causou o aparecimento de sinais de toxicidade ou mortalidade significativa nos animais. Nesse contexto, licnofolida livre e em nanocápsulas não demonstraram potencial tóxico em sua administração aguda nas doses ótimas de uso obtidas na literatura (12 mg/kg).

É importante ressaltar a dificuldade em se trabalhar com substâncias naturais purificadas em decorrência da dificuldade de extração da mesma. Assim, seria necessário a repetição de testes de toxicidade aguda com doses mais elevadas, até que se obtivesse dados concretos de toxicidade relativa ao uso da Licnofolida, e não apenas de seu veículo atribuído. Porém, estes testes demandam uma grande quantidade de plantas para processamento e extração da substância, que não seriam viáveis para a conclusão deste trabalho. Ainda, as análises histopatológicas dos tecidos fígado, rim, coração e cólon dos animais provenientes do experimento de toxicidade aguda estão em andamento e serão fundamentais para identificação de possível toxicidade tecidual.

## 8. CONCLUSÃO

Ao final deste trabalho concluímos que a Licnofolida em sua forma livre se mostrou mais potente *in vitro* para efeitos anti-*T. cruzi* quando comparada a sua forma nanoencapsulada. Em contrapartida, sua forma nanoencapsulada apresenta-se mais segura quando avaliada *in vivo*.

## 9. REFERÊNCIAS

ABAD, M.J., BERMEJO, P., VALVERDE, S., et al. **Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum***. *Planta Med.*, v. 60 (3), p. 228-231, 1994.

AHMED, S.A., HISSONG, B.D., VERTHELYI, D., et al. **Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds**. *Environ. Health Persp.*, v. 107, p. 681–686, 1999.

ALMEIDA, T.C; GUERRA, C. C. C.; ASSIS, B. L. G.; et al. **Antiproliferative and Toxicogenomic Effects of Resveratrol in Bladder Cancer Cells With Different TP53 Status**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 60, p. 740-751, 2019.

ARAÚJO, M.C.P.M., FERRAZ-FILHA, Z.S., FERRARI, F.C., et al. **Campomanesia velutina leaves extracts exert hypouricemic effects through inhibition of xanthine oxidase and ameliorate inflammatory response triggered by MSU crystals**. *Braz. J. Pharm.*, v. 26, p. 720–727, 2016

ASARE, N., INSTANES, C., SANDBERG, W. J., et al. **Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells**. *Toxicology*, v. 291, (1–3), p. 65-72, 2012.

AZAMBUJA, P., GARCIA, E.S. **Ciclo evolutivo**. FIOCRUZ, 2018. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

BAHIA, M. T.; DINIZ, L. de F.; MOSQUEIRA, V. C. F. **Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease**. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 23 (9), p. 1225–1237, 2014.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; et al. **Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species**. *Phytochemistry*, v. 19 (11), p. 2381–2385, 1980.

BOLZANI, V. S. et al. **Os Produtos Naturais E A Química Medicinal Moderna**. Quim. Nova, Vol. 29 (2), p. 326-337, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em saúde: zoonoses / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 224 p.: il. – (Série B. Textos Básicos de Saúde), Cadernos de Atenção Básica; n. 22.

BRANQUINHO, R. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; OLIVEIRA-SILVA, J. C. V. de; et al. **Sesquiterpene Lactone in Nanostructured Parenteral Dosage Form Is Efficacious in Experimental Chagas Disease**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58 (4), p. 2067–2075, 2014.

BRANQUINHO, R. T.; ROY, J.; FARAH, C.; et al. **Biodegradable Polymeric Nanocapsules Prevent Cardiotoxicity of Anti-Trypanosomal Lychnopholide**. Scientific Reports, v. 7, p. 44998, 2017.

CANÇADO, J. R. **Criteria of Chagas Disease Cure**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94 (1): p. 331-335, 1999.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. **Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis)**. Human & Experimental Toxicology, v. 25, p. 471–479, 2006.

CHAGAS, C. R. J. **Nova tripanosomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 1 (2), p. 159-218, 1909.

CHIARI, E., DE OLIVEIRA, A. B., RASLAN, D. S. et al. **Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi***. Trans. Roy. SOC. Trop. Med. Hyg, Vol. 85, p. 372-374, 1991.

CHIARI, E. et al. ***In vitro* Screening of Asteraceae Plant Species Against Trypanosoma cruzi.** Phytotherapy Research, Vol. 10, p.636 – 638, 1996.

CLARKE, E.G.C., CLARKE, M.L. **Veterinary Toxicology.** Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, 1977.

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

COURA, J. R. **Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible?** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, (8), p. 962–967, 2013.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. de. **A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, (1), p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104 Suppl, p. 31–40, 2009.

CROFT, S.; BARRETT, M.; URBINA, J. **Chemotherapy of trypanosomiases and leishmaniasis.** Trends in Parasitology, v. 21, (11), p. 508–512, 2005.

CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., et al. **Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant Trypanosoma cruzi antigen.** Proc. Natl. Acad. Sci, USA, v. 92, p. 3541-3545, 1995.

DEKANT, W. & VAMVAKAS, S. **Biotransformation and Membrane Transport in Nephrotoxicity.** Journal Critical Reviews in Toxicology, v. 26 (3), p. 309-334, 1996.

DIAS, J.; SILVEIRA, A.; SCHOFIELD, C. **The impact of Chagas disease control in Latin America: a review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, (5), p. 603–612, 2002.

ESPUELAS, S.; PLANO, D.; NGUEWA, P.; et al. **Innovative Lead Compounds and Formulation Strategies As Newer Kinetoplastid Therapies.** *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, (25), p. 4259–4288, 2012.

FIOCRUZ. Portal da doença de Chagas, 2017. **Diagnóstico.** Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/diagnostico/>>. Acesso em: 16/12/2019 às 22:27.

GARCIA, E. S.; DE AZAMBUJA, P. **Infection of triatomines with *Trypanosoma cruzi*.** In: **The Molecular Biology of Insect Disease Vectors.** Dordrecht: Springer Netherlands, p. 146–155, 1997.

GIESBRECHT, A.M., DAVINO, S.C., NASSIS, C.Z., et al. **Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones.** *Química Nova*, v. 13, p. 312-314, 1990.

GOMES, Y.M., LORENA, V.M., LUQUETTI, A. O. **Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies?** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104 (1), p. 115–21, 2009.

HALL, I.H., STARNES, C.O., LEE, K.H., et al. **Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents.** *J. Pharmacol. Sci*, v. 69, p. 537-543, 1980.

HARTWELL, L., WEINHART, T. **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** *Science*, v. 246, p. 629-634, 1989.

JORGE, T.C.A.; CASTRO, S.L. **Doença de chagas: manual para experimentação animal.** Editora FIOCRUZ, Antropologia e Saúde collection. Rio de Janeiro, p. 368, 2000.

KOHLER, J.C., BAGHDADI-SABETI, G. **The World Medicines Situation 2011 third ed.** World Health Organization, Geneva, 2011.

KRAMER, J.A., O'NEILL, E., PHILLIPS, M.E., et al. **Early toxicology signal generation in the mouse.** *Toxicol. Pathol.* v. 38, p. 452–471, 2010.

LANA, M.; DE MENEZES MACHADO, E. M. **Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity**. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition. [s.l: s.n.]p. 345–369, 2017.

LEE, K.J., HALL, I.H., MAR, E.C., et al. **Sesquiterpene Antitumor Agents: Inhibitors of Cellular Metabolism**. Science, v. 196, p. 533-536, 1977.

LEE, M.Y., SHIN, I.S., SEO, C.S, et al. **Sub chronic oral toxicity studies of the traditional herbal formula Bangpunglongseong-an in Crl:CD (SD) rats**. J. Ethnopharmacol. v. 144, p. 720–725, 2012.

LYSS, G., SCHMIDT, T. J., MERFORT, I., et al. **Helenalin, an antiinflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kB**. Biological Chemistry, v. 378 (9), p. 951-961, 1997.

MARTINS-MELO, F.R. et al. **Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis**. Acta Tropica, v. 130, p. 167–174, 2013.

MELLO, C. G. C.; BRANQUINHO, R. T.; OLIVEIRA, M. T.; et al. **Efficacy of Lychnopholide Polymeric Nanocapsules after Oral and Intravenous Administration in Murine Experimental Chagas Disease**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 60, (9), p. 5215–5222, 2016.

MICHEL, M.C.P., GUIMARÃES, A.G., PAULA, C.A., et al. **Extracts from the leaves of *Campomanesia velutina* inhibits production of LPS/inf- $\gamma$  induced inflammatory mediators in J774A.1 cells and exerts anti-inflammatory and antinociceptive effects in vivo**. Rev. Bras. Farmacogn. v. 23, p. 927–936, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Chagas**. N° 397, out, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2020**. Brasília – DF, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção.** 2019. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods, v. 65, (1–2), p. 55–63, 1983.

MUKINDA, J.T. & SYCE, J. A. **Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents.** Journal of Ethnopharmacology, v. 112 (1), p. 138-142, 2007.

MUÑOZ, M. J., MURCIA, L., & SEGOVIA, M. **The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease.** Expert Review of Anti-Infective Therapy, Vol. 9 (1), 5–7, 2011.

OLIVEIRA, A. B. et al. **Trypanocidal Sesquiterpenes from *Lychnophora* Species.** Phytotherapy Research, Vol. 10: p. 292-295, 1996.

OLIVEIRA, L. T., DE PAULA, M. A., ROATT, B. M., et al. **Impact Of Dose And Surface Features On Plasmatic And Liver Concentrations Of Biodegradable Polymeric Nanocapsules.** Pharmaceutical sciences, 2017.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; PEREZ, A. M.; NORMAN, F. F.; et al. **Old and new challenges in Chagas disease. The Lancet. Infectious diseases,** v. 15, (11), p. 1347–56, 2015.

PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** The Lancet. Infectious diseases, v. 1 (2), p. 92–100, 2001.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. **Chagas disease.** The Lancet, v. 375, (9723), p. 1388–1402, 2010.

ROMANHA, A. J. et al. ***In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105 (2), p. 233-238, mar. 2010.

SALEM, M.; WERBOVETZ, K. **Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis.** Current Medicinal Chemistry, v. 13 (21), p. 2571–2598, 2006.

SCHMUNIS, G. A., YADON, Z.E. **Chagas disease: A Latin American health problem becoming a World health problem.** Acta Tropica, v. 115, p. 14-21, 2010.

SEAMAN, F. C. **Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae.** The Botanical Review, v. 48, (2), p. 121–594, 1982.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Chagas aguda no Brasil:** série histórica de 2000 a 2013. Boletim epidemiológico, Brasil, v. 46, (21), 2015.

SILVA, C. F. **Activities of Psilostachyin A and Cynaropicrin against *Trypanosoma cruzi* *In vitro* and *In vivo*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 57 (11), p. 5307 – 5314, 2013.

SIMÕES, M. V, ROMANO, M. M. D., SCHMIDT, A.; et al. **Cardiomiopatia da doença de Chagas.** International Journal of Cardiovascular Sciences, v. 31 (2), p. 173-189, 2018.

SULSEN, V. P.; FRANK, F. M.; CAZORLA, S. I.; et al. **Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae).** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 52, (7), p. 2415–2419, 2008.

SÜLSEN, V. P.; FRANK, F. M.; CAZORLA, S. I.; et al. **Psilostachyin C: A natural compound with trypanocidal activity.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 37, n. 6, p. 536–543, 2011.

TEO, S., STRLIG, D., THOMAS, S., et al. **A 90 days oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats.** *Toxicology*, v. 79, p. 183–196, 2002.

THANABHORN, S., JAIJOY, K., THAMAREE, S., et al. **Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Locinera japonica* Thunb.,** v. 107, p. 370–373, 2006.

TOWERS, G. H. N., WAT, C. K., GRAHAM, E. A., et al. **Ultraviolet-mediated antibiotic activity of species of compositae caused by polyacetylenic compounds,** *Lloydia*, v.40 (5), p. 487-498, 1977.

UGOLINE, B. C. A., DE SOUZA, J., FERRARI, F. C., et al. **II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015.** *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 25, n. spe, p. 7-86, 2016.

URBINA, J. A. **New Advances in the Management of a Long-Neglected Disease.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, (11), p. 1685–1687, 2009.

WHO. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development:** fourth WHO report on neglected tropical diseases; 2017.

WHO – World Health Organization 2018. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponível em <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 28 jan. 2019.

WOERDENBAG, H.J., MERFORT, I., PASSREITER, C.M., et al. **Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines.** *Planta Med*, v. 60, p. 434-43, 1994.