

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO
VALQUIRIA FERRAZZINI LOZANO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E EFEITO SINÉRGICO
DE COMPOSTOS CUMARÍNICOS COMPARADOS AO BENZNIDAZOL
EM DUAS CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

SÃO PAULO
2011

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO
VALQUIRIA FERRAZZINI LOZANO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E EFEITO SINÉRGICO
DE COMPOSTOS CUMARÍNICOS COMPARADOS AO BENZNIDAZOL
EM DUAS CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado Profissional em Farmácia
da Universidade Bandeirantes de São
Paulo, como requisito parcial à
obtenção do Título de Mestre em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina
Machado dos Santos

SÃO PAULO
2011

Lozano, Valquiria Ferrazzini

Avaliação da atividade antiparasitária e efeito sinérgico de compostos cumarínicos comparados ao Benznidazol em duas cepas de *Trypanosoma cruzi* / Valquiria Ferrazzini Lozano. – São Paulo: [s.n.], 2011.

116 f, Il,; 30cm.

Dissertação de Mestrado – Programa de Farmácia -
Universidade Bandeirante de São Paulo,

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Regina Machado dos Santos

1. Atividade antiparasitária 2. Benznidazol 3. Compostos cumarínicos I.Título

Dedico este trabalho, meu carinho e eterno agradecimento ao amigo **Luís Antônio Bafille Leoni**, por ter acreditado e me incentivado para um novo direcionamento profissional.

“Que possamos somar nossos entusiasmos e utilizá-los para promover um mundo melhor aos que necessitam.”

A Val de sempre!

Meus sinceros e eternos agradecimentos...

A Deus e aos amigos espirituais pela inspiração, entendimento e sabedoria.

À minha mãe, pelas inúmeras preces, pelas palavras de entusiasmo e incentivo nos momentos de aflição.

Ao meu marido Kako Lozano pela torcida, paciência e compreensão.

À minha orientadora Dra Márcia Regina Machado dos Santos, pela amizade, carinho, paciência, confiança, apoio durante os obstáculos, determinação durante a conquista e por aceitar salvar o planeta comigo (ou pelo menos parte dele).

À minha co-orientadora (rsrsrs) e amiga Livia Taba Oyafuso por cada minuto (e não foram poucos) ao meu lado me auxiliando em todas as dúvidas e me incentivando com suas palavras “Calma, tudo vai dar certo”, por inúmeras vezes nos momentos de cansaço. Meu verdadeiro anjo de guarda e eterna amiga.

À amiga Ana Carolina Medeiros, que sempre esteve presente quando solicitada sem medir esforços para me auxiliar.

Ao amigo Daniel Artur Freitas de Oliveira, por sempre me lembrar do que eu mais precisava: “Foco, Val!”- dizia ele quando me via perdida. Pelos inúmeros cafezinhos que tomamos juntos e que fizeram a diferença.

À equipe de funcionários do Laboratório de Farmácia: Oseraldo (Zê), Cristina Santos, Talita (Tatá), Ivair e Roberto, que proporcionaram alegria em todos os dias de trabalho.

A toda equipe de professores e mestrandos, que tornaram o ambiente muito mais inspirador para os estudos, sempre dispostos a auxiliar.

A todos os meus amigos pela torcida e vibrações de sucesso.

Vocês fizeram a diferença em minha vida!

"A vida é uma estrada com amanhã inesperados; por isso não podemos nos deixar abater por uma derrota, nem permitir que nada, nem ninguém estabeleça onde podemos chegar!"
(Autor Desconhecido)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	DOENÇA DE CHAGAS	21
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	22
2.3	<i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> : O PARASITO.....	25
2.4	CICLO E FORMAS EVOLUTIVAS EM HOSPEDEIRO VERTEBRADO.....	27
2.4.1	Ciclo evolutivo.....	27
2.4.2	Forma epimastigota.....	28
2.4.3	Forma tripomastigota metacíclica.....	29
2.4.4	Forma amastigota.....	31
2.5	HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS.....	32
2.6	RELAÇÃO PARASITO-CÉLULA HOSPEDEIRA E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	33
2.6.1	Invasão celular.....	35
2.7	PATOGENIA, SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO.....	37
2.8	TRATAMENTO.....	37
2.8.1	Tratamento específico.....	38
2.9	MECANISMO DE AÇÃO DO NIFURTIMOX E BENZNIDAZOL.....	40
2.9.1	Nifurtimox	41
2.9.2	Benznidazol.....	42
3	SUBSTÂNCIAS NATURAIS BIOATIVAS	43
3.1	CUMARINA.....	43
3.2	METAIS.....	44
4	JUSTIFICATIVA	46
5	OBJETIVO	47
5.1	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	47
6.	MATERIAL E MÉTODO	48
6.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	48
6.1.1	Cultura de células VERO.....	48

6.1.2	Cultura de <i>T. cruzi</i> formas Tripomastigota metacíclicas.....	49
6.1.3	Cultura de células VERO infectadas com <i>T. cruzi</i>	49
6.2	COMPOSTOS UTILIZADOS.....	50
6.2.1	Características dos compostos.....	50
6.2.2	Diluição dos Compostos.....	51
6.3	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT.....	51
6.3.1	Método de redução do MTT.....	51
6.3.2	Padronização da técnica MTT em culturas de epimastigota de <i>T. cruzi</i>	53
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA.....	54
6.4.1	Forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> das cepas G e CL.....	54
6.4.2	Forma amastigota de <i>T. cruzi</i> das cepas G e CL.....	54
6.4.3	Preparação das lâminas de microscopia.....	55
6.4.4	Análise da atividade dos compostos <i>in vitro</i>	56
6.5	AVALIAÇÃO ANTIPARASITÁRIA ATRAVÉS DE ASSOCIAÇÕES DE COMPOSTOS.....	57
6.6	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS PARASITAS.....	58
6.6.1	Extração de Proteínas.....	58
6.6.2	Quantificação de proteínas pelo método de Biureto.....	58
6.6.3	Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE.....	58
6.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	59
6.7.1	Sequestro dos radicais superóxido.....	60
6.7.2	Avaliação da ação antioxidante pelo método de redução do NBT.....	60
6.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
7	RESULTADO	61
7.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS E SOLVENTE.....	61
7.1.1	Solvente DMSO.....	61
7.1.2	Benznidazol.....	62
7.1.3	Cumarina.....	63
7.1.4	Substâncias bioativas sintéticas derivadas da cumarina.....	64

7.1.4.1	4H3NC.....	64
7.1.4.2	4H3NC-Cu.....	65
7.1.4.3	4H3NC-Fe.....	66
7.1.4.4	4H3NC-Ni.....	67
7.1.4.5	4H3NC-Zn.....	69
7.1.5	Citotoxicidade em células VERO dos compostos testados.....	70
7.2	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO MTT EM <i>T. CRUZI</i> – FORMA EPIMASTIGOTA.....	71
7.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>IN VITRO</i> DOS COMPOSTOS.....	72
7.3.1	<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa G forma epimastigota.....	72
7.3.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL forma epimastigota.....	73
7.3.3	Comparação da atividade e citotoxicidade das concentrações dos compostos entre as cepas G e CL de <i>T. cruzi</i> na forma epimastigota e nas células VERO.....	74
7.3.4	<i>Trypanosoma cruzi</i> cepa G e CL na forma amastigota.....	75
7.3.5	Resultado do tratamento nas formas amastigotas da cepa G.....	75
7.3.6	Resultado do tratamento nas formas amastigotas da cepa CL.....	77
7.3.7	Comparação da atividade antiparasitária dos compostos em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> cepa G e CL.....	79
7.4	ASSOCIAÇÕES DE COMPOSTOS PARA TRATAMENTO DA FORMA AMASTIGOTA DE <i>T. CRUZI</i>	80
7.4.1	Avaliação da citotoxicidade em células VERO de associações dos compostos.....	81
7.4.2	Atividade anti-amastigota de cepas G e CL das associações de compostos.....	82
7.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS PARASITOS.....	84
7.5.1	Curva padrão de BSA.....	84
7.5.2	Quantidade de proteínas totais obtidas em extratos de 10 ⁸ parasito/mL após tratamento com os compostos por 24h.....	85
7.5.3	Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE.....	85

7.5.3.1	Cepa G.....	86
7.5.3.2	Cepa CL.....	87
7.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	89
7.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	90
7.7.1	Cepa G.....	90
7.7.2	Cepa CL.....	91
8	DISCUSÃO.....	93
9	CONCLUSÃO.....	98
10	REFERÊNCIAS.....	99
11	APÊNDICE.....	110
11.1	CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS UTILIZADOS EM μg E μM	110
11.2	VALORES DAS LEITURAS DE ABSORBÂNCIAS.....	110
11.2.1	Determinação da citotoxicidade dos compostos.....	110
11.2.2	Tempo de ação máxima do MTT em forma epimastigota de <i>T. cruzi.</i>	113
11.3	CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS EM CÂMARA DE NEUBAUER.	113
11.3.1	Contagem para avaliação da anti-epimastigota da cepa G.....	113
11.3.2	Contagem para avaliação da anti-epimastigota da cepa CL.....	114
11.4	LEITURA DE ABSORBÂNCIA PARA AVALIAÇÃO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Casos de Doença de Chagas Aguda entre 2005 a 2010 no Brasil.....	23
Tabela 02	Casos de Doença de Chagas Aguda (DCA), Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2010	24
Tabela 03	Óbitos por Doença de Chagas Aguda (DCA) Brasil, 2005-2010.....	25
Tabela 04	Massa molar dos compostos utilizados	50
Tabela 05	Cálculo utilizado para resultado de índice de infecção.....	56
Tabela 06	Porcentagem de células VERO viáveis na presença de DMSO.....	62
Tabela 07	Porcentagem de células viáveis devido à ação do fármaco Benznidazol utilizados em diferentes concentrações em μM	62
Tabela 08	Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto cumarina e as respectivas concentrações em μM	63
Tabela 09	Porcentagem de células viáveis devido à ação do 4H3NC com as respectivas concentrações em μM	65
Tabela 10	Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Cu com as respectivas concentrações em μM	66
Tabela 11	Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Fe com as respectivas concentrações em μM	67
Tabela 12	Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Ni com as respectivas concentrações em μM	68
Tabela 13	Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Zn com as respectivas concentrações em μM	69
Tabela 14	Valores em μM do IC_{50} dos compostos utilizados, em ordem decrescente.....	70
Tabela 15	Comparação da porcentagem da atividade antiparasitária entre os compostos nas cepas G e CL e células VERO.....	74
Tabela 16	Índice de infecção e avaliação da ação dos compostos na forma amastigota de <i>T.cruzi</i> cepa G.....	76
Tabela 17	Índice de infecção e avaliação da ação dos compostos na forma amastigota de <i>T.cruzi</i> cepa CL.....	78

Tabela 18	Comparação de índice de infecção entre as cepas G e CL quanto à ação dos compostos.....	80
Tabela 19	Avaliação da ação das associações de compostos e índice de infecção na forma amastigota de <i>T. cruzi</i> cepa G.....	82
Tabela 20	Avaliação da ação das associações de compostos e índice de infecção na forma amastigota de <i>T. cruzi</i> cepa CL.....	83
Tabela 21	Quantidade de proteínas totais das cepas G e CL após tratamento..	85
Tabela 22	Comparação do perfil de bandas protéicas expressas nos parasitos das cepas G e CL de <i>T. cruzi</i> , após tratamento com os compostos..	88
Tabela 23	Resultados estatísticos de índice de infecção dos compostos testados em cepa G da forma amastigota do <i>T. cruzi</i>	90
Tabela 24	Resultados estatísticos de índice de infecção dos compostos testados em cepa CL da forma amastigota do <i>T. cruzi</i>	91
Tabela 25	Valores das concentrações dos compostos utilizados em µg e µM...	110
Tabela 26	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do solvente DMSO.....	111
Tabela 27	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do fármaco Benznidazol..	111
Tabela 28	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade da Cumarina.....	111
Tabela 29	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC.....	111
Tabela 30	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Cu.	112
Tabela 31	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Fe..	112
Tabela 32	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Ni..	112
Tabela 33	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Zn..	112
Tabela 34	Leituras de absorvância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade das associações de	

	compostos.....	113
Tabela 35	Leituras de absorbância em triplicatas dos testes para determinação do tempo de ação máxima do MTT em células viáveis de <i>T. cruzi</i> na forma epimastigota.....	113
Tabela 36	Valores em triplicatas da contagem de células em câmara de Neubauer, para avaliação anti-epimastigota da cepa G de <i>T. cruzi</i> ...	113
Tabela 37	Valores em triplicatas da contagem de células em câmara de Neubauer, para avaliação anti-epimastigota da cepa CL de <i>T. cruzi</i> .	114
Tabela 38	Leituras de absorbância dos compostos para avaliação da ação antioxidante.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Carlos Chagas, descobridor da doença, em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz.....	21
Figura 02	Carlos Chagas e Belisário Penna em Lassance (MG).....	22
Figura 03	Caracterização dos principais gêneros de Trypanosomatidae.....	26
Figura 04	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	28
Figura 05	Formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>	29
Figura 06	Esquema geral da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i>	29
Figura 07	Formas tripomastigotas metacíclicas.....	30
Figura 08	Esquema geral da forma tripomastigota do <i>T. cruzi</i>	30
Figura 09	Célula VERO infectada com formas amastigotas intracelulares do <i>T. cruzi</i>	31
Figura 10	Forma Amastigota do <i>T. cruzi</i>	31
Figura 11	Célula VERO rompida e os parasitos sendo liberados para o meio extracelular.....	32
Figura 12	Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>T. cruzi</i>	32
Figura 13	Triatomíneo realizando o hematofagismo.....	33
Figura 14	Ciclo do <i>T. cruzi</i> no inseto vetor.....	33
Figura 15	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no triatomíneo e no hospedeiro.....	34
Figura 16	A ativação de diferentes vias de transdução.....	36
Figura 17	Papel da glutathione e tripanotiona na ação e metabolismo dos medicamentos antichagásica nifurtimox e benznidazol.....	40
Figura 18	Estrutura química do Nifurtimox.....	41
Figura 19	Estrutura química do Benznidazol.....	42
Figura 20	Estrutura química da Cumarina.....	43
Figura 21	Cultura de células VERO.....	48
Figura 22	Foto de células VERO infectadas.....	49
Figura 23	Reação de redução do MTT em um precipitado de formazan.....	52
Figura 24	Precipitado de formazan e a dissolução em DMSO.....	53

Figura 25	Lâminas montadas com lamínulas de células VERO infectadas.....	56
Figura 26	Imagem de células VERO infectadas.....	57
Figura 27	Curva de citotoxicidade do fármaco Benznidazol.....	63
Figura 28	Curva de citotoxicidade do composto cumarina.....	64
Figura 29	Curva de citotoxicidade do composto 4H3NC.....	65
Figura 30	Curva de citotoxicidade do composto 4H3NC-Cu.....	66
Figura 31	Curva de citotoxicidade do composto 4H3NC-Fe.....	67
Figura 32	Curva de citotoxicidade do composto 4H3NC-Ni.....	68
Figura 33	Curva de citotoxicidade do composto 4H3NC-Zn.....	69
Figura 34	Padronização do MTT – Tempo de ação máxima.....	71
Figura 35	Avaliação da atividade antiparasitária da cepa G na forma epimastigota.....	72
Figura 36	Avaliação da atividade antiparasitária da cepa CLna forma epimastigota.....	73
Figura 37	Índice de infecção da cepa G da forma amastigota.....	77
Figura 38	Índice de infecção da cepa CL da forma amastigota.....	79
Figura 39	Sinergismo de ação dos compostos em células VERO.....	81
Figura 40	Comparação dos IF obtidos das duas cepas G e CL de <i>T. cruzi</i>	83
Figura 41	Curva padrão de BSA, método de Biureto.....	84
Figura 42	Gel SDS-PAGE com perfil eletroforético das proteínas totais de <i>T. cruzi</i> cepa G, tratados com os compostos experimentais.....	86
Figura 43	Gel SDS-PAGE com perfil eletroforético das proteínas totais de <i>T. cruzi</i> cepa CL, tratados com os compostos .experimentais.....	87
Figura 44	Atividade antioxidante dos compostos utilizados pela medida indireta da redução de NBT.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

4H3NC	4-hidroxi-3-nitrocumarina
4H3NC-Cu	4-hidroxi-3-nitrocumarina-Cu ⁺⁺
4H3NC-Fe	4-hidroxi-3-nitrocumarina- Fe ⁺⁺
4H3NC-Ni	4-hidroxi-3-nitrocumarina- Ni ⁺⁺
4H3NC-Zn	4-hidroxi-3-nitrocumarina- Zn ⁺⁺
AMP _c	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
gp35/50	Glicoproteína 35 e 50 kDa de <i>T. cruzi</i>
gp82	Glicoproteína 82 kDa de <i>T. cruzi</i>
gp85	Glicoproteína 85 kDa de <i>T. cruzi</i>
gp90	Glicoproteína 90 kDa de <i>T. cruzi</i>
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-ácido 1-piperazineethanesulfonic)</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IP ₃	Receptor trifosfato de inositol
LIT	<i>Liver Infusion Triptase</i>
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NBT	Azul de nitrotetrazólio
p175	Proteína 175
PBS	Tampão Salina fosfato
PMS	Finazina metassulfato
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute - 1640</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio de eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro fetal bovino
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. brucei gambiensi</i>	<i>Trypanosoma brucei gambiensi</i>
<i>T. brucei rangeli</i>	<i>Trypanosoma brucei rangeli</i>
<i>T. brucei rhodesiensi</i>	<i>Trypanosoma brucei rhodesiensi</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamine
Tris-HCL	(hidroxymethyl) aminomethane hydrochloride
VERO	African green monkey kidney cells fibroblasts

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior
<	Menor
μ	Micro
%	Porcentagem
Ca^{2+}	Cálcio
CO_2	Gás carbônico
Fe^{3+}	Íon férrico
g	Gramma
g/mol	Gramma por mol
H	Hora
H_2O	Água
KCL	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Dihidrogenofosfato de potássico
NaCL	Cloreto de Sódio
Na_2HPO_4	Monohidrogenofosfato de sódio
OH	Hidroxi
pH	Potencial de hidrogênio
μL	Microlitro
μM	Micromolar
UI/L	Unidade Internacional por litro

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, encontra-se amplamente distribuída em zonas rurais da América Central e do Sul. Constitui um dos maiores problemas de saúde pública das Américas (MAYA, 2006).

O medicamento Benznidazol, utilizado atualmente no tratamento da Doença de Chagas, apresenta eficácia acima de 80% na fase aguda e diminuiu para 8% a 30% na fase crônica. O sucesso da terapêutica esbarra em alguns pontos tais como: esquema terapêutico prolongado, reações adversas, variabilidade genética dos parasitos e cepas naturalmente resistentes aos fármacos; mostrando a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que, por um lado, apresentem menor toxicidade, e por outro, maior eficácia na fase crônica (OLIVEIRA, 2008).

Em nossos estudos comparamos a atividade de compostos cumarínicos complexados com metais e do Benznidazol, bem como efeito sinérgico de associações de compostos nas formas extracelular e intracelular do *T. cruzi*. Os dados indicam que a ação dos compostos como a cumarina, 4H3NC-Fe, 4H3NC-Ni, 4H3NC-Cu e 4H3NC-Zn foram comparáveis ou melhores que o Benznidazol. O composto 4H3NC-Zn mostrou ser bastante citotóxico. Todos os compostos apresentaram ação antiparasitária, porém a atividade do composto 4H3NC-Fe foi extremamente significativa na cepa CL quando comparado ao controle. O estudo das associações de compostos mostrou-se mais eficaz na ação antiparasitária para a cepa G e também modificou a expressão de proteínas nas duas cepas G e CL. Apenas os compostos 4H3NC e 4H3NC-Cu mostraram ação antioxidante, sugerindo um mecanismo de ação antiparasitária diferente dos outros compostos. A continuidade destes estudos com testes *in vivo*, poderá contribuir para a utilização desses compostos como futuros medicamentos para Doença de Chagas.

Palavras-chave: Atividade antiparasitária. Benznidazol. Compostos cumarínicos.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is widespread in rural areas of Central America and South constitutes a major public health problems of the Americas (Maya, 2006).

Benznidazole The drug, currently used to treat Chagas disease, its effectiveness over 80% in the acute phase and decreased to 8% to 30% in chronic phase. The success of therapy touches on some points such as prolonged treatment regimen, adverse reactions, genetic variability of parasite strains and naturally resistant to the drugs, indicating the necessity of development of new drugs with, significantly lower toxicity, and with, greater effectiveness in the chronic phase (OLIVEIRA, 2008).

In our studies we compared the activity of coumarin compounds and metals complexed with Benznidazole and synergistic effect of compounds association in extracellular and intracellular forms of *T. cruzi*. The data indicate that the action of compounds such as coumarin, 4H3NC-Fe-Ni 4H3NC, 4H3NC 4H3NC-Cu-Fe and were comparable or better than Benznidazole. The compound 4H3NC-Zn proved to be quite cytotoxic. All the compounds showed antiparasitic action, however, the activity of the compound 4H3NC-Fe was highly significant in CL strain compared with the control. The study of the synergistic of association compounds demonstrated a better effective antiparasitic action in the strain G and also altered protein expression in both strains G e CL. Only compounds 4H3NC and 4H3NC-Cu showed an antioxidants activity, suggesting a different mechanism of action for other antiparasitic compounds. The continuation of these studies with *in vivo* tests, may contribute to the use these compounds as future drugs for Chagas disease.

Keywords: antiparasitic activity. Benznidazole. Coumarin compounds.

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2009 completou 100 anos que o médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas comunicou a descoberta da Doença de Chagas. Já em 1909 além da doença ele já havia identificado também o seu agente causador, o *Trypanosoma cruzi*, e os insetos que o transmitiam, os triatomídeos, conhecidos popularmente como “barbeiro”. Um feito considerado único na história da medicina e que constitui um marco na história da ciência e da saúde brasileira. Mas naquela época não se deu a devida importância a descoberta. Tratada com descaso a doença se disseminou pelo país mostrando diferentes vias de transmissão. Com a globalização e o consequente aumento da imigração em busca de uma vida melhor e da facilidade de locomoção entre os países e continentes, a doença está conquistando novos terrenos.

A doença afeta milhões de pessoas do sul da Califórnia à Argentina e ao Chile (MAYA, 2006), sendo estimado que cerca de 100 milhões de pessoas ainda correm o risco de contrair esta doença. Esforços têm se concentrado no controle do inseto vetor, porém os doentes crônicos se mantêm como reservatórios do parasito, sendo uma via de reinfecção da população (FAUNDEZ *et al.*, 2005).

Estima-se que 18 milhões foram infectados, sendo que em torno de 40% destes indivíduos irão desenvolver formas clínicas desta moléstia. De acordo com a Organização Mundial de Saúde e o Banco Mundial, são gastos mais de seis bilhões de dólares por ano no tratamento dessa doença (WHO, 2002), pois, essa enfermidade faz com que o indivíduo se torne debilitado e incapaz, sendo uma das principais causas da aposentadoria antecipada (DIAS, *et al.*, 1985; LOPES E CHAPADEIRO, 1986).

Ainda não sabemos tratar efetivamente essa doença na sua fase crônica, por isso ela necessita de muita atenção nas pesquisas. Considerada uma doença negligenciada, a indústria farmacêutica não investe em pesquisa e na produção de medicamentos, pois, não visualiza mercado nos países ricos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

Descoberta em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Figura 1) a **Tripanossomíase americana** ou **Doença de Chagas** é uma zoonose do continente americano que se estende do sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (REY, 2001). É uma enfermidade de caráter crônico causada pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este protozoário pertence à ordem Cinetoplastida, família *Trypanosomatidae*. Os membros dessa família apresentam de um a quatro flagelos e uma organela auto-replicável que contém DNA, o cinetoplasto, e podem ser encontrados em diferentes insetos hemípteros, animais silvestres e domésticos (LIU E ENGLUND, 2007). A doença foi considerada como um dos principais problemas de saúde pública na América Latina (OLIVEIRA , 2008)



Figura 01 - Carlos Chagas, descobridor da doença em seu laboratório no Instituto Oswaldo Cruz.
Fonte: KROPF (2007).

Como zoonose, não parece ter afetado o homem antes da colonização européia. Com os colonizadores foram introduzidas novas relações de produção, novas formas de ocupação de terra e novos modos de morar, entre os quais se contam as casas com paredes de barro (pau-a-pique) e os casebres de palha (Figura 2), habitados pelas famílias mais pobres das áreas rurais (REY, 2001).

Nessas habitações criaram-se ecótopos favoráveis para a vida de várias espécies de **triatomíneos**, conhecidos no Brasil sob as denominações populares de “barbeiro”, “chupança” ou “bicho de parede”, bem como “fincão”, “bicudo” ou “chupão”. Originalmente silvestres ou exóticos, eles aí se domiciliaram e passaram a transmitir a infecção aos moradores e aos seus animais domésticos (REY, 2001).



Figura 02 - Carlos Chagas e Belisário Penna em Lassance (MG).

Fonte: KROPF (2007).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Para entender melhor a epidemiologia da Doença de Chagas é necessário saber que existem basicamente três modos de circulação do *T. cruzi* na natureza que são extremamente importantes, sendo os ciclos: silvestre, paradoméstico e doméstico que se relacionam diretamente com os vetores e reservatórios que participam ativamente na distribuição geográfica, na prevalência e na incidência da doença (DIAS, 1999; REY,

2001). A Secretaria de Vigilância em Saúde fornece a situação epidemiológica conforme as Tabelas 01, 02 e 03 a seguir:

Tabela 01- Casos de Doença de Chagas Aguda entre 2005 a 2010 no Brasil.

Região e UF	2005	2006	2007	2008	2009	2010*
Região Norte	10	88	157	124	248	61
Rondônia	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	1	0
Amazonas	0	0	28	0	3	23
Roraima	0	0	0	0	0	0
Pará	10	83	109	99	238	38
Amapá	0	5	19	20	8	2
Tocantins	0	0	1	5	0	0
Região Nordeste	2	24	3	7	2	1
Maranhão	2	1	2	5	2	1
Piauí	0	2	1	1	0	0
Ceará	0	8	0	1	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	13	0	0	0	0
Região Sudeste	0	3	0	0	0	0
Minas Gerais	0	0	0	0	0	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0
São Paulo	0	3	0	0	0	0
Região Sul	24	0	0	0	0	0
Paraná	0	0	0	0	0	0
Santa Catarina	24	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	1	1	0	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	1	1	0	0	0
Goiás	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0
Brasil	36	116	161	131	250	62

Fonte: SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010

A Tabela 01 nos mostra que entre os anos 2005 a 2009 houve aumento nos casos agudos da Doença de Chagas e diminuição em 2010.

Tabela 02 - Casos de Doença de Chagas Aguda (DCA), Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 2010.

Região e UF	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Total
Região Norte	19	8	5	2	7	2	3	12	3	0	0	0	61
Rorônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	16	2	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	23
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	3	6	2	1	5	2	2	12	3	0	0	0	36
Amapá	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Minas Gerais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	19	8	5	2	7	2	3	12	4	0	0	0	62

Fonte: SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

A Tabela 02 nos mostra que a região norte do Brasil, os estados da Amazônia e Pará se destacaram na incidência da Doença de Chagas durante o ano de 2010.

Tabela 03 - Óbitos por Doença de Chagas Aguda (DCA) . Brasil, 2005-2010*

Região e UF	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
Região Norte	3	4	4	0	2	0	13
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	1	0	1
Roraima	0	0	0	0	0	0	0
Pará	3	4	4	0	1	0	12
Amapá	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	2	0	1	0	0	3
Maranhão	0	0	0	1	0	0	1
Piauí	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	2	0	0	0	0	2
Região Sudeste	0	1	0	0	0	0	1
Minas Gerais	0	0	0	0	0	0	0
Espírito Santo	0	0	0	0	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0
São Paulo	0	1	0	0	0	0	1
Região Sul	3	0	0	0	0	0	3
Paraná	0	0	0	0	0	0	0
Santa Catarina	3	0	0	0	0	0	3
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0
Goiás	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	6	7	4	1	2	0	20

Fonte: SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde, 2010.

Observamos na Tabela 03 que o índice maior de mortalidade no período foi no estado do Pará.

2.3 *TRYPANOSOMA CRUZI*: O PARASITO

Os tripanossomatídeos da família *Trypanosomatidae* apresentam uma grande mudança entre as formas celulares em seu ciclo biológico, devido ao complexo fenômeno da diferenciação celular. Esse pleomorfismo se torna evidente na transição entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados, mas pode ocorrer no interior de um

mesmo hospedeiro como uma forma de adaptação fisiológica ao ambiente ou uma antecipação à próxima etapa do ciclo (SIQUEIRA, 2005).

A Figura 3 caracteriza os principais gêneros da família Trypanosomatidae e os mais estudados por sua importância médica são *Trypanosoma* e *Leishmania* (REY, 2001).

O *T.cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*.

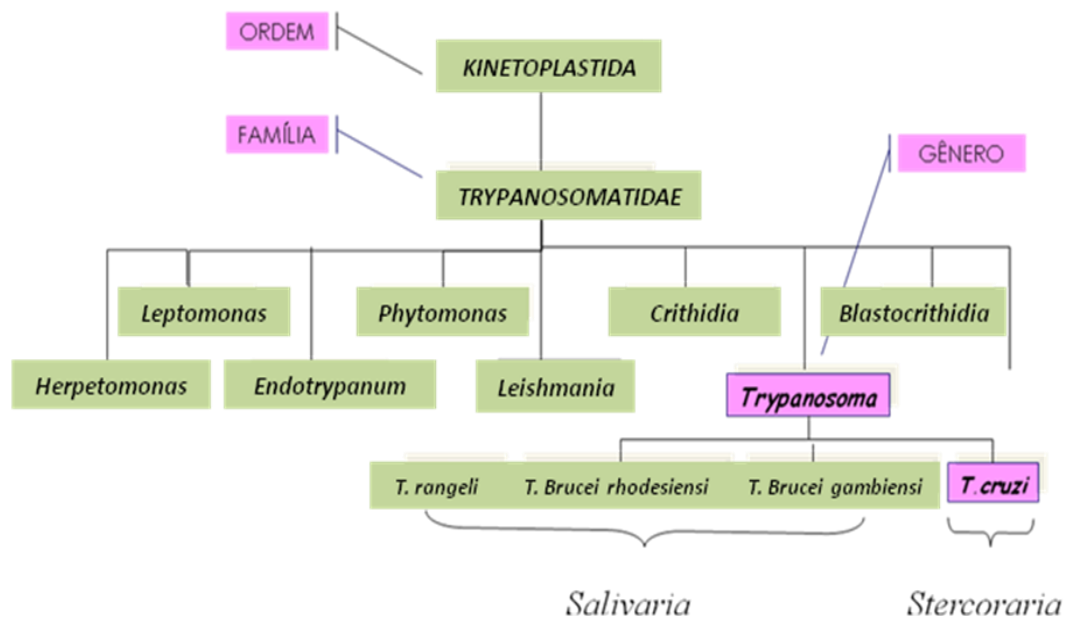


Figura 03 – Caracterização dos principais gêneros de Trypanosomatidae.
Fonte: REY (2001).

Por apresentar muitas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade, mostra que não se trata de uma espécie bem definida, na qual mais de 60 linhagens ou cepas já foram descritas, segundo diferentes critérios, incluindo: a origem geográfica, as espécies de hospedeiros, a virulência e a patogenicidade, as formas clínicas e epidemiológicas da doença, a resistência dos parasitos a drogas e medicamentos e características fenotípicas (REY, 2001).

Com base nas informações reunidas e nos estudos sobre o DNA ribossômico, três grupos de *T. cruzi* foram propostos no Brasil em 1999:

O grupo 1 composto por espécies encontrado em animais silvestres e triatomíneos que com eles convivem, particularmente na região amazônica, onde se mantém em um ciclo silvestre e produz, no homem, infecções esporádicas e assintomáticas.

O grupo 2 é o prevalente nas áreas endêmicas da doença de Chagas humana e tem como principal vetor o *Triatoma infestans*. Supõe-se que seja originário dos Andes bolivianos, tendo-se adaptado, com este vetor, a um ciclo doméstico nas habitações rústicas das zonas rurais. Acompanhando migrações humanas, propagou-se para os países do sul do Continente e invadiu o Brasil a partir dos estados sulinos. Ele é responsável pelas formas sintomáticas e graves da doença.

O grupo 3, de ocorrência mais rara, é também uma zoonose de animais silvestres, a merecer mais estudos para compreensão de seu papel epidemiológico.

Os *T. cruzi* dos grupos 1 e 3 raramente causam infecções, assintomáticas, do homem (SOUTO, 1996).

2.4 CICLO E FORMAS EVOLUTIVAS EM HOSPEDEIRO VERTEBRADO

2.4.1 Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo completo do *T. cruzi* (Figura 4) ocorre em duas etapas: uma no interior do hospedeiro invertebrado (vetor) e outra no interior do hospedeiro vertebrado (mamíferos em geral) (REY,2001).

- 01 Forma tripomastigota metacíclica penetra na célula do hospedeiro
- 02 Multiplicação por divisão binária para a forma amastigota
- 03 Célula hospedeira repleta de formas amastigotas
- 04 Se transforma em tripomastigota e rompe a célula hospedeira
- 05 Na corrente sanguínea penetra outras células
- 06 O inseto se alimentando de sangue infectado da forma tripomastigota
- 07 Transforma-se em epimastigota no intestino médio do inseto
- 08 Se multiplica no intestino médio do inseto
- 09 No intestino posterior se transforma em tripomastigota metacíclica
- 10 A forma tripomastigota metacíclica é liberada nas fezes do inseto que infecta o hospedeiro

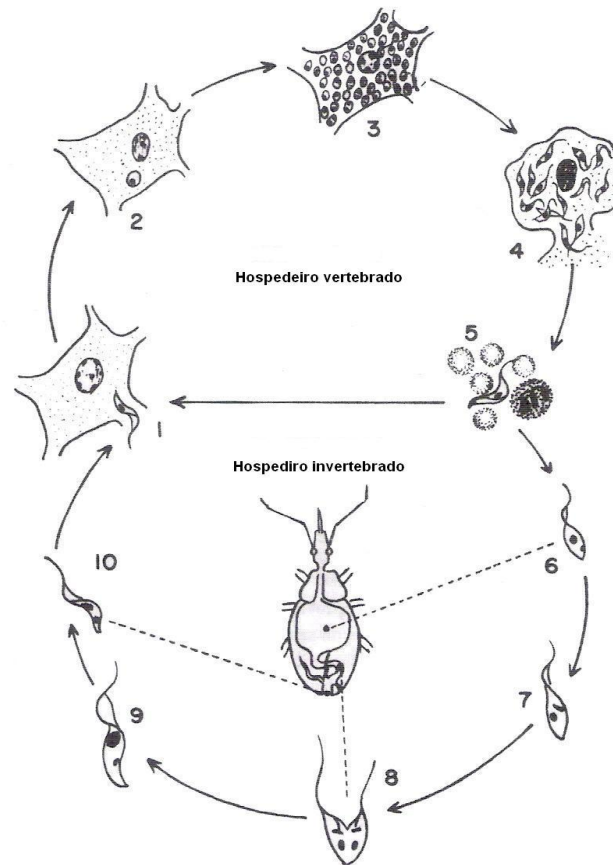


Figura 04 – Ciclo biológico do *T. cruzi*
 Fonte: Adaptado de NEVES (2003)

2.4.2 Forma epimastigota

Em seu ciclo de vida, o parasito exibe formas epimastigota, tripomastigota, amastigota ou de transição entre elas. A forma tripomastigota (Figuras 05 e 06) ingerida transforma-se em epimastigota no seguimento anterior do tubo digestivo do triatomíneo. São as formas multiplicativas do parasito dentro do inseto por divisão binária e diferencia-se na forma tripomastigota metacíclica. A forma epimastigota possui flagelo e o cinetoplasto e está localizado na região posterior do parasito ou entre a base do flagelo e o núcleo (REY, 2001).

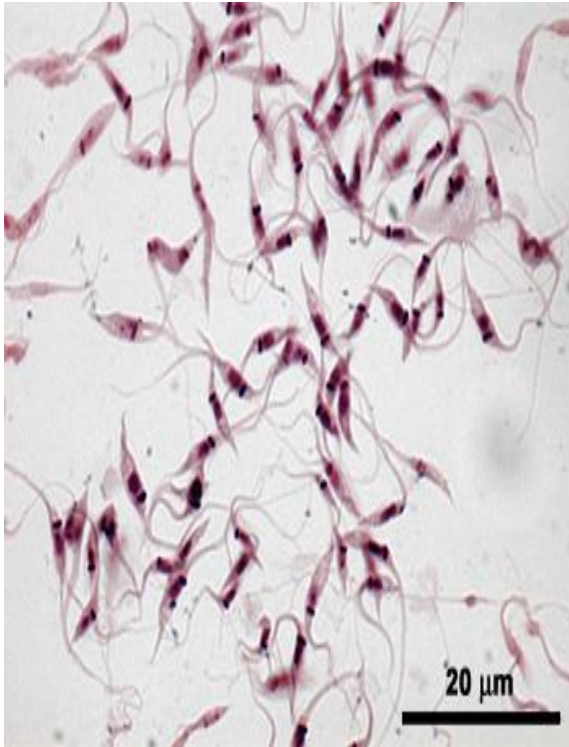


Figura 05 – Formas epimastigotas do *T. cruzi*
 Fonte: CARVALHO (2007).

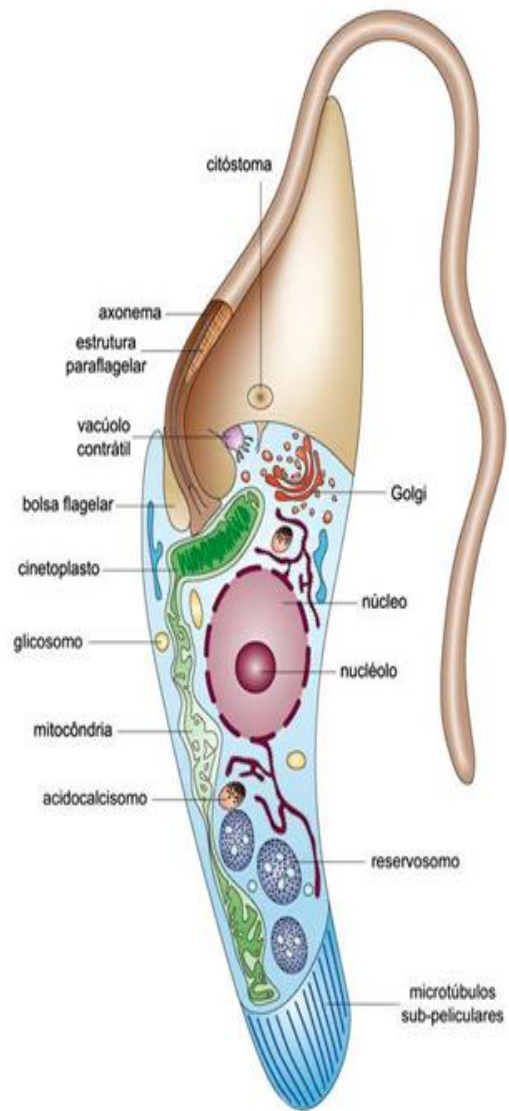


Figura 06 – Esquema geral da forma epimastigota do *T. cruzi*.
 Fonte: SOUZA (2007).

2.4.3 Forma tripomastigota metacíclica

A forma tripomastigota metacíclica (Figura 07 e 08) é eliminada junto com as fezes e urina sobre a pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, ela pode penetrar através do local da picada ou mucosas e invadir células nucleadas. A forma metacíclica tem o cinetoplasto na região anterior ao parasito e o flagelo corre todo o corpo formando a membrana ondulante (REY, 2001).

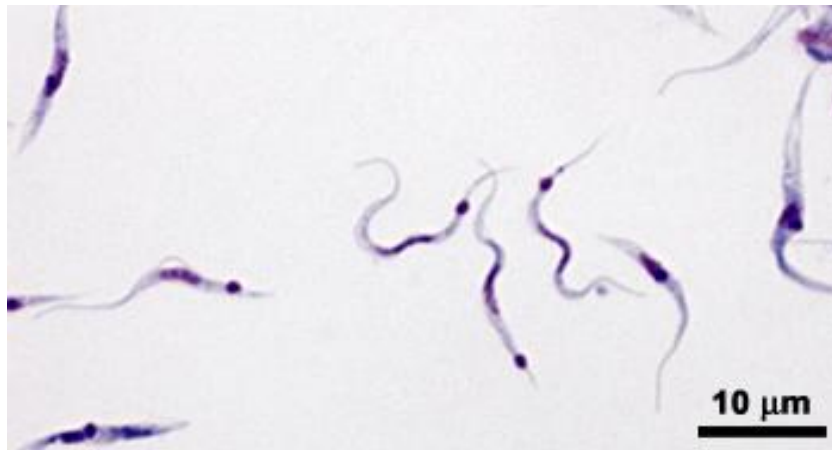


Figura 07 – Formas tripomastigotas metacíclicas.
Fonte: CARVALHO (2007).

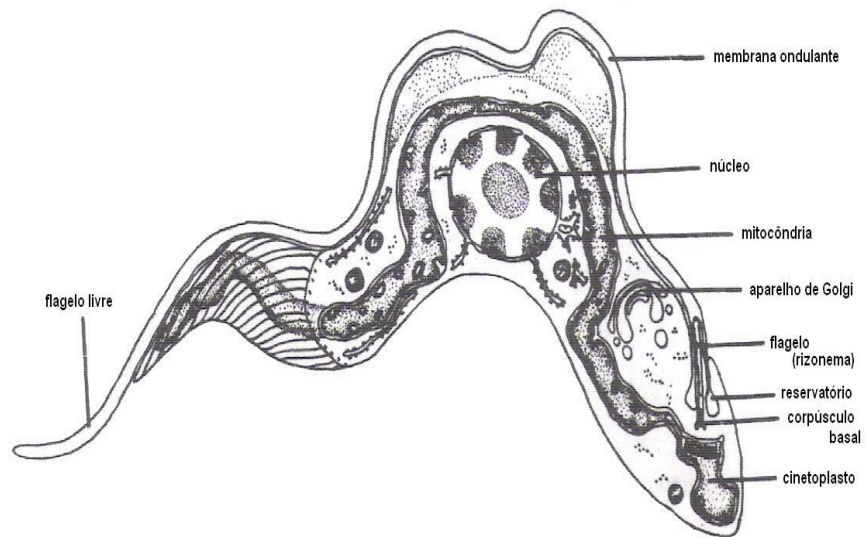


Figura 08 – Esquema geral da forma tripomastígota do *T. cruzi*.
Fonte: Adaptado de NEVES (2003).

2.4.4 Forma amastigota

No interior das células, a forma tripomastigota metacíclica diferencia-se na forma amastigota (Figura 09 e 10), a qual se replica por fissão binária. Esta forma não possui flagelo (REY, 2001).

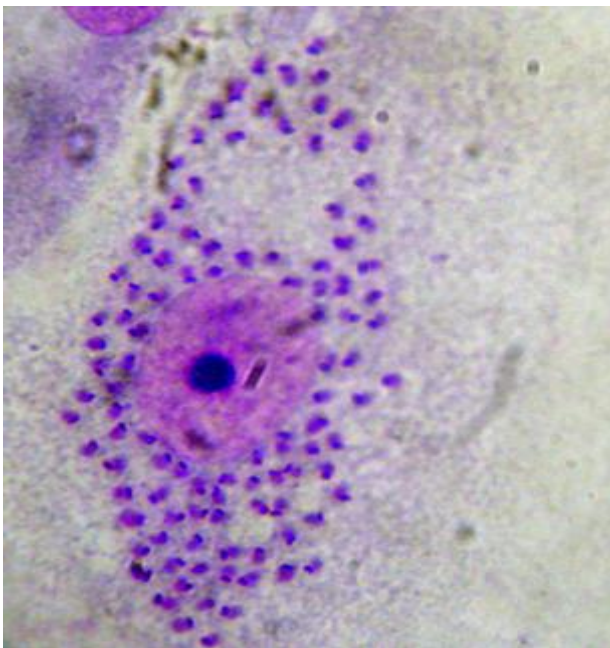


Figura 09 - Célula VERO infectada com formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi*.
Fonte: Acervo Pessoal.

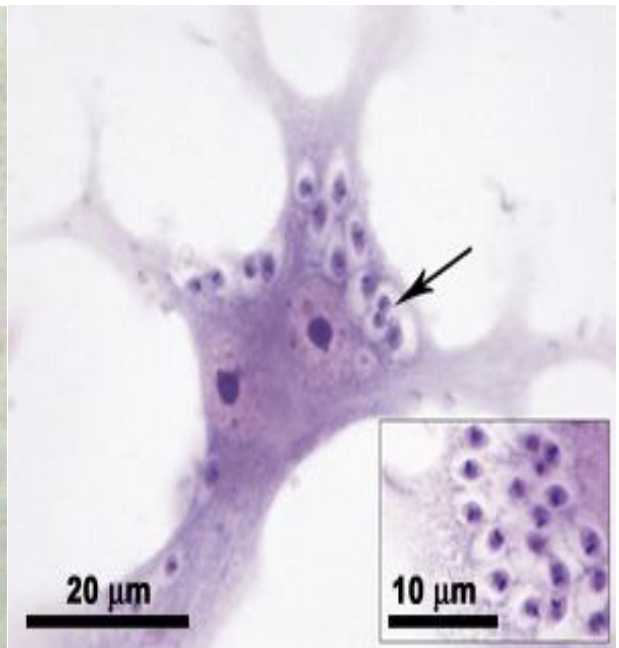


Figura 10 - Forma Amastigota do *T. cruzi*.
Fonte: CARVALHO (2007).

Após alguns ciclos de multiplicação os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, as células são rompidas e os parasitos são liberados para o meio extracelular (Figura 11 e 12) e/ou corrente sanguínea então, sendo denominados tripomastigota sanguíneo, podendo assim migrar e invadir novas células do hospedeiro ou serem sugados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo do parasito (BRENER, 1973).

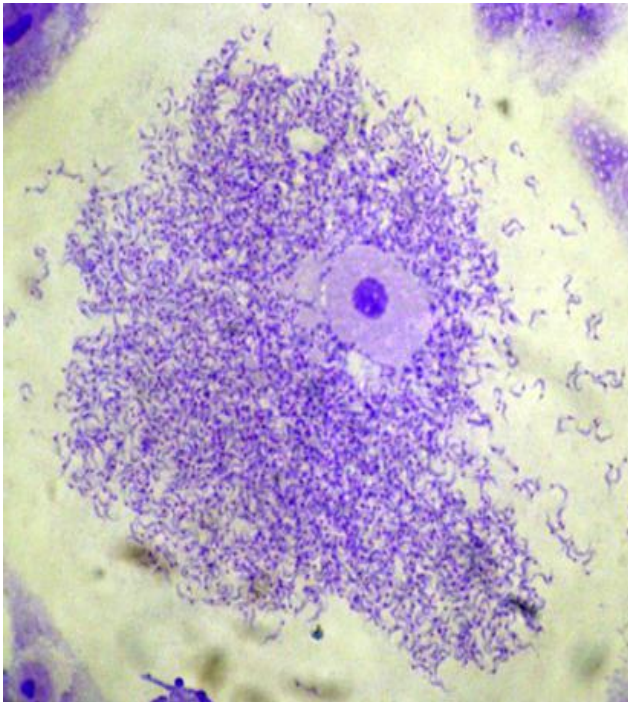


Figura 11 – Célula VERO rompida e os parasitos sendo liberados para o meio extracelular.
Fonte: Acervo Pessoal.

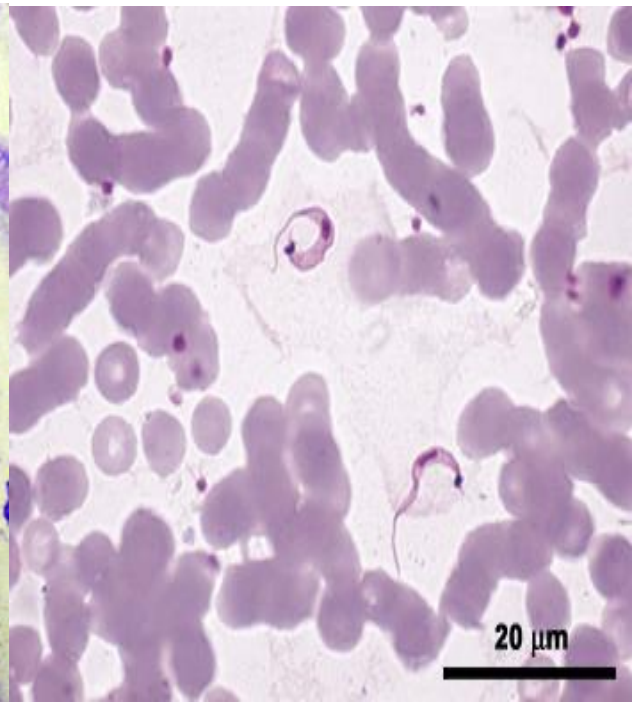


Figura 12 - Formas tripomastígotas sanguíneas do *T. cruzi*.
Fonte: CARVALHO (2007).

2.5 HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS

Quando o inseto, ao sugar sangue (Figura 13) de um vertebrado, ingere tripomastigotas sanguíneas, tem início o ciclo de desenvolvimento característico do *T. cruzi* (Figura 14) na luz intestinal dos triatomíneos. Esse ciclo lembra, sob muitos aspectos, o crescimento em meio de cultura à temperatura ambiente (REY, 2001).

Os flagelados que chegam à porção posterior do intestino médio encontram, por sua vez, um meio extremamente favorável onde se instalam permanentemente, pois a infecção mantém-se aí durante toda a vida do inseto (REY, 2001).

Quando os epimastigotas são levados para o intestino posterior do triatomíneo, alguns fixam-se por sua extremidade flagelar ao revestimento epitelial, enquanto outros permanecem livres. Mas, depois de algum tempo, sofrem nova metamorfose, pela qual

retomam a forma tripomastigota. Os esferomastigotas parecem guardar a capacidade de evoluir diretamente para tripomastigotas metacíclicos, ao chegarem à ampola retal (REY, 2001).



Figura 13 - Triatomíneo realizando o hematofagismo.
Fonte: BRASIL, Ministério da Saúde (2009).

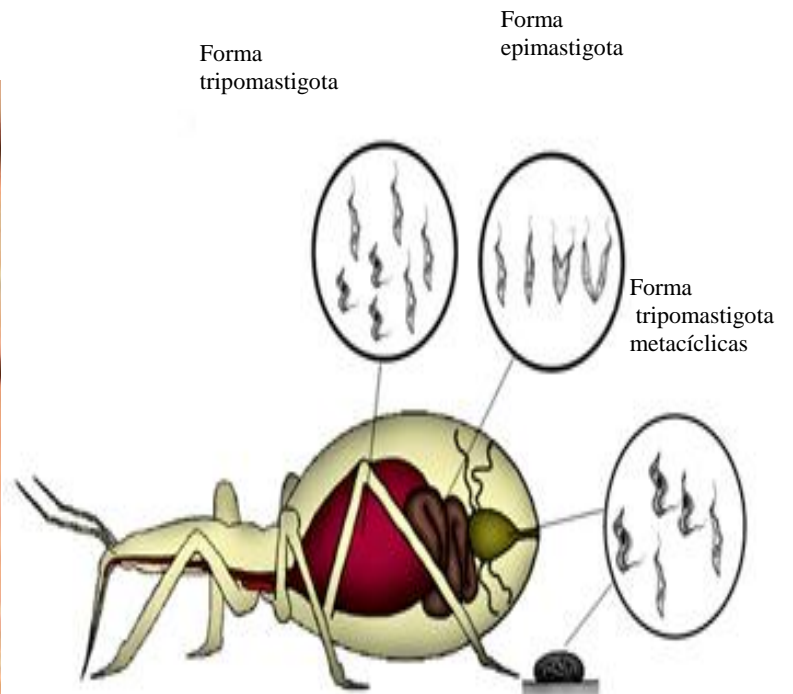


Figura 14 – Ciclo do *T. cruzi* no inseto vetor.
Fonte: AZAMBUJA, GARCIA (2007).

2.6 RELAÇÃO PARASITO-CÉLULA HOSPEDEIRA E FATORES DE VIRULÊNCIA

A membrana do tripanossomo e das células do hospedeiro fazem o primeiro contato, ao iniciar-se uma infecção. Os estudos sobre a membrana *T. cruzi* mostraram que:

a) na membrana dos tripomastigotas sanguíneos há um revestimento superficial (glicocálice) que é três vezes mais espesso que na dos epimastigotas;

b) as proteínas próprias da membrana (estudadas pela técnica de congelamento e fratura) são menos abundantes nos tripomastigotas do que nos epimastigotas;
c) a membrana dos tripomastigotas metacíclicos tem carga negativa, propriedade que é utilizada para isolá-los em cultura *in vitro*.

Alguns tripanossomos possuem sítios para ligarem-se com a concanavalina A ou outros “ligantes”. Mas só os tripomastigotas mostram mobilidade lateral desses sítios e a capacidade de formar “capuz” com os complexos antígenos-anticorpo aí inseridos. Os epimastigotas são lisados pelo soro normal de animais suscetíveis ou naturalmente resistentes, enquanto a lise dos tripomastigotas só se observa quando incubados com soro de pacientes com infecção crônica ou de animais, imunizados (REY, 2001).

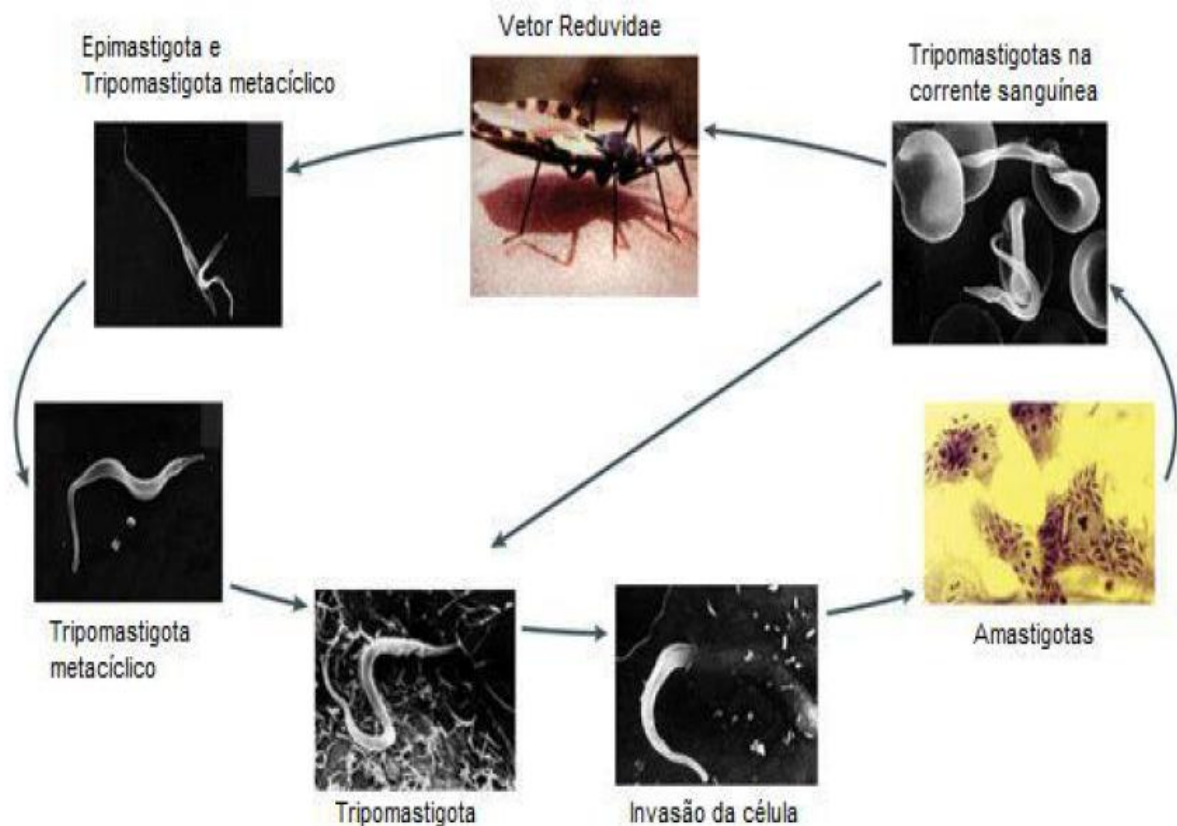


Figura 15 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no triatomíneo e no hospedeiro.

Fonte: ANDRADE E ANDREWS, (2005).

2.6.1 Invasão Celular

Todos os tipos de células cultivadas de mamíferos são passíveis de invasão por *T. cruzi*, porém apenas as formas tripomastigotas podem penetrar em células que não desenvolvam grande atividade fagocitária. A eficiência com que isso se dá depende da natureza da célula e da linhagem do tripanossomo (REY, 2001).

Independente do tipo celular a ser invadido pela forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi*, o número de parasitos interiorizado da cepa CL (linhagem do *T. cruzi* II) é sempre várias vezes maior do que a cepa G (linhagem do *T. cruzi* I) (YOSHIDA, 2006).

O estabelecimento da infecção por *T. cruzi*, depende de uma série de eventos envolvendo interações de diversas moléculas do parasito com componentes do hospedeiro. Durante a internalização de tripomastigotas, vias de transdução de sinal são ativadas tanto no parasito como na célula alvo, acarretando a mobilização de Ca^{2+} . Para adesão, o tripomastigota utiliza as glicoproteínas de superfície como a gp82 e gp35/50, que são moléculas indutoras de sinal de Ca^{2+} . O contato de glicofosfolídeos de membrana do *T. cruzi* com a célula hospedeira via receptores Toll-like induz a via de sinalização de IP_3 e IP_3 -kinases, produzindo agregação de vesículas lisossomais na membrana plasmática, favorecendo a entrada do parasito na célula. Simultaneamente, sinais pró-inflamatórios são produzidos através de $INF-\gamma$, IL-12 e secreção de $TNF-\alpha$, que conseqüentemente eleva níveis de NO intracelular essencial para atividade parasiticida do macrófago. De outro lado o parasito produz uma resposta inflamatória direcionada para evasão do sistema imune do hospedeiro, como indução de apoptose em diversas células e imunossupressão do hospedeiro (MAYA, 2006). Em isolados de *T. cruzi* cepa CL que entram na célula hospedeira de maneira dependente de gp82, a proteína quinase assim como a fosfolipase C do parasito são ativadas e Ca^{2+} é liberado de reservatórios sensíveis a IP_3 . Enquanto em isolados de *T. cruzi* cepa G que se ligam às células alvo através de gp35/50, a via de sinalização envolvendo adenilil ciclase parece ser estimulada, com liberação de Ca^{2+} de acidocalciossomos. (Figura 16) Além disso, dependendo do isolado de *T. cruzi*, sinais inibitórios mediados por gp90 específica de tripomastigota podem ser desencadeados tanto na célula hospedeira como no parasito. O repertório de moléculas de tripomastigota de cultura de tecido implicadas na invasão celular inclui glicoproteínas de superfície da família gp85, com membros contendo sítios de ligação à laminina e citoqueratina 18, enzimas como a

cruzipaína, trans-sialidase e uma oligopeptidase B que gera um agonista de Ca^{2+} a partir de uma molécula precursora (YOSHIDA, 2006).

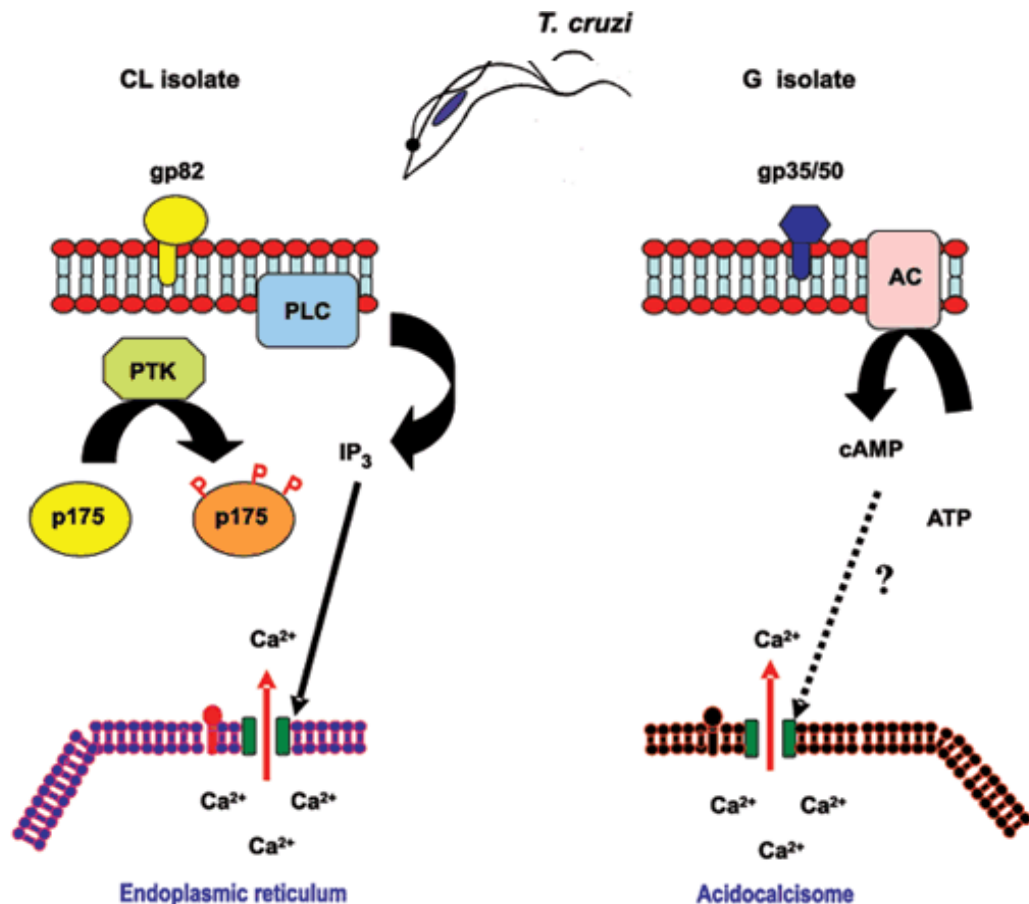


Figura 15 - .A ativação de diferentes vias de transdução. de sinal em tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* isolados, durante a invasão da célula hospedeira. Na cepa CL isolada altamente invasiva, o reconhecimento da molécula de superfície gp82 por seu receptor leva à ativação PTK, fosforilação de p175, ativação da PLC, geração de IP_3 , culminando com a liberação mediada por IP_3 de Ca^{2+} , provavelmente do retículo endoplasmático. Os componentes da cepa G isolada que sinalizaram a cascata provocada na superfície da célula por gp35/50, são praticamente desconhecidas; AMPc gerados pela guanilato ciclase podem estar envolvidos, e acidocalcisomas parece ser a fonte de cálcio necessária para a internalização do parasito.

Fonte: YOSHIDA, 2006.

2.7 PATOGENIA, SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

A infecção apresenta-se sob duas fases clínicas bem distintas. A fase aguda (sintomática e assintomática), mais frequente em crianças, apresenta como características o sinal de Romaña ou chagoma de inoculação, que aparecem de sete a dez dias após a infecção e permanecem por cerca de dois a quatro meses (PEREIRA *et al.*, 1989). A fase crônica é classificada sob três formas clínicas: indeterminada, cardíaca e digestiva. Na forma indeterminada, as alterações patológicas são pouco significativas, o que torna o diagnóstico clínico difícil nesta fase, os testes sorológicos geralmente são positivos (MACEDO, 1997). As pesquisas apontam que cerca de 60% das pessoas infectadas se encontram nesta forma. Nas outras formas (cardíaca e digestiva), os testes sorológicos confirmam os achados clínicos. Excepcionalmente, têm sido relatados casos da forma digestiva nos quais os testes sorológicos foram negativos, com exames parasitológicos positivos (DIAS & COURA, 1997; MENDES *et al.*, 1997; LUQUETTI, 1987; BRENIERE *et al.*, 1984). Nem todos os indivíduos infectados apresentam um quadro clínico. Muitos, depois de uma fase aguda, permanecem como portadores assintomáticos da infecção. (REY, 2001).

O tratamento da Doença de Chagas é uma questão ainda não completamente elucidada e tem como objetivo a erradicação da doença e a prevenção do aparecimento de lesões em órgãos ou do agravamento das lesões presentes. (COURA *et al.*, 1997).

2.8 TRATAMENTO

Em 1998, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estipulou exigências que devem ser atendidas por um fármaco ideal para o tratamento da Doença de Chagas:

- cura parasitológica de casos agudos e crônicos;
- ação eficaz com uma única dose ou poucas doses;

- acessibilidade aos pacientes, graças a um custo reduzido;
- baixos efeitos colaterais e ausência de efeitos teratogênicos;
- nenhuma necessidade de hospitalização para o tratamento;
- nenhuma indução da resistência (SOBRINHO *et al*, 2007).

Neste mesmo ano, o Ministério da Saúde passou a indicar o Nifurtimox e o Benznidazol no tratamento da Doença de Chagas para pacientes nos estágios definidos como fase aguda, exacerbações em imunocomprometidos, forma indeterminada em crianças e adolescentes, forma indeterminada em adultos e cardíacos assintomáticos e em transplantados de órgãos (FREILIJ & ALTCHER, 1998; Ministério da Saúde, 1997; Ministério da Saúde, 2005).

2.8.1 Tratamento específico

O tratamento da Doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar das pesquisas desenvolvidas por vários laboratórios e pesquisadores, em especial os sul-americanos. Vários compostos vêm sendo testados em animais e alguns deles têm sido usados no homem, porém nenhum elimina a infecção pelo *T. cruzi* e promove cura definitiva em todos pacientes tratados (LANA; TAFURI, 2005).

Outra dificuldade enfrentada pelos pesquisadores está na definição do critério de cura. Além disso, diferenças regionais de susceptibilidade do *T. cruzi* ao composto na verdade reflete a diversidade genética do parasito. Assim compostos que tem grande eficiência em chagásicos de algumas regiões da América do Sul mostram-se ineficazes em outras. Cepas isoladas de pacientes, reservatórios e vetores silvestres mostram-se naturalmente resistentes aos compostos em condições experimentais, o que explicaria a ocorrência de falha terapêutica no tratamento de pacientes. Devemos salientar, no entanto, que os compostos são mais eficientes quando utilizados em esquemas terapêuticos longos para manutenção de níveis duráveis e eliminação das formas sanguíneas até o esgotamento das formas teciduais (LANA; TAFURI, 2005).

Dois medicamentos têm sido usados: o Nifurtimox e o Benznidazol. São ativos contra formas sanguíneas do parasito e também sobre as teciduais. Devem ser administrados continuamente por um período ideal de 60 dias. A administração desses medicamentos é oral tendo como contra indicações importantes a gravidez, a insuficiência hepática e a insuficiência renal (DIAS, 1999).

O Nifurtimox (3-metil-4 [(5-nitrofurfurilidene) amino] tiomorfoline-1,1-dióxido) derivado de nitrofurano age contra as formas sanguíneas e parcialmente contra as formas teciduais (REY, 2001; LANA; TAFURI, 2005). Desde a década de 1980, o Nifurtimox teve a sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul. Isso se deu em razão da resistência apresentada pelas cepas e, sobretudo, pelo desinteresse do laboratório farmacêutico em continuar a produção de um medicamento não lucrativo (COURA & CASTRO, 2002).

O Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazole-1-cetamida), derivado de nitroimidazol, é totalmente absorvido por via digestiva. As concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2 a 4 horas, a meia vida de eliminação plasmática é de 12 horas e seus metabólitos são eliminados rapidamente pela urina e pelas fezes (SOBRINHO *et. al.*, 2007). Sua dose diária é de 5 a 7,5 mg/kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas ou três tomadas. O tratamento deve ser mantido por 30 a 60 dias consecutivos durante a fase aguda, e por 60 dias durante a fase crônica. Crianças com menos de 40 kg podem receber 7,5 mg/kg de peso corporal durante 60 dias (Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2005; Organização Panamericana de Saúde, 1999).

Entretanto, o uso destes fármacos no tratamento da fase crônica é controverso. Os efeitos colaterais indesejáveis de ambos são o seu inconveniente principal, os mais frequentemente observados no uso de Nifurtimox são: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência, complicações digestivas (náusea ou vômito, cólicas intestinais e diarreia). No tratamento com Benznidazol, as manifestações cutâneas são as mais notórias (hipersensibilidade, dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular) (CASTRO *et al.*, 2006).

2.9 MECANISMO DE AÇÃO DO NIFURTIMOX E BENZNIDAZOL

O conhecimento atual sobre a bioquímica do *Trypanosoma cruzi* levou ao desenvolvimento de novas drogas e para a compreensão do seu modo de ação. Os medicamentos tripanocida Nifurtimox e Benznidazol agem através da geração de radicais livres durante o seu metabolismo. O *Trypanosoma cruzi* é muito suscetível ao dano celular induzido por estes metabólitos porque as enzimas de sequestro de radicais livres estão ausentes ou tem atividade muito baixo no parasito (MAYA, 2006). Na Figura 17, além do mecanismo de ação dos compostos observamos a ação da glutatona e o tripanotiona.

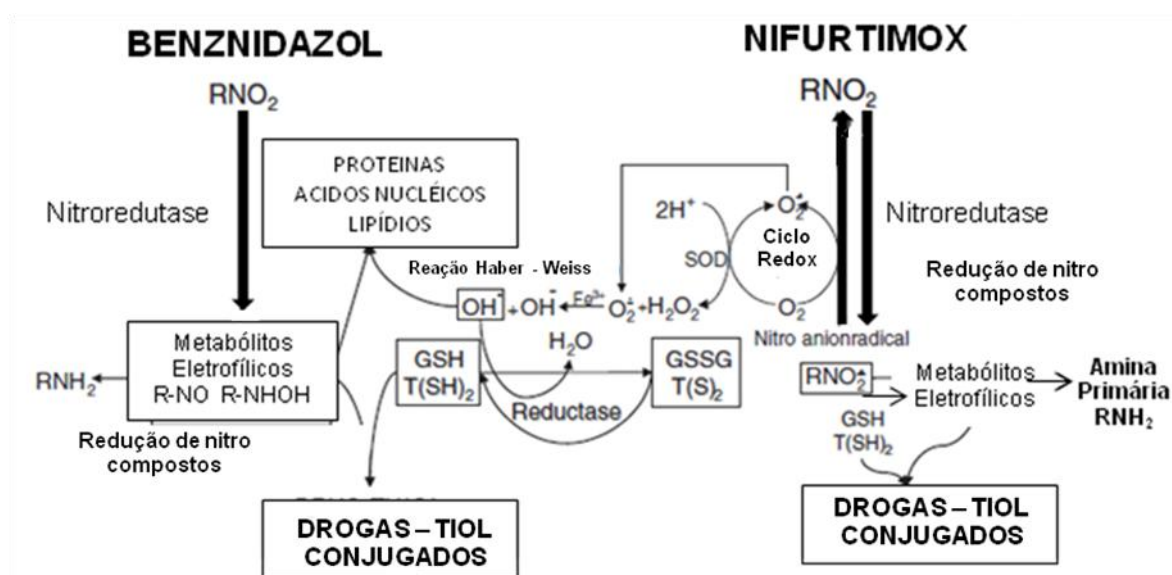


Figura 17 - Papel da glutatona e tripanotiona na ação e metabolismo dos medicamentos antichagásica Nifurtimox e Benznidazol. O grupo nitro, de ambas as drogas antichagásicas é reduzido a radicais livres ou metabólitos eletrofílicos por nitrorreductases de *T. Cruzii* no citocromo P450 relacionados. Os radicais livres derivados de Nifurtimox pode sofrer ciclo redox com o oxigênio e é produzido pela ação H_2O_2 mais o superóxido dismutase (SOD). O oxigênio produzido, os radicais livres e metabólitos eletrofílicos ligam-se a macromoléculas intracelulares danificando-as. No parasito, tripanotiona (T (SH) 2) e glutatona (GSH) neutralizam o Nifurtimox e Benznidazol, metabólitos derivados de conjugação produzem espécies reativas de tióis que serão conjugados a droga e metabolizados nas células do hospedeiro. Os radicais livres são neutralizados por oxidação de GSH reduzida ou T (SH) 2. Tripanotiona reductase reduz tripanotiona oxidado (T (S) 2).

Fonte: MAYA, (2006).

Tripanotiona (T(SH)₂) é um tiol de baixo peso molecular sintetizado pela conjugação de duas moléculas de glutatona reduzida e espermidina, em uma reação característica de tripanosomatídeos. A reação é dependente de ATP e catalisada pela tripanotiona sintetase. A Tripanotiona requer dois elétrons a fim de ser reduzido em pH fisiológico porque possui carga positiva e seu potencial redox é um pouco mais eletronegativo do que o de GSH (glutatona), o que lhe dá poder redutor importante. T(SH)₂ é uma molécula em trypanosomatídeos que reduz GSSG (glutatona oxidado) a GSH (glutatona reduzido), e também tem papel equivalente ao de GSH nos mamíferos, ou seja, ele age como um protetor contra agentes oxidantes intracelulares endógenos e exógenos. Outras funções da T(SH)₂ incluem a homeostase do ácido ascórbico, a redução de hidroperóxidos, síntese de desoxirribonucleotídeos e conjugação com metais e drogas (MAYA, 2006).

2.9.1 Nifurtimox

O mecanismo de ação do Nifurtimox (Figura 18) envolve a produção de radicais livres por meio da redução do grupamento nitro, o que leva a uma intoxicação do parasito (URBINA, 1999). Como consequência, os tecidos do hospedeiro também podem ser lesados e ocorrer reações de hipersensibilidade, anorexia, vômitos, polineurite e depressão da produção de células da medula óssea (URBINA, 2003). O principal mecanismo de ação do Nifurtimox contra o *T. cruzi* é a produção do radical livre hidroxila (OH•) (URBINA, 2003).

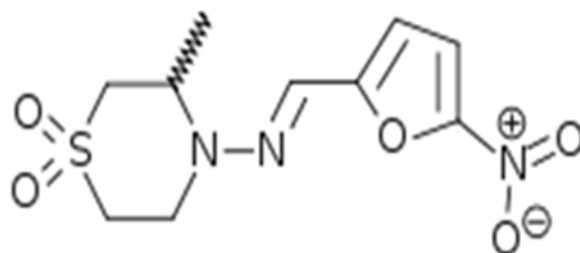


Figura 18 - Estrutura química do Nifurtimox.
Fonte: OLIVEIRA (2008).

2.9.2 Benznidazol

Benznidazol (Figura 19) atua por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos. O grupo nitro de ambas as drogas é reduzido pela ação da nitroredutase, induzindo a formação de vários radicais livres intermediários e de metabólitos nucleofílicos. Este processo começa com a reação catalisada pelo NADPH-citocromo P-450 redutase, que atua sobre o grupo nitro da molécula R-NO₂, levando à produção de um radical ânion nitro intermediário (R-NO₂⁻). Para os nitrofuranos, o radical tem elevado potencial redox e sofre uma reação do tipo ciclo redox com o oxigênio molecular, o qual reduz e regenera parcialmente a droga (DIAZ *et al.*, 1988). Paralelamente, o oxigênio é reduzido a ânion superóxido (O₂⁻) pela transferência de um elétron para o oxigênio no nível do complexo da NADPH desidrogenase. A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ocorre por dismutação do ânion superóxido. O ânion superóxido e o H₂O₂, na presença do íon férrico Fe³⁺, formam o radical livre hidroxila (reação Haber–Weiss). Os radicais livres produzidos, principalmente o OH•, ligam-se a lipídios, proteínas e DNA, lesionando as células (URBINA, 1999; MAYA *et al.*, 2006).

A ação antiparasitária do Benznidazol tem potencial redox negativo e não envolve danos oxidativos. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente elucidado, pode agir por meio do mecanismo de ação *stress* redutivo, envolvendo a modificação covalente das macromoléculas por intermediários nitroreduzidos, ou por outras interações de nitroredução com os componentes do parasito (URBINA, 2003; DOCAMPO & MORENO, 1984).

Tem sido demonstrado que o Benznidazol incrementa a fagocitose, aumenta a letalidade do *Trypanosoma cruzi* por meio da indução de produção da citocina interferon γ (gama) e da inibição da NADH-fumarato redutase do *T. cruzi* (DOCAMPO & MORENO, 1984). A droga distribui-se no meio extra e intracelular, agindo tanto sobre as formas tripomastigotas como sobre as formas amastigotas (POLAK & RICHLE, 1978; SILVEIRA *et al.*, 2000).

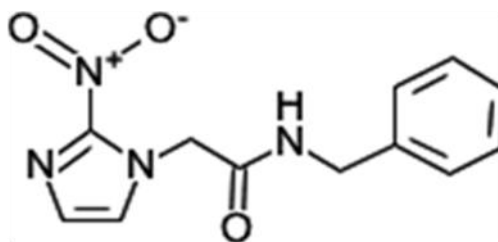


Figura 19. - Estrutura química do Benzimidazol
Fonte: OLIVEIRA, 2008.

3 SUBSTÂNCIAS NATURAIS BIOATIVAS

3.1 CUMARINA

As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários do ácido cinâmico e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo também ser encontradas em fungos e bactérias (MIRANDA, 2001). Podem ser classificadas em cumarinas simples (Figura 20), furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas com substituintes no anel pirona e cumarinas miscelâneas (SOUZA, 2005).

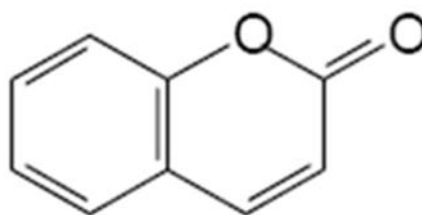


Figura 20 – Estrutura química da cumarina.
Fonte: SOUZA, (2005).

Devido suas características odoríferas, as cumarinas foram utilizadas durante muito tempo para aromatizar manteiga, tabaco, numerosos medicamentos e perfumes.

Além disso, as cumarinas fazem parte da dieta do ser humano, sendo encontradas na cenoura, aipo, salsa, chicória, mirtilo, toranja, chá verde e canela (SOUZA, 2005).

A elas são atribuída um amplo espectro de atividades biológicas como a ação antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral, antioxidante, antiulcerogênica dentre outras, as quais podem estar relacionadas com a inibição de enzimas e com a sua capacidade de suprimir espécies ativas de oxigênio ou em alguns casos, gerá-las (MIRANDA, 2001, BEGHETTI, 1999, DORNAS, 2008). Outra atividade das cumarinas que se encontra entre estudos bastante promissores é a atividade antiprotozoária, demonstrada pela cumarina isolada da planta *Kielmeyera albobunctata* onde se observou que esta apresenta atividade *in vitro* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, matando 80% dos parasitos após 24hs de contato dessa substância com sangue infectado (SOUZA, 2005).

3.2 METAIS

Há um interesse significativo na concepção de compostos metálicos para atuarem como drogas. Investigações nesta área se concentram principalmente nas possíveis interações dos íons metálicos com biomoléculas diversificadas, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos. Uma variedade de complexos metálicos já estão em uso clínicos e incentivam novos estudos para outros metalofármacos, tais como antibióticos mediados por metais, fármacos antimicrobianos, antivirais, antiparasitários e anticancerígenos (CERCHIARO; FERREIRA, 2006).

Os íons metálicos apresentam-se deficientes em elétrons, enquanto que biomoléculas tais como proteínas e DNA são ricas em elétrons. A atração entre oposições de cargas conduz a uma tendência de que íons metálicos interagem com moléculas biológicas. Os íons são captados e absorvidos por células animais e vegetais, onde vão atuar como cofatores enzimáticos e também catalisar reações citotóxicas (BENITE; *et al*, 2007).

O uso de metais como agentes terapêuticos colaborou com o aumento do interesse na compreensão da função dos metais em processos biológicos; o que é de suma importância, uma vez que a atividade farmacológica de um complexo metálico depende do metal, da biomolécula ou de ambos (BENITE; *et al*, 2007).

4 JUSTIFICATIVA

Recentes estudos da bioquímica do *Trypanosoma cruzi* tem levado a pesquisas de novas drogas e compreensão dos seus mecanismos de ação, tentando abolir o efeito tóxico sistêmico causado pelas drogas usuais de tratamento utilizadas, Nifurtimox um derivado do nitrofurano (Bayer, sob o nome de Lampit, recentemente descontinuado) e Benznidazol um derivado do nitroimidazol (LAFEPE) agem por geração de radicais livres em seus metabolismos. Embora o parasito seja suscetível a estes radicais, ambas as drogas são efetivas apenas na fase aguda e recente da infecção, pois causam muitos efeitos colaterais nos pacientes em tratamento, principalmente devido a alta concentração (500 µM) utilizada (MAYA *et al*,2006) e necessidade de tratamento por tempo prolongado e com supervisão médica.

O desenvolvimento de novas drogas deve visar alvos específicos da estrutura e do metabolismo do parasito os quais devem ser estudados inicialmente *in vitro*. Deve-se correlacionar o alvo a ser atingido com a atividade antiparasitária da droga e/ou seus derivados, considerando menor dano a célula hospedeira (COURA *et al.*, 2002).

Na tentativa de identificar esses alvos, pretendemos também avaliar a ação de substâncias bioativas, e analisar a modulação da expressão do gene das diferentes cepas dos parasitos com o objetivo de identificar alvos específicos.

Neste trabalho estudamos a ação da cumarina, moléculas derivadas de cumarinas e moléculas complexadas com metais (cobre, ferro, zinco e níquel), em comparação com a ação do Benznidazol sobre as cepas G e CL do parasito, no sentido de buscar novos fármacos com ação antiparasitária mais efetivos e menos tóxicos e que sejam eficiente contra as formas infectantes intra celulares, responsáveis pela manutenção da doença na forma crônica.

5 OBJETIVO

Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica, anti *trypanosoma cruzi* e efeito sinérgico de compostos cumarínicos e suas associações, buscando compostos menos tóxicos e mais efetivos que o Benznidazol.

5.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Utilização de modelo celular *in vitro* para determinação da IC₅₀ de uma série de compostos cumarínicos.

Determinação de IC₅₀ dos compostos contra forma epimastigota das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi*.

Avaliação da atividade anti-amastigota dos compostos nas cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi*.

Estudo do sinergismo de ação dos compostos cumarínicos em células e formas amastigotas das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi*.

Estudo da modulação da expressão de proteínas pelos compostos nas formas epimastigotas das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi*.

Determinação da atividade antioxidante dos compostos cumarínicos estudados.

6 MATERIAL E MÉTODO

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste trabalho foi utilizado somente um tipo celular, sendo fibroblastos provenientes de uma linhagem derivada do rim do macaco verde Africano, (*Cercopithecus aethiops*) denominadas de células VERO (*African green monkey kidney cells fibroblasts*) e dois tipos de cepas do *T. cruzi*, a G representante do grupo I integrante do ciclo silvestre isolada de *Didelphis marsupialis* na região amazônica, Brasil (YOSHIDA, 1983) e a CL representante do grupo II integrante do ciclo doméstico isolada de *Triatoma infestans* no Rio Grande do Sul, Brasil (BRENER e CHIARI,1963), cedidas pelo Dr. José Franco da Silveira do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo).

6.1.1 Cultura de células VERO

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 270 mL com superfície de crescimento de 75 cm² com 1x10⁶ células por mL em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10mM HEPES (*N*[2-*Hydroxyethyl*]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]), 24mM de bicarbonato de sódio, 1mg/L de estreptomicina, 1000 UI/L de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) com pH 7,4, mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até semiconfluência (Figura 21) (aproximadamente 24 a 36h).

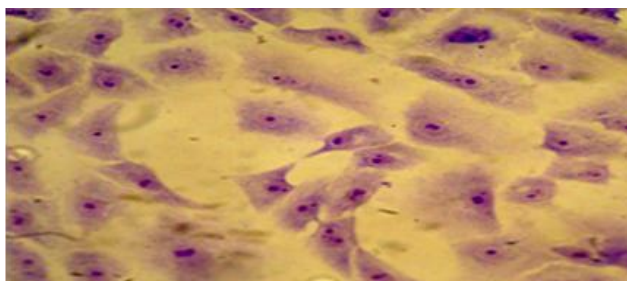


Figura 21 – Cultura de células VERO. Imagem de microscopia em lâmina, com aumento de 40x.

Fonte: Acervo pessoal.

Cultura de *T. cruzi* formas tripomastigotas metacíclicas

As formas tripomastígotas metacíclicas (infectivas) foram obtidas em culturas das formas epimastígotas no meio *LIT- Liver Infusion Tryptase* (0,5% de infusão de fígado, 0,5% de triptose, 0,4% de NaCl, 0,04% de KCl, 0,8% de fosfato de sódio, 0,2% de glicose, 0,001% de hemina e 10% de soro fetal bovino) incubadas por 11 a 15 dias, em tubo cônico estéril de 50ml permitindo a diferenciação do parasito. Essas formas também foram utilizadas para infectar as culturas de células VERO.

6.1.3 Cultura de células VERO infectadas com *T. cruzi*

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 270 mL com superfície de crescimento de 75 cm² com 1x10⁶ células por mL, em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10mM HEPES (*N*[2-Hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]), 24mM de bicarbonato de sódio, 1mg/L de estreptomicina, 1000 UI/L de penicilina e 10% de soro fetal bovino (SFB) com pH 7,4, mantido em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até semiconfluência das células (aproximadamente 24 a 36h) e em seguida foram infectadas pela adição de culturas de *T. cruzi* na forma de tripomastigota metacíclica. Após a infecção, as garrafas foram incubadas novamente em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até o aparecimento dos ninhos de amastigotas intracelulares (Figura 22) (aproximadamente 5 a 7 dias).

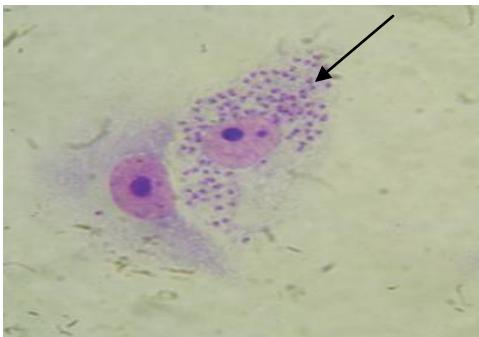


Figura 22 - Foto de células VERO infectadas. Na imagem visualizamos uma célula infectada com a forma amastigota do *T. cruzi* demonstrada pela seta e outra célula não infectada.

Fonte: Acervo pessoal.

6.2 COMPOSTOS UTILIZADOS

Nos experimentos *in vitro* foram utilizados o Benznidazol como droga de tratamento, a cumarina, a 4-hidroxi-3-nitrocumarina e mais quatro substâncias bioativas complexadas com metais (Tabela 4), para a realização da avaliação da atividade citotóxica em células VERO e antiparasitária nas cepas G e CL. A cumarina e as substâncias derivadas foram cedidas pela Dra. Regina Mara Silva Pereira do Laboratório de Química de Coordenação da pós-graduação em farmácia da Universidade Bandeirante e o fármaco Benznidazol foi adquirido no Laboratório Farmacêutico de Pernambuco LAFEPE.

6.2.1 Características dos compostos

Tabela 04 – Massa molar dos compostos utilizados.

Compostos	Massa Molar (g/mol)
Composto de tratamento	
Benznidazol	260,25
Compostos de partida	
Cumarina	146,15
4-hidroxi-3-nitrocumarina (4H3NC)	207,14
Compostos de coordenação	
4-hidroxi-3-nitrocumarina-Zn ⁺⁺ (4H3NC-Zn)	413,64
4-hidroxi-3-nitrocumarina-Cu ⁺⁺ (4H3NC-Cu)	402,80
4-hidroxi-3-nitrocumarina-Fe ⁺⁺ (4H3NC-Fe)	397,09
4-hidroxi-3-nitrocumarina-Ni ⁺⁺ (4H3NC-Ni)	409,46

Fonte: Acervo pessoal

6.2.2 Diluição dos compostos

Um comprimido de 100mg da Lafepe-Benznidazol®, utilizado nos testes de atividade antiparasitária, foi macerado em cadinho e diluído em 5 mL de solvente DMSO (dimetilsulfóxido). A concentração estoque de 5mg/ml do Benznidazol, foi posteriormente adicionado ao experimento nas culturas de células VERO infectadas com *T. cruzi* cepa G e CL feitas em placas de 24 poços em concentrações crescentes de 38,4 e 76,8µM, tratados por 24 horas. A cumarina, 4H3NC e suas substâncias derivadas complexadas com metais apresentaram-se na forma de pó e de cada uma foram pesados 5mg em balança analítica e diluídos em 1 mL do solvente DMSO. A concentração estoque de 5mg/ml das substâncias, foram posteriormente adicionadas as culturas de células VERO infectadas com *T. cruzi* cepa G e CL feitas em placas de 24 poços em diferentes concentrações e tratados por 24 horas para avaliação dos testes de atividade antiparasitária.

6.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Para a determinação da citotoxicidade celular foi utilizado o método de redução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), sendo avaliada através da capacidade das células reduzirem o MTT devido a liberação da enzima lactato desidrogenase para o meio extra mitocondrial.

6.3.1 Método de redução do MTT

O método da redução do MTT é um dos métodos mais utilizados na avaliação da citotoxicidade de diferentes compostos devido à sua rapidez, versatilidade e alta reprodutibilidade. Este teste colorimétrico baseia-se na capacidade das células viáveis converterem um sal de tetrazólio solúvel (MTT) num precipitado de formazan

insolúvel (Figura 23). Os sais de tetrazólio atravessam a membrana e entram para a célula onde aceitam elétrons a partir de substratos oxidados ou de determinadas enzimas, sendo particularmente reduzidos como resultado da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Esta reação converte os sais de MTT de cor amarela em cristais de formazan de cor violeta que se acumulam em endossomas e são posteriormente transportados para a membrana mitocondrial através de um processo de exocitose. Os referidos cristais de formazan podem ser posteriormente dissolvidos num solvente orgânico, que permita a sua quantificação por espectrofotometria (SILVA, 2004).

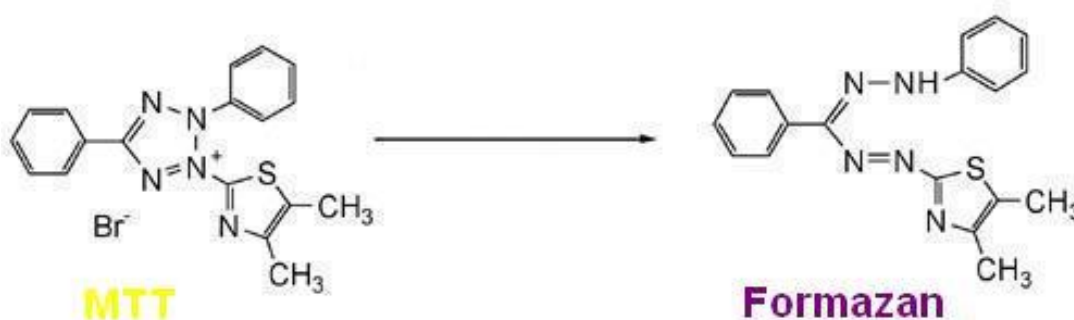


Figura 23 – Reação de redução do MTT em um precipitado de formazan.
Fonte: Adaptado de Silva (2004)

O método utilizado foi adaptado a partir do descrito por Mosmann (1983). Foram colocadas células VERO com uma densidade de 3×10^4 células por mL em placas de 24 poços, em seguida as células foram incubadas em meio na estufa durante 24 horas (“*overnight*”) a 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂. Após esse período de incubação (necessário para a adesão das células à superfície dos poços) foi retirado o sobrenadante e adicionado novo meio (RPMI) com os compostos previamente diluídos em DMSO e somente meio aos poços dos controles sem tratamento.

As placas, foram incubadas “*overnight*” e seguiu-se a troca do meio de cultura com adição de 50µL de uma solução de MTT diluído em água destilada, na concentração de 5mg de MTT por mL. A placa foi então coberta com papel de alumínio e colocada na estufa de CO₂, a 37°C durante 4 horas. Após esse período,

foi retirado o sobrenadante e adicionado a cada poço 500 μ L de DMSO para a dissolução dos cristais (Figura 24). Finalizado esse período de tempo, foram realizadas as leituras dos valores de absorbância a um comprimento de onda de 570nm.

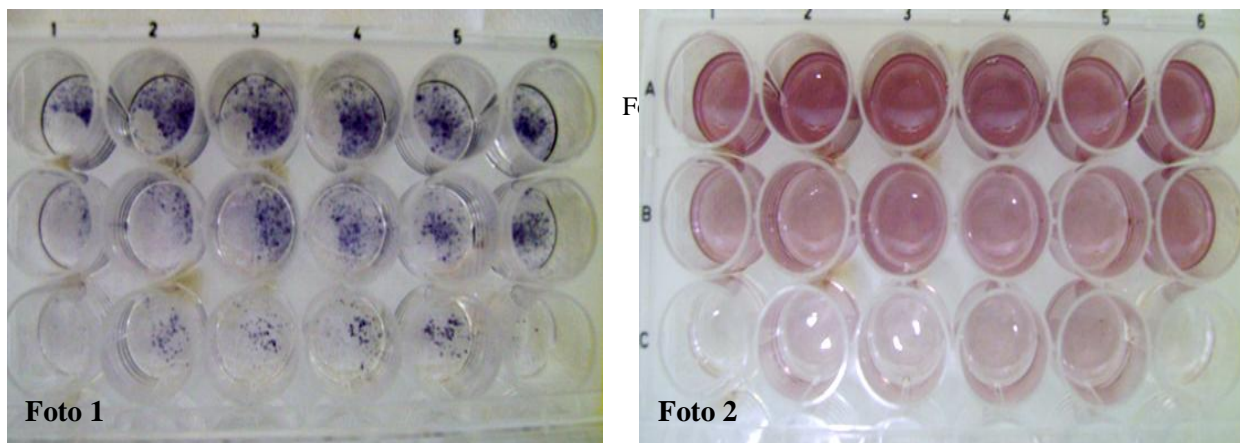


Figura 24 - Precipitado de formazan (Foto 1) e a dissolução em DMSO (Foto2). A imagem da foto 2 mostra a diferença de cores entre os poços identificando com as cores mais fortes um maior número de células vivas e vice versa.

Fonte: Acervo pessoal.

A porcentagem de viabilidade celular foi então determinada relacionando os valores das absorbâncias obtidos para cada amostra com o valor do controle contendo apenas as células sem tratamento e as tratadas somente com DMSO.

6.3.2 Padronização da técnica MTT em culturas de epimastigota de *T. cruzi*

Vários fatores podem interferir nos resultados da técnica de MTT (PLUMB *et al.*, 1989) uma delas é o modelo celular utilizado no experimento. Assim sendo, optamos em realizar uma padronização para a forma epimastigota de *T.cruzi*, para avaliar sua confiabilidade nos dados obtidos no decorrer do experimento com parasitos.

Os parasitos da cepa CL de *T. cruzi*, foram diluídos na concentração de 3×10^4 parasitos por mL em 2mL de meio DMEM suplementado com 10mM de HEPES, 24mM de bicarbonato de sódio, 1mg/L de estreptomicina, 1000 UI/L de penicilina, 10 % de SFB, em tubo cônico estéril de 15mL. Adicionamos em cada tubo 20 μ L de MTT na concentração de 0,5mg/mL e os tubos foram incubados a 28°C. Em diferentes tempos interrompemos a produção de formazan em triplicatas centrifugando os tubos por oito minutos a 3500rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao pellet adicionamos 500 μ L de DMSO e realizamos a leitura de absorbância a 570nm. Este procedimento foi realizado nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 24 horas.

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITARIA

6.4.1 Forma epimastigota de *T. cruzi* das cepa G e CL

Foi adicionado uma suspensão de 10^6 parasitos por mL em placas de 24 poços e em seguida procedeu-se o tratamento com os compostos nas diferentes concentrações e em triplicata. Os parasitos permaneceram na estufa durante 24 horas (“*overnight*”) a 28° C. Após esse período de incubação (com os compostos), foi realizado a diluição de 1:100 em *PBS* (*phosphate-buffered saline*) formol (154mM de NaCl, formol a 10% e água bidestilada qsp 1L) e na seqüência foi realizada a contagem em câmara de Neubauer. Como controle utilizamos poços contendo parasitos sem tratamento.

6.4.2 Forma amastigota de *T. cruzi* das cepas G e CL

As células VERO foram diluídas na concentração de 10^4 células por mL em meio RPMI suplementado com 10mM de HEPES, 24mM de bicarbonato de sódio, 1mg/L de estreptomicina, 1000 UI/L de penicilina, 10 % de SFB, incubadas em

garrafas de cultura de células de 270 mL com superfície de crescimento de 75 cm² a 37°C por 24h com 5% de CO₂, permitindo a aderência das células até atingirem um crescimento semiconfluyente.

As células foram infectadas com 104 tripomastígotas metacíclicos de *T. cruzi* por mL e incubados por 24h permitindo a invasão das células pelos tripomastígotas. Em seguida o meio foi trocado e as células infectadas incubadas por 3-4 dias para que ocorra a diferenciação e multiplicação de amastigotas intracelulares. Após o aparecimento das formas amastigotas intracelulares foi adicionado 3,5mL de tripsina 0,05% - EDTA 0,02%, para descolamento das células da garrafa e o sobrenadante contendo as células foi recolhido em tubo cônico estéril de 50mL e centrifugado a 3500rpm por 5 minutos.

As células infectadas foram contadas em câmara de Neubauer e 105 por mL foram colocadas sobre lamínulas de 13 mm estéril em poços de placas contendo 24 poços e cultivadas por 24h a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, foi adicionada a cultura diferentes concentrações dos compostos. Após 24h de incubação, as culturas foram observadas em microscópio invertido, para avaliação visual do efeito da concentração do composto sobre células e parasitos. As lamínulas foram coradas e as lâminas de microscopia foram preparadas para análise em microscópio óptico (aumento de imersão 100x).

6.4.3 Preparação das lâminas de microscopia

O meio de cultura das placas de cultura é retirado e as lamínulas lavadas com 2mL de PBS (Phosphate-buffered saline) 1x (137mM de NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM de Na₂HPO₄, 1,47mM KH₂PO₄ com pH 7,4) por duas vezes. Posteriormente é adicionado metanol 100% nos poços por aproximadamente 2 minutos para preservar a integridade celular. Segue-se a lavagem das lamínulas com 2 mL de PBS 1x. Após esse procedimento as células aderidas foram coradas adicionando-se nos poços 500µL de giemsa (04 gotas/ml em água destilada) por aproximadamente 20 minutos, e em seguida lavadas em água destilada. As lamínulas foram distribuídas sobre

papel toalha para secagem 24h e na sequência montadas sobre lâminas de microscopia com cola entelan deixando secar por seis horas ou mais (Figura 25).



Figura 25 – Lâminas montadas com lamínulas de células VERO infectadas.
Fonte: Acervo pessoal.

6.4.4 Análise da atividade dos compostos in vitro

As lamínulas em triplicatas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 40x e a atividade do composto foi avaliada considerando: 200 células VERO contadas, dessas, considerar as células infectadas, e o número de amastigotas intracelulares, sendo determinado o índice de infecção (IF) (Tabela 5) a partir do cálculo descrito abaixo:

Tabela 05: Cálculo utilizado para resultado de índice de infecção.

$$\text{IF} = \% \text{ de células infectadas} \times \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de amastigotas intracelular}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células infectadas}}$$

Fonte: CARMO, 2010.

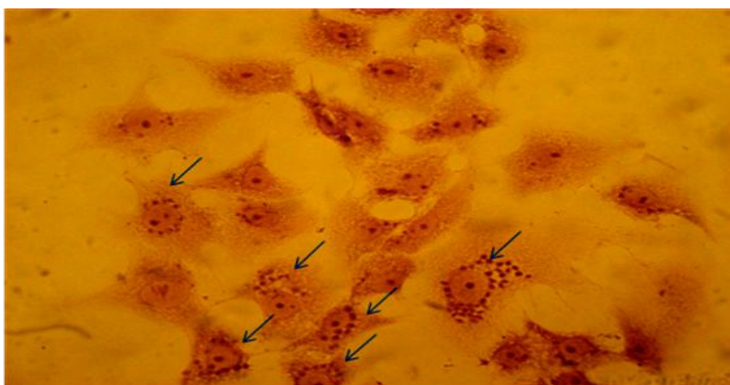


Figura 26 - Imagem de células VERO infectadas. Aumento de 40x em microscopia óptica. Fonte: Acervo pessoal.

A Figura 26 mostra células VERO infectadas e não infectadas, coradas com giemsa no aumento de 40x em microscópio ótico. As setas indicam as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

6.5 AVALIAÇÃO ANTIPARASITÁRIA ATRAVÉS DE ASSOCIAÇÕES DE COMPOSTOS

Incluimos neste trabalho uma abordagem de sinergismo de ação entre os compostos com associações denominadas A, B, C, D, E e F por necessidade de sigilo de inovação, na busca de uma associação mais eficaz e boa opção terapêutica para diferentes cepas de *T. cruzi*. A escolha das associações dos compostos foram definidas após a avaliação dos resultados obtidos no tratamento das cepas G e CL do *T. cruzi*.

Para avaliação do IC50, as associações dos compostos foram adicionados às culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL com adição concomitante das concentrações escolhidas dos diferentes compostos, realizadas em triplicatas e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Foi utilizado o método de MTT já mencionado anteriormente para avaliação das células viáveis. Para avaliação antiparasitária das associações dos compostos, foi utilizado o mesmo procedimento já descrito no item 6.4.2 Forma amastigota de *T. cruzi* das cepas G e CL.

6.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS PARASITOS

6.6.1 Extração de proteínas

Culturas de formas epimastigota das cepas G e CL de *T. cruzi* na concentração de 5×10^6 parasitos por mL, foram tratadas com compostos experimentais em diferentes concentrações e incubadas por 24 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 4000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi resuspendido com 350 μ L de PBS 1x estéril. Desta suspensão foi retirado 50 μ L de cada amostra e transferidos para microtubos para quantificação de proteínas. Nos 300 μ L restantes foi adicionado 100 μ L de tampão de amostras 4x (16mL de H₂O destilada, 4mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 3,2mL de glicerol, 6,4mL de SDS 10%, 1,6mL de β -mercaptoetanol, 0,8mL de azul de bromofenol 0,5%) para análise do perfil protéico. Todos os extratos foram congelados a -20°C.

6.6.2 Quantificação de proteínas pelo método de Biureto

A quantificação de proteínas das amostras foi analisada por espectrofotometria utilizando reagente de Biureto, através do método recomendado por Gornall e cols. (ZAIA, 1998).

6.6.3 Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE

As proteínas totais dos extratos obtidos das duas cepas de *T. cruzi* foram analisados por eletroforese em gel denaturante de SDS-PAGE. Foi preparado um gel de corrida a 7% (14,7mL de solução acrilamida / bisacrilamida 30%, 12,6mL de

Tris-HCl 1,875M pH 8,8, 6,6mL de SDS 1%, 27,9mL H₂O, 100μL de persulfato de amônio 10% e 60μL de TEMED), e um gel stacking a 4% (3,24mL de solução acrilamida / bisacrilamida 30%, 4,8mL de Tris-HCl 0,625M pH 6,8, 2,4mL de SDS 1%, 12,6mL de H₂O, 100μL de persulfato de amônio e 24μL de TEMED). As amostras foram fervidas durante 5 minutos e imediatamente resfriadas em gelo até o momento da aplicação no gel. O marcador de peso molecular utilizado foi o Low Molecular Weight (GE®), compreendendo proteínas de 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa. Alíquotas de 5 μL das amostras foram aplicadas no gel. A cuba foi preenchida com tampão de corrida eletroforética 1x (3,03g de trisma base, 14,4g de glicina, 1g de SDS e H₂O destilada q.s.p. 1L) e iniciou-se a eletroforese na potência de 85V por 2 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução Coomassie Blue R-250 (1,5g de azul brilhante Coomassie R-250, 227mL de metanol 227mL H₂O destilada e 26mL de ácido acético glacial) por 15 minutos e posterior tratamento com solução descorante (150mL de etanol, 50mL de ácido acético glacial e 300mL de H₂O destilada) por 1 hora.

6.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para o teste de potencial antioxidante, foi usado o método enzimático indireto descrito por Ewing e Janero (1995) modificado, que consiste em formar o radical superóxido. A reação tem início com a mistura de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) com PMS (fenazina metassulfato), com isso, e a presença de oxigênio do meio da reação, são formados o ânion radical superóxido. Este superóxido formado doa elétrons para o NBT (azul de nitrotetrazólio) que se reduzirá a formazan, um composto de cor roxa, que é medido através do espectrofotômetro no comprimento de 560 nm.

6.7.1 Sequestro dos radicais superóxido

Os compostos testados competem com o NBT pelos elétrons “doados” pelos radicais superóxido. A quantificação de quanto NBT reagiu com os radicais é obtida por uma curva no qual se tem a formação do formazan pelo tempo da reação.

6.7.2 Avaliação da ação antioxidante pelo método de redução do NBT

Os compostos foram testados em uma única concentração e um tubo contendo tampão foi utilizado como blank. Os reagentes foram preparados de tal forma que as concentrações finais foram de: NADH 156 μ M, NBT 50 μ M, PMS 20 μ M e solução tampão fosfato 200mM (pH = 7,4).

Em um frasco âmbar foram adicionados 50 μ L de NBT (50 μ M), 50 μ L de NADH (156 μ M) e os compostos testados com o volume final de 2.500 μ L ajustado com tampão fosfato. Foram pipetados 5 μ L do PMS (20 μ M) e adicionados no fundo da cubeta, a qual, na sequência, foi acoplada no espectrofotômetro (Femtoscán). Após agitação dos reagentes no frasco âmbar, a solução foi rapidamente retirada e colocada na cubeta, dando início a leitura no espectrofotômetro em 560 nm. Todo o processo foi realizado com a menor luminosidade possível, pois os reagentes são fotossensíveis. E devido à alta instabilidade do superóxido foi necessário um início rápido da leitura após a mistura do PMS com os demais reagentes.

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações múltiplas de variáveis independentes, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey Kramer. O programa InStat (GraphPad Software, versão 4.0) foi usado para as análises. Valores de $P < 0,05$ serão considerados significativos.

7 RESULTADO

7.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS E SOLVENTE

O teste para avaliação da citotoxicidade dos compostos e solvente pelo método de redução do MTT foi realizado em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em triplicatas. Os resultados foram determinados pela média dos valores de absorbância que posteriormente foram convertidos em porcentagem considerando o controle sem tratamento como 100% de células vivas ou viáveis. Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm.

7.1.1 Solvente DMSO

O solvente DMSO (dimetilsulfóxido) foi adicionado nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes como mostra a Tabela 06 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Os dados mostram que o solvente DMSO nos volumes utilizados no experimento, demonstraram uma baixa citotoxicidade variando de 1 a 16% para os maiores volumes acrescentados. Isto nos permite utilizá-lo como solvente e validarmos os resultados obtidos de atividade citotóxica.

Tabela 06 – Porcentagem de células VERO viáveis na presença de DMSO.

Volume utilizado μL	% de DMSO na cultura	% de Células Viáveis
10	1%	100
20	2%	100
50	5%	99
75	7,5%	93
100	10%	94
150	15%	84

Fonte: Acervo pessoal.

7.1.2 Benznidazol

O fármaco Benznidazol na forma de comprimido de 100mg foi diluído em DMSO na concentração estoque de 5mg/mL, ministrado posteriormente nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes conforme Tabela 07 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

Tabela 07 – Porcentagem de células viáveis devido à ação do fármaco Benznidazol utilizado em diferentes concentrações em μ M.

Concentrações utilizadas μM	% de Células viáveis
192,12	98
288,18	72
384,25	69
576,37	43

Fonte: Acervo pessoal.

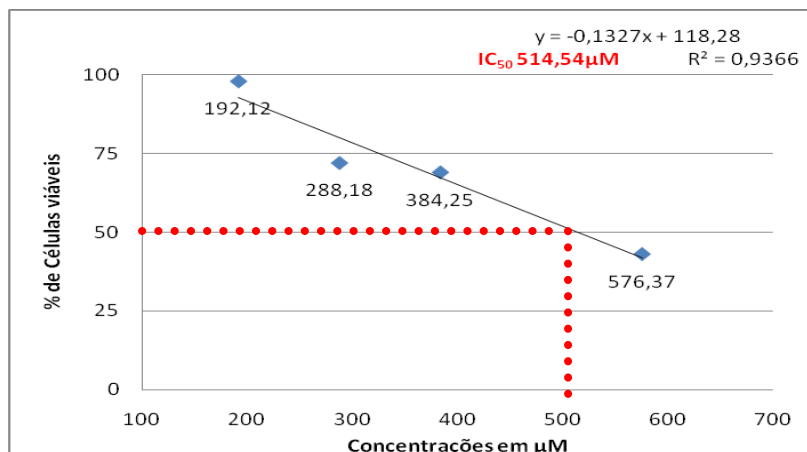


Figura 27 - Curva de citotoxicidade do fármaco Benznidazol. Viabilidade celular frente às concentrações de Benznidazol de 192,12 a 576,37µM.

Fonte: Acervo Pessoal.

Os dados (Figura 27) demonstram que o IC₅₀ obtido para culturas de células VERO tratadas com o fármaco Benznidazol por 24 horas é igual a 514,54 µM.

7.1.3 Cumarina

A cumarina foi diluída em DMSO na concentração estoque de 5mg/mL, posteriormente adicionada às culturas feitas em placas de 24 poços com 3x10⁴ células VERO por mL em concentrações crescentes conforme Tabela 8 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

Tabela 08 – Porcentagem de células viáveis devido à ação da cumarina.

Concentrações utilizadas µM	% de Células viáveis
342,11	100
513,17	77
684,23	56
1.026,34	27

Fonte: Acervo Pessoal.

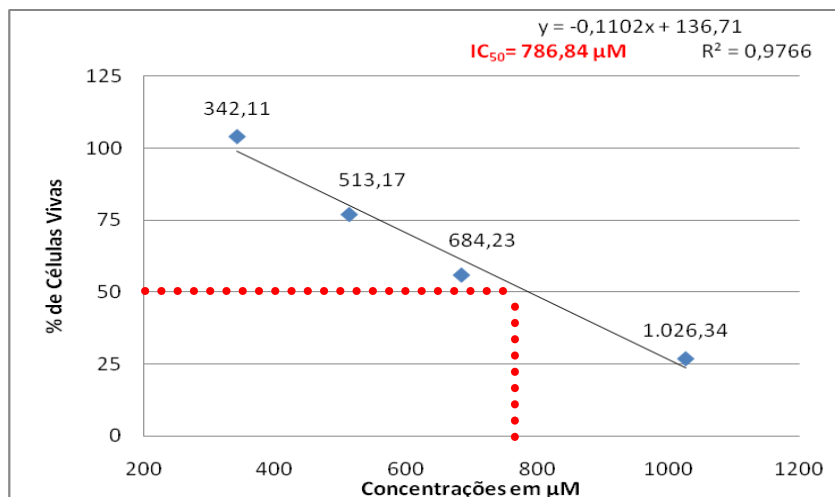


Figura 28 - Curva de citotoxicidade do composto cumarina. Viabilidade celular frente às concentrações de cumarina de 342,11 a 1.026,34µM.

Fonte: Acervo Pessoal.

Os dados (Figura 28) demonstram que o IC_{50} obtido para culturas de células VERO tratadas com o composto cumarina por 24 horas é igual a 786,84 µM.

7.1.4 Substâncias bioativas sintéticas derivadas da cumarina

Os compostos utilizados derivados da cumarina foram os seguintes: 4H3NC, 4H3NC-Cu, 4H3NC-Fe, 4H3NC-Ni, 4H3NC-Zn.

7.1.4.1 4H3NC

O composto 4H3NC foi adicionado nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes como mostra a Tabela 09 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas.

Tabela 09 – Porcentagem de células viáveis devido à ação do 4H3NC com as respectivas concentrações em μM .

Concentrações utilizadas μM	% de Células Viáveis
241,38	79
362,07	80
482,76	61
724,15	45

Fonte: Acervo pessoal.

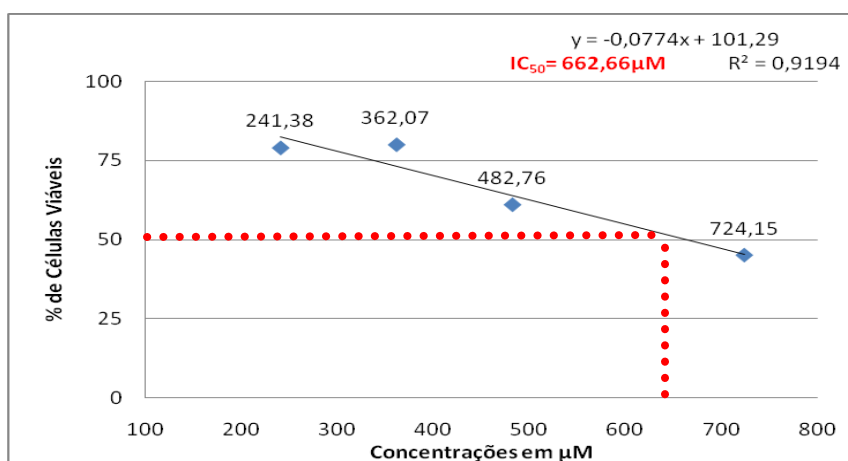


Figura 29 – Curva de citotoxicidade do 4H3NC. Viabilidade celular frente às concentrações de 4H3NC de 241,38 a 724,15 μM .

Fonte: Acervo Pessoal.

Os dados (Figura 29) demonstram que o IC_{50} obtido para culturas de células VERO tratadas com o composto 4H3NC por 24 horas é igual a 662,66 μM .

7.1.4.2 4H3NC-Cu

O composto 4H3NC-Cu foi adicionado nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes como mostra a Tabela 10 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas.

Tabela 10 – Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Cu com as respectivas concentrações em μM .

Concentrações utilizadas μM	% de Células viáveis
124,10	63
186,20	47
243,20	55
372,40	40

Fonte: Acervo pessoal.

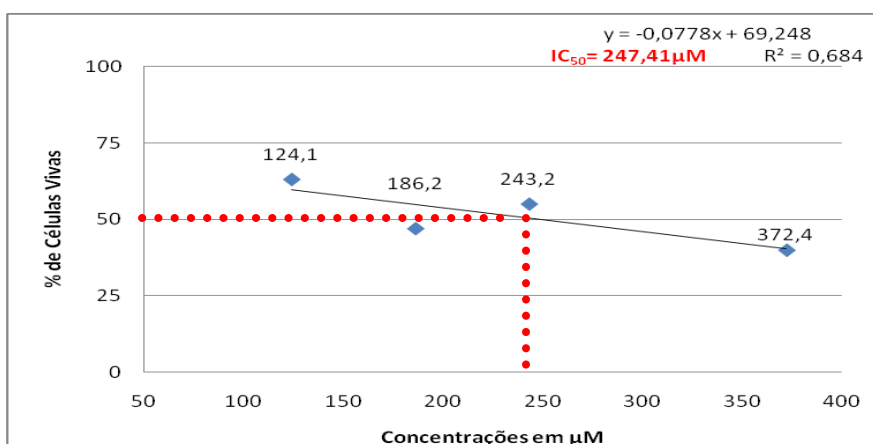


Figura 30 – Curva de citotoxicidade do 4H3NC-Cu. Viabilidade celular, frente às concentrações do 4H3NC-Cu de 124,10 a 372,40 μM .

Fonte: Acervo Pessoal.

Os dados (Figura 30) demonstram que o IC_{50} obtido para culturas de células VERO tratadas com o composto 4H3NC-Cu por 24 horas é igual a 247,41 μM .

7.1.4.3 4H3NC-Fe

O composto 4H3NC-Fe, foi adicionado nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes como mostra a Tabela 11 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas.

Tabela 11 – Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Fe com as respectivas concentrações em μM .

Concentrações utilizadas μM	% de Células viáveis
126	91
189	90
252	94
378	98

Fonte: Acervo pessoal

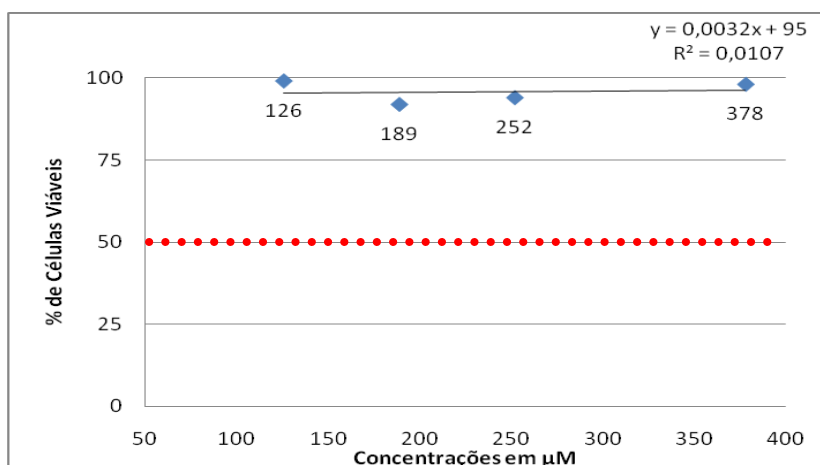


Figura 31 – Curva de citotoxicidade do 4H3NC-Fe. Viabilidade celular frente às concentrações do 4H3NC-Fe de 126 a 378 μM .

Fonte: Acervo Pessoal.

Os dados (Figura 31) demonstram que o composto não é citotóxico e, portanto o valor do IC_{50} não pode ser inferido na reta obtida.

7.1.4.4 H3NC-Ni

O composto 4H3NC-Ni, foi adicionado nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes como mostra a Tabela 12 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas.

Tabela 12 – Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Ni com as respectivas concentrações em μM .

Concentrações utilizadas μM	% de Células viáveis
122,11	65
183,17	60
244,22	57
366,33	37

Fonte: Acervo pessoal.

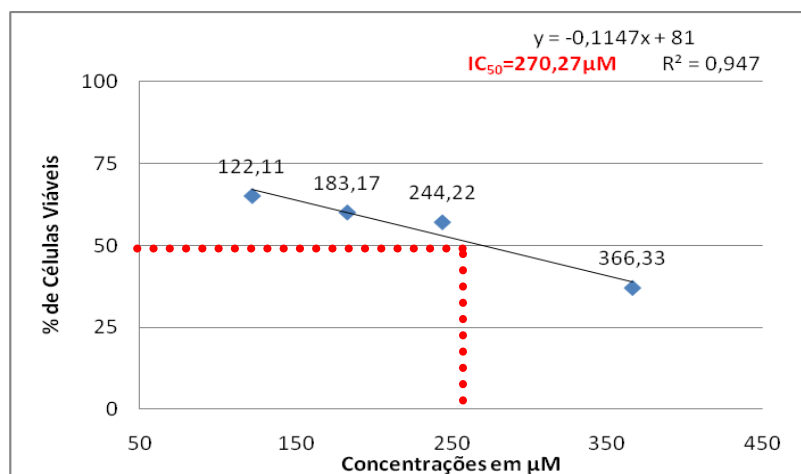


Figura 32 – Curva de citotoxicidade do 4H3NC-Ni. Viabilidade celular frente às concentrações do 4H3NC-Ni de 122,11 a 366,33 μM .

Fonte: Acervo Pessoal

Os dados (Figura 32) demonstram que o IC_{50} obtido para culturas de células VERO tratadas com o composto 4H3NC-Ni por 24 horas é igual a 270,27 μM .

7.1.4.5 4H3NC-Zn

O composto 4H3NC-Zn foi adicionado nas culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em concentrações crescentes como mostra a Tabela 13 e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

Tabela 13 – Porcentagem de células viáveis devido à ação do composto 4H3NC-Zn com as respectivas concentrações em μM .

Concentrações utilizadas μM	% de Células Viáveis
120,88	44
181,32	43
241,76	45
362,63	34

Fonte: Acervo pessoal.

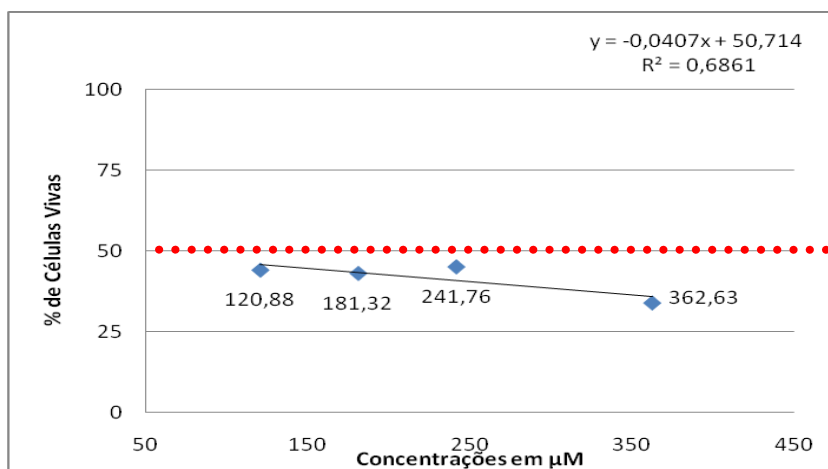


Figura 33 - Curva de citotoxicidade do 4H3NC-Zn. Viabilidade celular frente às concentrações do 4H3NC-Zn de 120,88 a 362,63 μM .

Fonte: Acervo Pessoal

Os dados (Figura 33) demonstram que o IC₅₀ obtido para culturas de células VERO tratadas com o composto 4H3NC-Zn por 24 horas é menor que as concentrações utilizadas e pode ser inferido como menor que 120µM.

7.1.5 Citotoxicidade em células VERO dos compostos testados

Na Tabela 14 estão demonstrados os valores em µM da concentração dos compostos utilizados e que correspondem ao IC₅₀ em células VERO. Observamos que o 4H3NC-Fe não é citotóxico nas concentrações utilizadas nos experimentos e que o 4H3NC-Zn se mostrou o mais citotóxico. Podemos verificar que as concentrações de IC₅₀ dos compostos 4H3NC, Benznidazol, 4H3NC-Cu, 4H3NC-Ni, mostraram-se 16%, 35%, 68% e 66% menores que a IC₅₀ da cumarina (Tabela 14) nos tratamentos das células VERO.

Tabela 14 - Valores em µM do IC₅₀ dos compostos utilizados, em ordem decrescente.

Compostos	IC₅₀ (µM)
4H3NC-Fe	Não é citotóxico
Cumarina	786,84
4H3NC	662,66
Benznidazol	514,54
4H3NC-Ni	270,27
4H3NC-Cu	247,41
4H3NC-Zn	<120

Fonte: Acervo pessoal.

7.2 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO MTT EM *T. CRUZI* – FORMA EPIMASTIGOTA

Dos dados obtidos nas culturas de epimastigota de *T. cruzi* nos diferentes tempos de redução do MTT, foram utilizados para avaliarmos o tempo necessário para ação do mesmo.

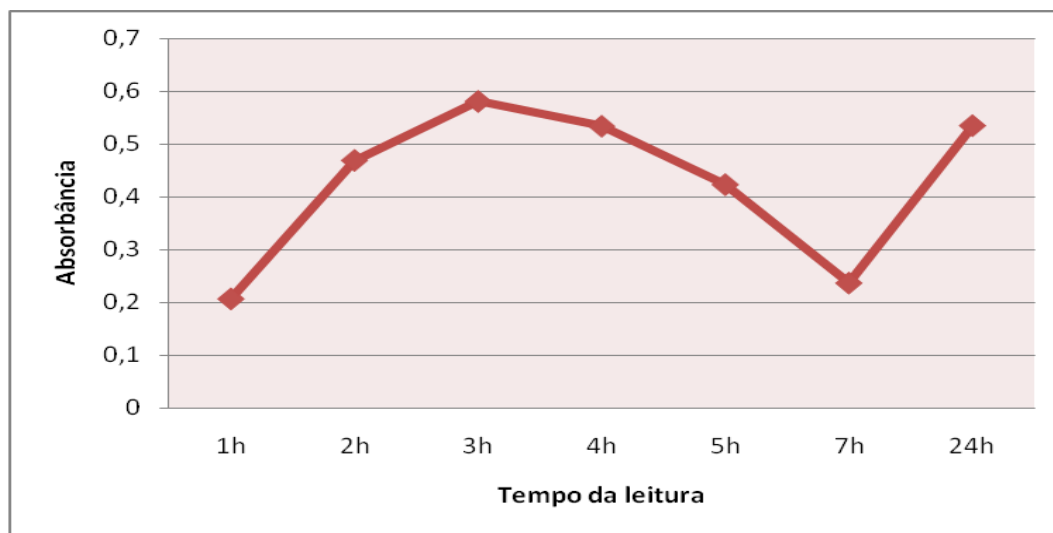


Figura 34 - Padronização do MTT – tempo de ação máxima. Leitura realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm.

Fonte: Acervo pessoal.

A Figura 34 nos mostra que a reação máxima de redução do composto e formação de formazan do MTT se deu em 3h, ocasionando uma queda em sua reação em 7h e volta ao pico inicial em 24h, devido à multiplicação dos parasitos na cultura. Vários fatores se mostraram críticos na realização dos experimentos de citotoxicidade pelo método de MTT nos parasitos, a saber, tempo de cultura, variações de pH do meio, concentração de células por mL, tempo de incubação e diferenças metabólicas nos parasitos (PLUMB *et al.*, 1989). No entanto embora a técnica seja de grande utilidade para modelos celulares, em *T.cruzi* fica difícil a interpretação dos resultados. Sendo assim, optamos em realizar a contagem de

células em câmara de Neubauer para avaliarmos a ação antiparasitária dos compostos na forma epimastigota.

7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA (*IN VITRO*) DOS COMPOSTOS

7.3.1 *Trypanosoma cruzi* cepa G forma epimastigota

O teste para avaliação da atividade anti-epimastigota de *T. cruzi* cepa G dos compostos *in vitro* foi realizado em placas de 24 poços com 10^6 parasitos por mL. Os experimentos foram feitos duas vezes em triplicatas e os resultados foram determinados através da contagem das células viáveis na câmara de Neubauer.

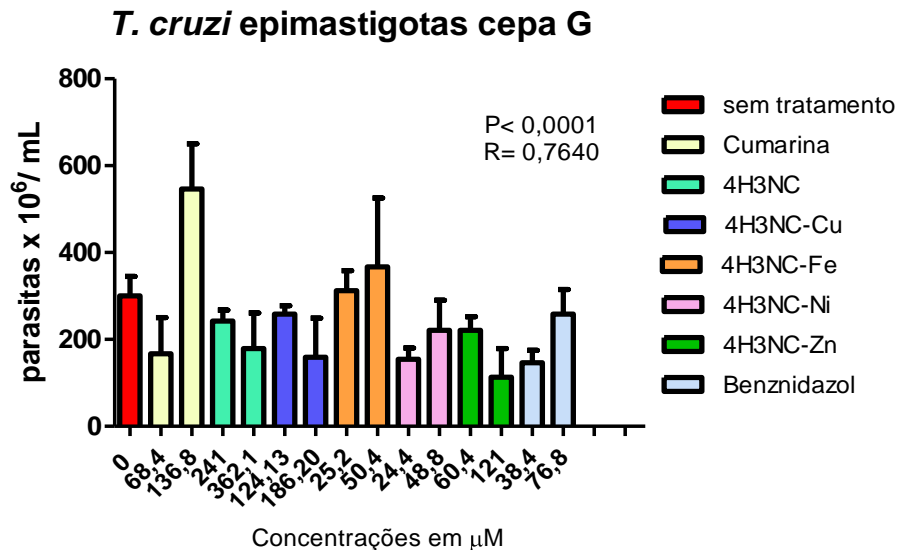


Figura 35 - Avaliação da atividade antiparasitária da cepa G na forma epimastigota. Realizado através da contagem de parasitas viáveis em câmara de Neubauer após tratamento com cumarina e compostos sintéticos derivados (4H3NC, 4H3NC-Fe, 4H3NC-Zn, 4H3NC-Cu, 4H3NC-Ni) e Benznidazol, por 24h. O controle corresponde à cultura sem tratamento.

Fonte: Acervo Pessoal.

Através dos dados obtidos na Figura 35 quanto à atividade antiparasitária dos compostos comparados ao controle (0%), os resultados em percentual da maior para a menor atividade foram os seguintes: **62%-4H3NC-Zn** 121µM, **51%-Benznidazol** 38,4µM, **48%-4H3NC-Ni** 24,4µM, **47%-4H3NC** 186,2µM, **44%-Cumarina** 68,4µM, **40%-4H3NC** 362,1µM, **26%-4H3NC-Zn** 60,4µM, **26%-4H3NC-Ni** 48,8µM, **19%-4H3NC** 241µM, **14%-4H3NC-Cu** 124,13µM, **14%-Benznidazol** 76,8µM. Os compostos que não apresentaram atividade antiparasitária foram: Cumarina 136,8µM, 4H3NC-Fe 25,2µM, 4H3NC-Fe 50,4µM.

7.3.2 *Trypanosoma cruzi* cepa CL forma epimastigota

O teste para avaliação da atividade anti-epimastigota de *T. cruzi* cepa CL dos compostos *in vitro* foi realizado em placas de 24 poços com 10^6 parasitos por mL. Foram realizadas duas vezes em triplicata e os resultados foram determinados através da contagem das células viáveis na câmara de Neubauer.

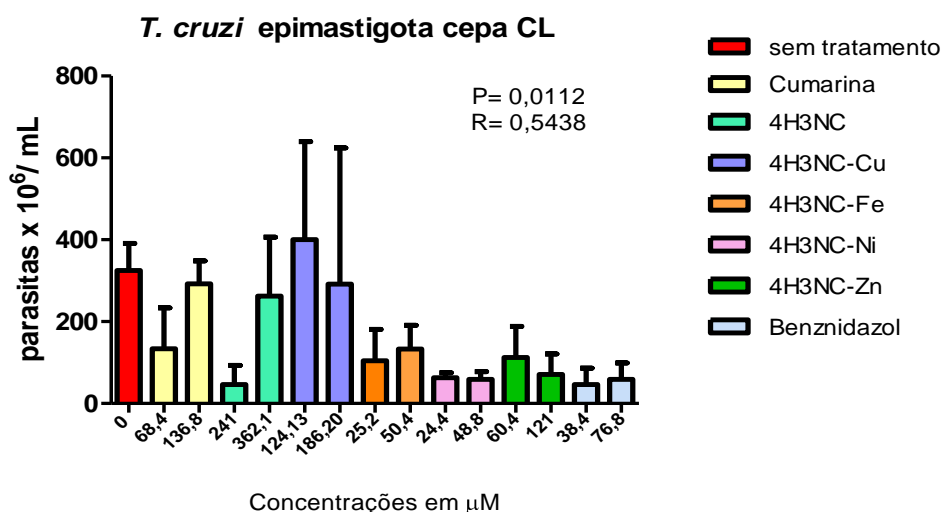


Figura 36 - Avaliação da atividade antiparasitária da cepa CL na forma epimastigota. Realizado através da contagem de parasitas viáveis em câmara de Neubauer com os compostos: cumarina e compostos sintéticos derivados (4H3NC, 4H3NC-Fe, 4H3NC-Zn, 4H3NC-Cu, 4H3NC-Ni) e da droga usual de tratamento o Benznidazol por, 24h. O controle corresponde à cultura sem tratamento.

Fonte: Acervo Pessoal.

Através dos dados obtidos na Figura 36 quanto à atividade antiparasitária dos compostos, os resultados em percentual da maior para a menor atividade foram os seguintes: **86%**-4H3NC 241µM, **86%**-Benznidazol 38,4µM, **82%**-4H3NC-Ni 48,8µM, **82%**-Benznidazol 76,8µM, **78%**-4H3NC-Zn 121µM, **68%**-4H3NC-Fe 25,2µM, **65%**-4H3NC-Zn 60,4µM, **59%**-4H3NC-Fe 50,4µM, **37%**-4H3NC-Ni 24,4µM, **19%**-4H3NC 362,1µM, **10%**-4H3NC-Cu 186,2µM, **10%**-Cumarina 136,8µM. O composto que não apresentou atividade foi o 4H3NC-Cu.

7.3.3 Comparação da atividade e citotoxicidade das concentrações dos compostos entre as cepas G e CL de *T. cruzi* na forma epimastigota e nas células VERO

Tabela 15 – Comparação da porcentagem da atividade antiparasitária entre os compostos nas cepas G e CL e atividade citotóxica em células VERO.

Compostos	µM dos compostos	% antiparasitária cepa G forma epimastigota	% antiparasitária cepa CL forma epimastigota	% de Citotoxicidade
Benznidazol	38,40	51	86	00
	76,80	14	82	00
Cumarina	68,40	22	59	00
	136,80	00	10	00
4H3NC	241,00	19	86	36
	362,10	40	19	54
4H3NC-Cu	124,13	14	00	50
	186,20	47	10	75
4H3NC-Fe	25,20	00	68	00
	50,40	00	59	00
4H3NC-Ni	24,40	49	37	00
	48,80	26	82	00
4H3NC-Zn	60,40	26	65	80
	121,00	62	78	Tóxico

Fonte: Acervo Pessoal.

A Tabela 15 nos mostra um comparativo dos resultados de atividade antiparasitária entre as cepas G e CL de *T. cruzi* demonstrado nas figuras 35 e 36 e da citotoxicidade nas células VERO, obtidos nas figuras 27 a 33. Para o resultado foi considerado o número de parasitos viáveis contados em câmara de Neubauer após o tratamento com cada composto comparado ao controle. A diferença entre eles representa a atividade antiparasitária demonstrada em percentual na Tabela 15. Os compostos apresentaram maior percentual de ação antiparasitária na cepa CL.

7.3.4 *Trypanosoma cruzi* cepa G e CL na forma amastigota

O teste para avaliação da atividade anti-amastigotas de *Trypanosoma cruzi* dos compostos *in vitro*, foi realizado com células VERO infectadas com culturas de parasitos (15 dias) contendo forma tripomastigota metacíclicas, transferidas para placas de 24 poços com 10^4 células por mL. Os experimentos foram feitos duas vezes em triplicatas e os resultados determinados através da contagem de 200 células quantificando as não infectadas e infectadas, sendo nestas últimas contado o número de amastigotas intracelulares. Os dados foram analisados através do cálculo de índice de infecção demonstrado na Tabela 05 em materiais e métodos.

7.3.5 Resultado do tratamento nas formas amastigotas da cepa G

A Tabela 16 mostra os resultados dos números de células infectadas, número de amastigotas intracelular, o percentual de células infectadas e o índice de infecção obtido na contagem das lâminas dos experimentos de infecção de células VERO, tratadas com os compostos experimentais e Benznidazol. Os dados foram comparados com os controles não tratados. Quanto menor o número do índice de infecção maior a ação antiparasitária do composto.

Tabela 16 – Índice de infecção e avaliação da ação dos compostos na forma amastigota de *T.cruzi* cepa G.

Compostos	concentrações utilizadas em μM	No. de células infectadas	No. de amastigotas intracelular	% de células infectadas	Índice de infecção
Benznidazol	38,4	15	605	8	303
	76,8	11	802	6	401
Cumarina	68,4	26	1123	13	562
	136,8	26	787	13	394
4H3NC	241	22	978	11	489
	362,1	25	1002	13	501
4H3NC-Cu	124,13	31	1289	16	645
	186,20	22	768	11	384
4H3NC-Fe	25,2	42	1181	21	591
	50,4	35	946	18	473
4H3NC-Ni	24,4	45	1319	23	660
	48,8	35	1335	18	668
4H3NC-Zn	60,4	36	1311	18	656
	121	34	1340	17	670
Controle					
Sem tratamento	00	57	1959	29	980

Fonte: Acervo pessoal.

Na Figura 37 colocamos os valores de IF da Tabela 17 em ordem decrescente mostrando a diminuição do índice de 32 a 61% dos compostos experimentais e de 69% no Benznidazol. Todos os compostos apresentaram ação antiparasitária comparados ao controle e os compostos cumarina 136,8 μM e o 4H3NC-Cu 186,2 μM também mostraram melhor atividade quando comparados ao Benznidazol 38,4 μM .

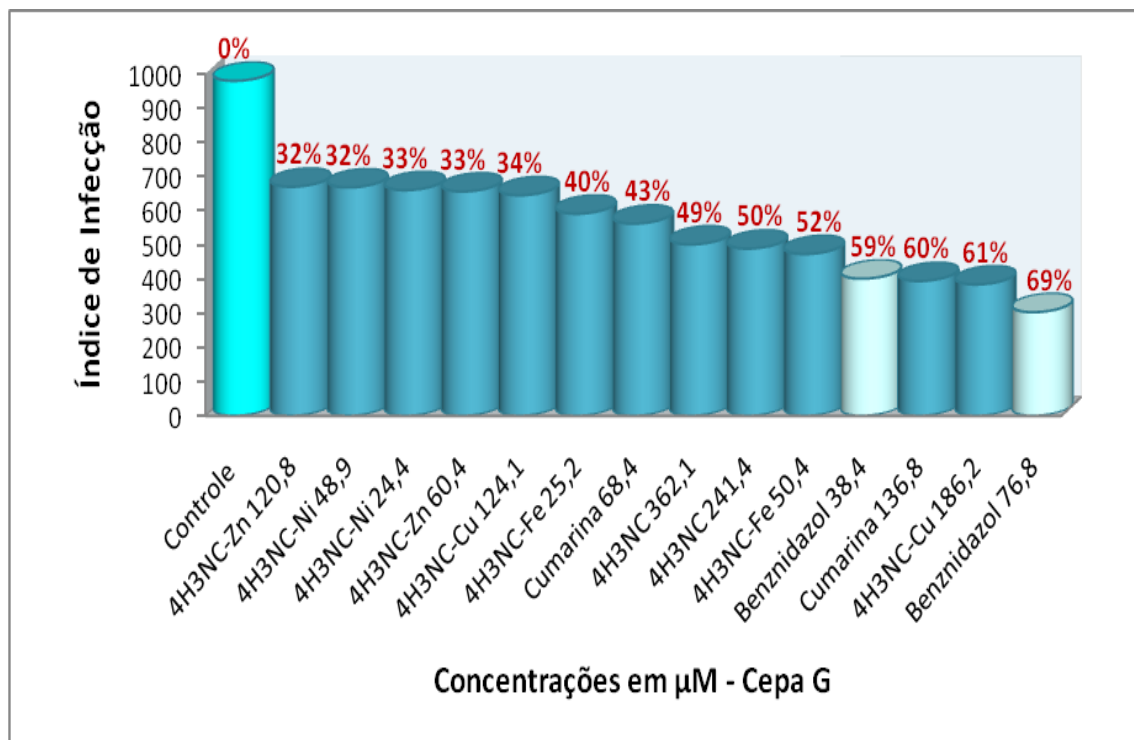


Figura 37 - Índice de infecção da cepa G da forma amastigota. Os valores de porcentagem colocados acima dos cones correspondem à diminuição dos IF em relação ao IF do controle sem tratamento. Em destaque os resultados do controle sem tratamento e do controle positivo (Benznidazol).

Fonte: Acervo Pessoal.

7.3.6 Resultado do tratamento nas formas amastigotas da cepa CL

A Tabela 17 mostra os resultados dos números de células infectadas, número de amastigotas intracelular, o percentual de células infectadas e o índice de infecção obtido na contagem das lâminas dos experimentos de infecção de células VERO, tratadas com os compostos experimentais e Benznidazol. Os dados foram comparados com os controles não tratados. Quanto menor o número do índice de infecção maior a ação antiparasitária do composto.

Tabela 17 – Índice de infecção e avaliação da ação dos compostos na forma amastigota de *T.cruzi* cepa CL.

Compostos	concentrações utilizadas em μM	No. de células infectadas	No. de amastigotas intracelular	% de células infectadas	Índice de infecção
Benznidazol	38,4	24	874	12	437
	76,8	14	860	8	491
Cumarina	68,4	24	914	12	457
	136,8	58	840	30	435
4H3NC	241	34	1776	18	940
	362,1	22	1168	12	637
4H3NC-Cu	124,13	22	928	12	506
	186,20	16	620	8	310
4H3NC-Fe	25,2	14	498	8	285
	50,4	60	682	30	341
4H3NC-Ni	24,4	12	618	6	309
	48,8	24	1698	12	849
4H3NC-Zn	60,4	30	2190	16	1168
	121	28	1532	14	766
Controle					
Sem tratamento	00	48	2570	24	1285

Fonte: Acervo Pessoal

Na Figura 38 colocamos os valores de IF da Tabela 17 em ordem decrescente, mostrando que houve uma diminuição do índice de 9,1 até 78% para os compostos utilizados. Todos os compostos apresentaram ação antiparasitária comparados ao controle, o composto cumarina 68,4 μM apresentou melhor atividade que o Benznidazol 76,8 μM e os compostos cumarina 136,8 μM , 4H3NC-Fe 50,4 μM , 4H3NC-Ni 24,4 μM , 4H3NC-Cu 186,2 μM e 4H3NC-Fe 25,2 μM também mostraram melhor atividade quando comparados ao Benznidazol 38,4 μM .

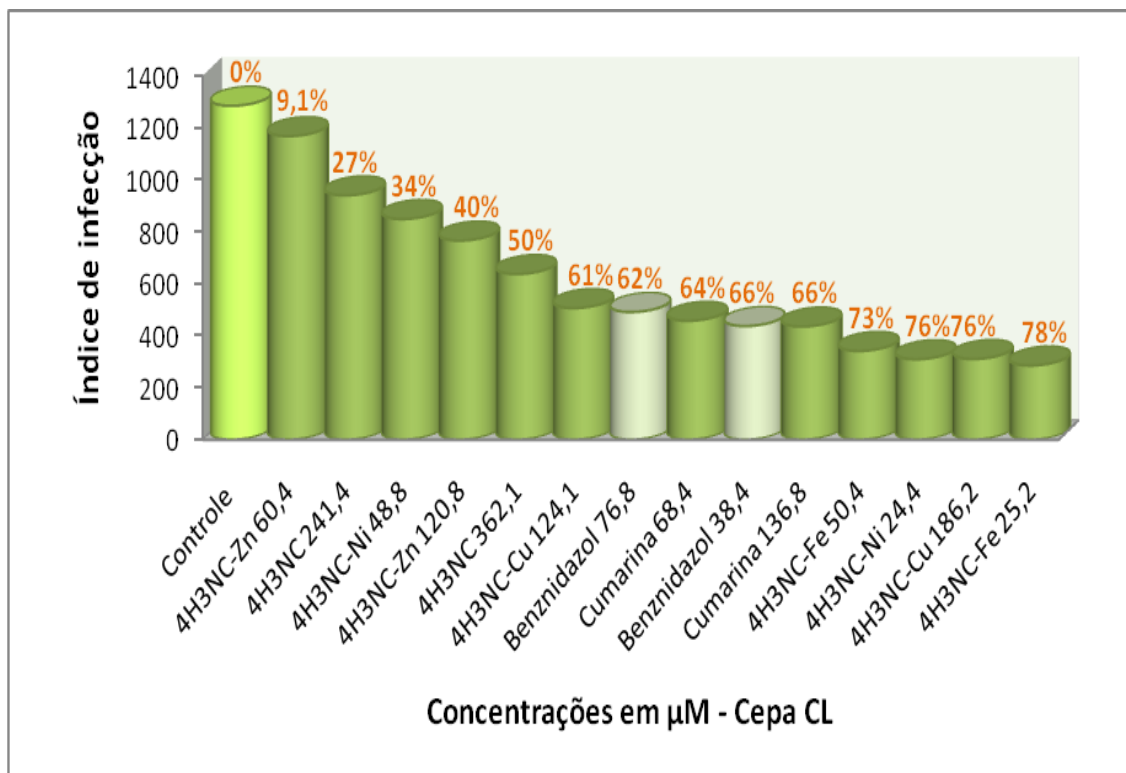


Figura 38 - Índice de infecção da cepa CL da forma amastigota. Os valores de % colocados acima dos cones correspondem à diminuição dos IF em relação ao IF do controle. Em destaque os resultados do controle sem tratamento e do controle positivo (Benznidazol).

Fonte: Acervo Pessoal

7.3.7 Comparação da atividade antiparasitária dos compostos em formas amastigotas de *T. cruzi* cepa G e CL

A Tabela 18 mostra os dados de IF obtidos comparados entre as duas cepas mostrando diferenças de sensibilidade entre as cepas dos parasitos frente aos compostos. Dos dados obtidos e das porcentagens de diminuição dos IF nas Figuras 37 e 38 observamos que o tratamento com Benznidazol, cumarina e 4H3NC-Cu, diminuiu sensivelmente o IF das duas cepas G e CL. Já o tratamento com 4H3NC-Fe e 4H3NC-Ni obtivemos maior redução de IF na cepa CL.

Tabela 18 - Comparação de índice de infecção entre as cepas G e CL da forma amastigota, quanto à ação dos compostos. Em destaque os três menores índices de infecção para cada cepa.

Compostos	Concentrações dos compostos em μM	IF Cepa G Forma amastigota	IF Cepa CL Forma amastigota
Controle	00	980	1285
Benznidazol	38,4	303	437
	76,8	401	491
Cumarina	68,4	562	457
	136,8	394	435
4H3NC	241,4	489	940
	362,1	501	637
4H3NC-Cu	124,1	645	506
	186,2	384	310
4H3NC-Fe	25,2	591	285
	50,4	473	341
4H3NC-Ni	24,4	660	309
	48,9	668	849
4H3NC-Zn	60,4	656	1168
	120,8	670	766

Fonte: Acervo Pessoal.

7.4 ASSOCIAÇÕES DE COMPOSTOS PARA TRATAMENTO DA FORMA AMASTIGOTA DE *T. CRUZI*

A partir dos dados obtidos foram definidas as concentrações dos compostos utilizados para associações e tratamento de culturas da forma amastigota das diferentes cepas de *T. cruzi*, objetivando estudar o efeito sinérgico dos mesmos.

7.4.1 Avaliação da citotoxicidade em células VERO de associações dos compostos

Os compostos associados foram adicionados concomitantemente às culturas feitas em placas de 24 poços com 3×10^4 células VERO por mL em triplicata e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida procedeu-se o experimento de MTT para avaliação de viabilidade celular.

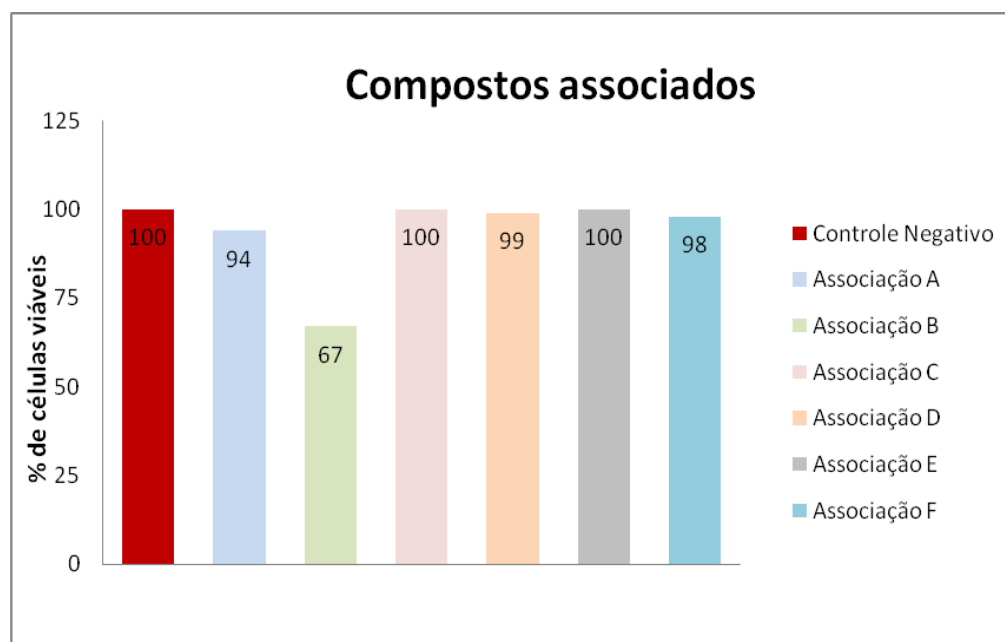


Figura 39 – Sinergismo de ação dos compostos em células VERO. Citotoxicidade dos compostos associados de A a F. A linha pontilhada representa 50% de células viáveis.

Fonte: Acervo Pessoal.

A associação B foi a que mais apresentou toxicidade conforme demonstra a Figura 39, as demais associações não apresentaram citotoxicidade relevantes.

7.4.2 Atividade anti-amastigotas de cepas G e CL das associações de compostos

O teste para avaliação da atividade anti-amastigotas de *Trypanosoma cruzi* os compostos associados *in vitro*, foi realizado com 10^5 células VERO por mL infectadas com culturas de parasitos (15 dias) contendo forma tripomastigota metacíclicas, transferidas para placas de 24 poços com lamínulas e mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Os experimentos foram feitos duas vezes em triplicatas e os resultados determinados através da contagem de 200 células quantificando as não infectadas e infectadas, sendo nestas últimas contado o número de amastigotas intracelulares. Os dados das Tabelas 19 e 20 foram analisados através do cálculo de índice de infecção demonstrado na tabela 5.

Tabela 19 – Avaliação da ação das associações de compostos e índice de infecção na forma amastigota de *T.cruzi* cepa G.

Associações de Compostos	No. de células infectadas	No. de amastigotas intracelular	% de células infectadas	Índice de infecção
Associação A	01	28	0,5	14
Associação B	04	133	2	67
Associação C	02	199	1	100
Associação D	06	281	3	141
Associação E	09	449	4,5	225
Associação F	04	267	2	134
Controle				
Sem tratamento	08	537	4	269

Fonte: Acervo Pessoal

Tabela 20 – Avaliação da ação das associações de compostos e índice de infecção na forma amastigota de *T.cruzi* cepa CL.

Associações de Compostos	No. de células infectadas	No. de amastigotas intracelular	% de células infectadas	Índice de infecção
Associação A	09	304	4,5	152
Associação B	09	278	4,5	139
Associação C	08	247	4	124
Associação D	06	137	3	69
Associação E	09	210	4,5	105
Associação F	07	270	3,5	135
Controle				
Sem tratamento	19	526	9,5	263

Fonte: Acervo Pessoal

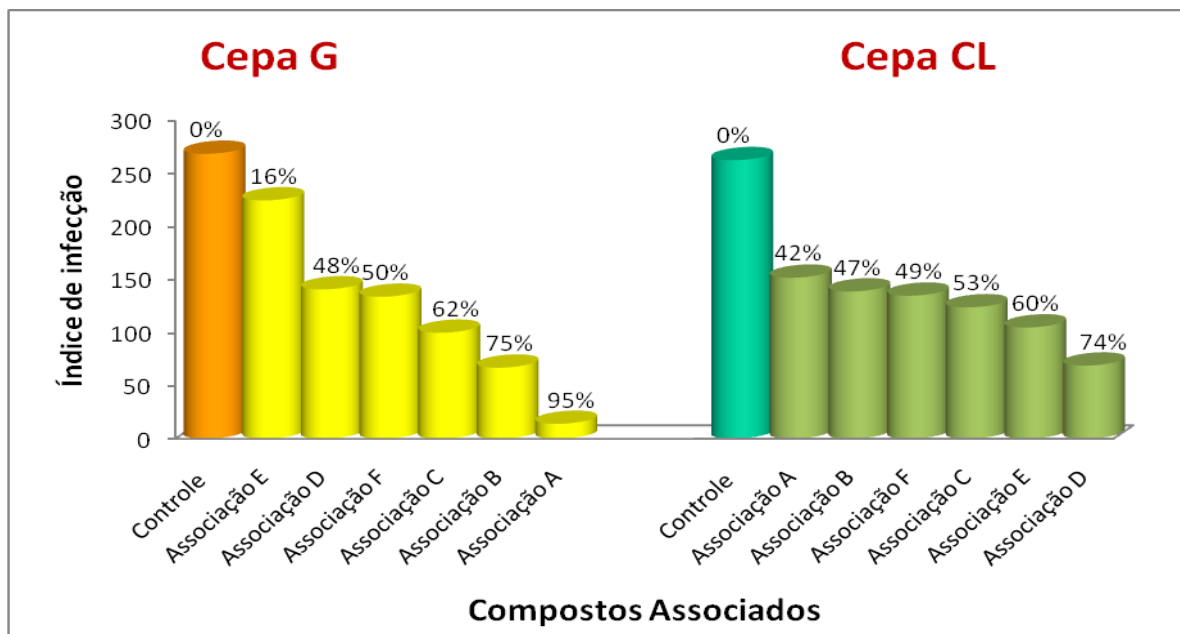


Figura 40 – Comparação dos IF obtidos das duas cepas G e CL de *T. cruzi*. Os valores de % colocados acima dos cones correspondem à diminuição dos IF em relação ao IF do controle. Em destaque o controle sem tratamento.

Fonte: Acervo Pessoal

O resultado de todas as associações de compostos (Figura 40) comparados ao controle sem tratamento, mostrou atividade antiparasitária destacando as associações A, B e C para a cepa G e as associações D, E e C para cepa CL, com diminuição do IF maior que 50%. A associação F obteve um percentual equivalente entre as duas cepas quanto à ação antiparasitária.

7.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS PARASITOS

As culturas contendo 10^5 parasitos/mL foram tratadas com as associações (A, B, C e D) em concentrações dos diferentes compostos definidas pelos resultados anteriormente obtidos, sendo os controles as culturas sem tratamento.

7.5.1 Curva padrão de BSA

Foi a princípio obtida uma curva padrão com concentrações de BSA até 10 mg/mL (Figura 41), a partir da qual obtivemos as concentrações de proteínas totais em mg/mL nos extratos parasitários das duas cepas tratadas.

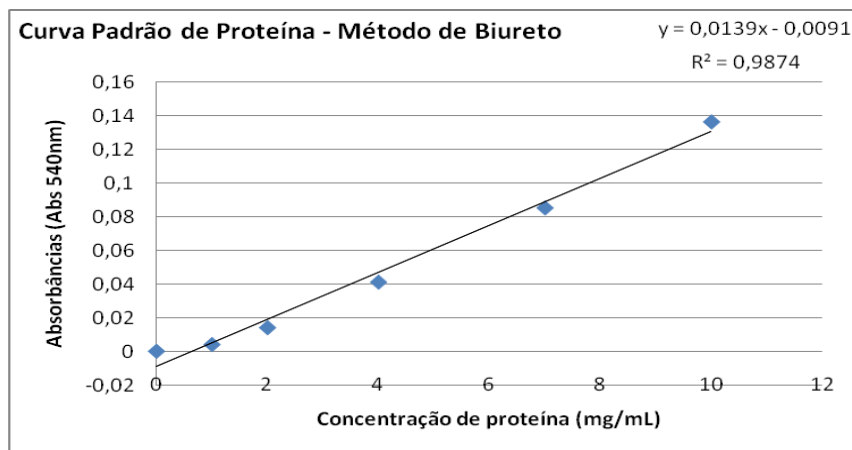


Figura 41 - Curva padrão de BSA, método de Biureto.

Fonte: Acervo Pessoal.

7.5.2 Quantidade de proteínas totais obtidas em extratos de 10^8 parasito/mL após tratamento com os compostos por 24 h.

Tabela 21- Quantidade de proteínas totais dos parasitos das cepas G e CL após tratamento.

Compostos	Concentração proteínas (mg/mL)	
	Cepa G	Cepa CL
Benznidazol	3,34	3,34
4H3NC-Fe	3,36	2,97
4H3NC-Cu	3,36	3,15
4H3NC	3,39	2,97
Cumarina	3,39	3,05
4H3NC-Ni	3,44	3,20
Associação A	2,75	3,22
Associação B	2,81	2,97
Associação C	2,52	3,38
Associação D	-	2,64
Controle	2,50	3,09

Fonte: Acervo Pessoal.

A Tabela 21 resume as concentrações de proteínas totais obtidas após os tratamentos de 24h das culturas.

7.5.3 Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE

A análise do padrão de expressão diferencial de proteínas por ação dos compostos experimentais nas duas cepas de *T.cruzi*, foi realizada em gel de poliacrilamida em condições denaturantes. Foi colocado no gel um volume correspondente a 100ug de extrato protéico dos compostos e associações A, B e C

para as duas cepas e associação D apenas para cepa CL. Seguiu-se a eletroforese para separação das bandas correspondentes as massas moleculares em kDa das proteínas.

7.5.3.1 Cepa G

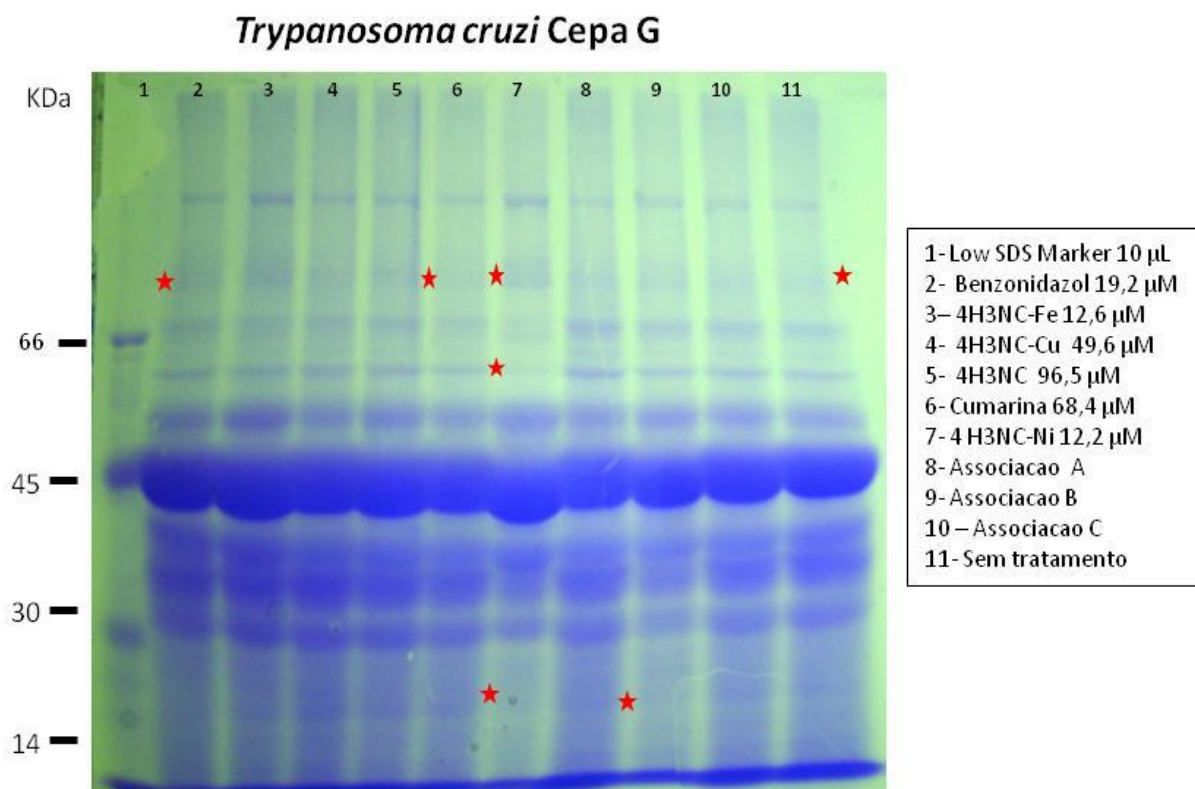


Figura 42 - Gel SDS PAGE com perfil eletroforético das proteínas totais de *T. cruzi* cepa G, tratados com os compostos experimentais. Os asteriscos estão sinalizando as bandas protéicas que estão diferentes do perfil dos parasitos sem tratamento colocados no *slot* 11.

Fonte: Acervo Pessoal.

A Figura 42 representa o perfil eletroforético do extrato protéico de 10^8 parasitos/mL *T. cruzi* cepa G mostrando 12 bandas nos parasitos sem tratamento e manutenção do mesmo perfil nos parasitos tratados com 06 dos compostos, apenas diferindo em 11 bandas no tratamento com Benznidazol (*slot* 2), com o composto Cumarina (*slot* 6) e com a associação B (*slot* 9) de compostos.

7.5.3.2 – Cepa CL

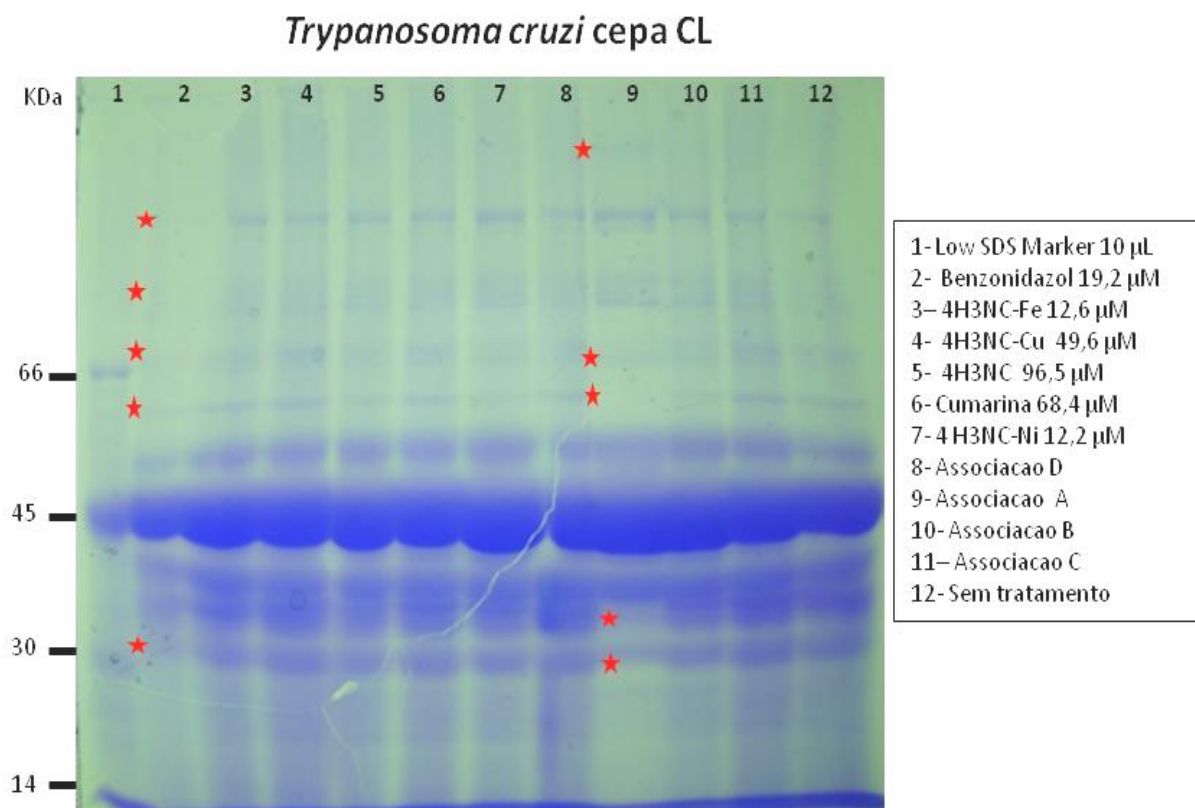


Figura 43 - Gel SDS PAGE com perfil eletroforético das proteínas totais de *T.cruzi* cepa CL, tratados com os compostos experimentais. Os asteriscos estão sinalizando as bandas protéicas que estão diferentes do perfil dos parasitos sem tratamento colocados no *slot* 12.

Fonte: Acervo Pessoal.

A Figura 43 mostra o perfil eletroforético das proteínas dos parasitos da cepa CL tratados em comparação com os não tratados (*slot* 12). Podemos verificar que o perfil de 12 bandas dos não tratados se mantém e tem uma diminuição para 06 bandas com o tratamento com o Benznidazol (*slot* 2) e 09 bandas com a Associação A (*slot* 9). Tratamento com compostos isolados e Associações B, C, D, mostra aumento para 15 bandas.

Tabela 22 – Comparação do perfil de bandas protéicas no gel, expressas nos parasitos das cepas G e CL de *T. cruzi*, após tratamento com os compostos

Compostos μM	Número de Bandas da Cepa G	Número de Bandas da Cepa CL
Benznidazol 19,2	11	6
4H3NC-Fe 12,6	12	15
4H3NC-Cu 49,7	12	15
4H3NC 96,6	12	15
Cumarina 68,4	11	15
4H3NC-Ni 12,2	12	15
Associações de Compostos		
A	12	9
B	11	15
C	12	15
D	-	15
Controle		
Sem tratamento	12	12

Fonte: Acervo Pessoal.

A Tabela 22 resume os dados com o número de bandas visíveis no gel SDS-PAGE das Figuras 42 e 43, mostrando que o perfil dos parasitos das duas cepas utilizadas é igual nos parasitos não tratados, indicando uma maior sensibilidade e mudança no perfil na cepa CL quando comparamos com a cepa G. A modulação de expressão nas duas cepas se verifica pela inibição de expressão de bandas no tratamento com Benznidazol, e na associação A na cepa CL. Na cepa CL é evidente a modulação na indução de bandas protéicas, correspondendo a proteínas novas ou com massa molecular diferente das proteínas dos parasitos sem tratamento.

7.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Técnicas que utilizam o superóxido dismutase não são simples e, além disso, apresentam custo elevado relativo à enzima padrão (OLIVEIRA, 2009). Diante disso para análise da atividade antioxidante dos compostos foi realizado através do método enzimático indireto descrito por Ewing e Janero (1995), modificado. Como demonstrado na Figura 44, o teste identificou características oxidantes na maioria dos compostos, conforme esperado para ação antiparasitária. Assim podemos obter os resultados através da leitura de absorbância quanto à atividade oxidante das concentrações molares dos compostos utilizados, que variam em ordem crescente de 0,085 (4H3NC-Cu), 0,35 (4H3NC), 0,965 (tampão+reagentes), 0,978(Associação B), 0,985 (4H3NC-Ni), 0,994 (4H3NC-Fe), 1,0 (solvente DMSO), 1,011(Associação C), 1,121 (Associação A) e 1,186 (cumarina).

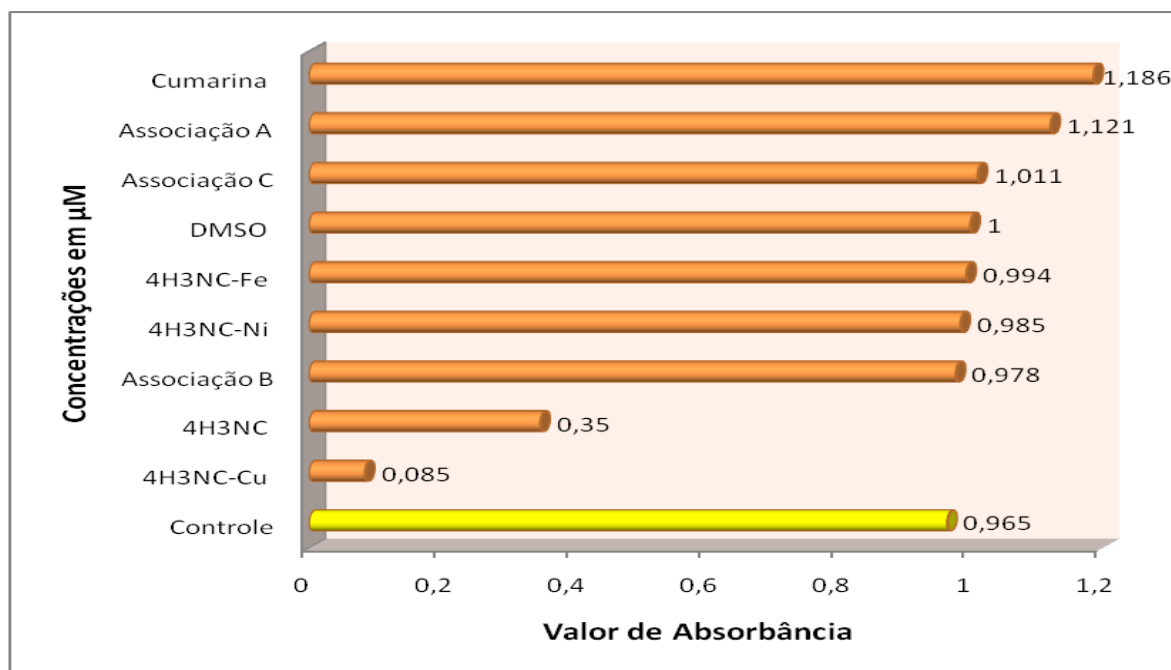


Figura 44 – Atividade antioxidante dos compostos utilizados pela medida indireta da redução de NBT.

Fonte: Acervo Pessoal.

7.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estatísticos nas Tabelas 22 e 23 foram obtidos através do teste de análise ANOVA, seguido pelo teste de Tukey Kramer.

7.7.1 Cepa G

Tabela 23 - Resultados estatísticos de índice de infecção dos compostos testados em cepa G da forma amastigota do *T.cruzi*. Os asteriscos indicam o nível de significância: Um asterisco é significativo, dois asteriscos é muito significativo e três asteriscos é extremamente significativo.

Compostos		Significância	Valor de P	\bar{X} e
Concentrações em μM				Desvio Padrão
Controle x Benznidazol	38,4	***	<0,001	605 / 65,737
Controle x Benznidazol	76,8	**	<0,01	802 / 111,30
Controle x Cumarina	136,8	**	<0,01	787 / 360,17
Controle x 4H3NC-Cu	186,2	**	<0,01	768 / 147,72
Controle x 4H3NC-Fe	50,4	**	<0,01	946 / 191,60
Controle x Cumarina	68,4	*	<0,05	1123 / 316,24
Controle x 4H3NC	241,4	*	<0,05	978 / 565,82
Controle x 4H3NC	362,1	*	<0,05	1002 / 318,06
Controle x 4H3NC-Zn	60,4	*	<0,05	1079 / 333,47
Controle		-	-	2181 / 425,11

Fonte: Acervo pessoal.

A Tabela 23 nos mostra que os compostos que se apresentaram com significância comparada ao controle e ao medicamento de tratamento Benznidazol, foram: Cumarina 136,8 μ M, 4H3NC-Cu 186,2 μ M e 4H3NC-Fe 50,4 μ M, como **muito significantes** e Cumarina 68,4 μ M, 4H3NC 241,4 μ M, 4H3NC 362,1 μ M e 4H3NC-Zn 60,4 μ M como **significantes**. A Análise de variância ANOVA apresentou o valor de P=0,0021, muito significativa. No teste de Tukey Kramer o valor de q é maior que 5,211, portanto, o valor de P é <0,05.

7.7.2 Cepa CL

Tabela 24 - Resultados estatísticos de índice de infecção dos compostos testados em cepa CL da forma amastigota do *T.cruzi*. Os asteriscos indicam o nível de significância: Um asterisco é significativo, dois asteriscos é muito significativo e três asteriscos é extremamente significativo. Utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey Kramer.

Compostos	Concentrações em μ M	Significância	Valor de P	\bar{X} / Desvio Padrão
Controle x 4H3NC-Fe	25,2	***	<0,001	249 / 160,63
Controle x Benznidazol	38,4	**	<0,01	437 / 199,62
Controle x Benznidazol	76,8	**	<0,01	430 / 337,78
Controle x Cumarina	68,4	**	<0,01	457 / 164,72
Controle x Cumarina	136,8	**	<0,01	421 / 225,59
Controle x 4H3NC-Cu	124,10	**	<0,01	464 / 147,16
Controle x 4H3NC-Cu	186,2	**	<0,01	310 / 82,343
Controle x 4H3NC-Fe	50,4	**	<0,01	341 / 59,214
Controle x 4H3NC-NI	24,4	**	<0,01	309 / 126,37
Controle x 4H3NC	362,1	*	<0,01	584 / 202,79
Controle	-	-	-	1285 / 242,91

Fonte: Acervo pessoal.

Observamos na Tabela 24, o composto 4H3NC-Fe 25,2 μ M comparado ao controle obteve resultado **extremamente significativo**. Com resultado **muito significativo** comparados ao controle estão os compostos, Cumarina 68,4 μ M, Cumarina 136,8 μ M, 4H3NC-Cu 124,10 μ M, 4H3NC-Cu 186,2 μ M, 4H3NC-Fe 50,4 μ M e 4H3NC-NI 24,4 μ M. A comparação **significante** foi: Controle x 4H3NC 362,1 μ M. A análise de variância ANOVA apresentou o valor de $P=0,0001$, extremamente significativa. No teste de Tukey Kramer o valor de q é maior que 5,211, portanto, o valor de p é $<0,05$.

8 DISCUSSÃO

Dados divulgados pelo órgão internacional, *Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi, 2009)*, relatam que apenas 1% dos 1.393 novos fármacos registrados entre 1975 e 1999 foram destinados às doenças tropicais. Esses números revelam a existência de uma política de pesquisa excludente, na qual apenas 10% da despesa mundial com pesquisa em saúde são gastos em doenças que representam 90% da carga global. Pesquisadores de todo o mundo, principalmente os latino-americanos, têm trabalhado para fornecer à população necessitada alternativas para este tratamento que, na maioria dos casos, se apresenta inadequado.

Devido a essa falta de medicamentos para o tratamento da doença de Chagas e a necessidade de se buscar novos compostos mais eficazes e menos tóxicos para o hospedeiro é que neste trabalho testamos substâncias bioativas sintéticas derivadas da cumarina as quais tem relatos na literatura de possuírem atividade biológica antiprotozoária (SOUZA, 2005; MAZZARINO, 2009).

Segundo Souza (2005) as cumarinas fazem parte da dieta do ser humano e de outros animais, sendo encontradas em vegetais da família das umbelíferas como a cenoura, o aipo, a salsa e a chicória; bem como nas frutas mirtilo e toranja (*grapefruit*). Outras fontes desses derivados ainda incluem o chá verde e a canela. Estima-se que cerca de 0,02 mg/kg/dia de cumarinas seja a quantidade que os seres humanos estão expostos diariamente, sendo considerado o limite geral permitido do uso de cumarinas no alimento e em bebidas não-alcoólicas de até 2mg/kg; entretanto, em bebidas alcoólicas e caramelo o limite permitido é de 10 mg/kg e em goma de mascar é de 50mg/kg. Devido ao uso em alta escala desses metabólitos em perfumes, cosméticos, fragrâncias e realçadores de aromas para alimentos, a toxicidade da cumarina foi estudada pela FDA (*Food and Drug Administration*) e o *National Cancer Institut*. O estudo foi conduzido com ratos e camundongos onde se observou evidências de efeitos carcinogênicos e nefropáticos. Entretanto o rato foi considerado um modelo animal impróprio para avaliação da segurança na exposição de seres humanos às cumarinas, pois ao contrário do que acontece com ratos e camundongos, onde doses altas de cumarina podem produzir toxicidade e carcinogenicidade, há pouca evidência de toxicidade induzida pela cumarina em seres humanos, quando são administradas doses

até 1900 vezes maiores do que aquelas obtidas de fontes dietéticas e de cosméticos. Estudos sugeriram que em humanos, é improvável que ocorra a produção do metabólito em concentrações toxicologicamente relevantes se expostos a nível baixo de cumarina, mas levando em consideração que alguns tipos de cumarinas podem gerar efeitos citotóxicos (SOUZA, 2005).

Estudos têm sido feitos com complexos metaloelementos (com Cu (II), Ni (II) e Zn (II) que mimetizam o efeito de Superóxido dismutase (SOD), um sequestrador (*scavenger*) natural do anion superóxido (O_2^-) e sua aplicação para obtenção de melhores antioxidantes (LI, 2007).

Em nossos estudos comparamos a atividade de compostos cumarínicos complexados com metais e do Benznidazol, bem como efeito sinérgico de associações destes diferentes compostos nas formas extracelular e intracelular do *T. cruzi*, buscando estudar novas moléculas para tratamento da doença de Chagas.

Benznidazol age formando metabólitos eletrofílicos, por redução dos grupamentos amino pelas nitroreduases e que estão envolvidos no efeito tripanocida por ligação covalente a macromoléculas (DIAS DE TORANZO, 1988; MAYA, 2004 e 2006). Também está descrito que Benznidazol induz a fagocitose e aumenta morte do tripanosoma através de INF- γ (ROMANHA, 2002).

Os dados obtidos na Tabela 15 ressaltam as diferenças nas atividades antiparasitárias dos compostos experimentais nas formas epimastigotas das duas cepas utilizadas e células VERO, comparadas com o controle. Verificamos que a cepa CL mostra maior suscetibilidade ao tratamento com a 4H3NC 241 μ M e aos compostos complexados com metais o 4H3NC-Ni 48,80 μ M, 4H3NC-Zn 121 μ M e 4H3NC-Fe 25,2 μ M. A cepa G mostra maior sensibilidade ao composto 4H3NC-Zn com 121 μ M.

Com relação ao estudo de ação dos compostos (Tabela 15) em células VERO concluímos que os compostos 4H3NC, o 4H3NC-Cu e o 4H3NC-Zn variam de 36% a 80% de ação tóxica para as mesmas.

Nas formas amastigotas intracelulares da cepa G os compostos 4H3NC-Cu, cumarina e 4H3NC-Fe, mostraram um percentual entre 39% a 48% em diminuir o índice de Infecção nas culturas de células VERO infectadas (Tabela 19). Novamente as porcentagens de inibição na cepa CL foram sensivelmente maiores variando de 22 a 24% (Tabela 19). Os dados de tratamento das formas epimastigotas e amastigotas sugerem uma diferença de sensibilidade de 15% dos parasitos da cepa CL aos

compostos experimentais e Benznidazol. No tratamento com o composto 4H3NC-Cu na concentração 186,2 μ M, as duas cepas estudadas (G e CL) mostraram-se suscetíveis. Nos resultados de citotoxicidade das associações de compostos, a associação B mostrou-se 33% citotóxica nos experimentos com células VERO. Quanto aos tratamentos das formas amastigotas da cepa G de *T. cruzi* com as associações de compostos a diminuição de IF em percentual foi A > B > C > F > D > E. Diferentemente, nos dados do tratamento das mesmas associações de compostos em amastigotas de cepa CL obtivemos que a porcentagem de diminuição de IF foi D > E > C > F > B > A. Demonstramos, portanto, que as concentrações utilizadas nas associações foram mais efetivas para a cepa G. Associação A mostrou-se muito efetiva para cepa G, associação D para cepa CL e associação F com igual atividade nas duas cepas estudadas (Figura 40).

Nossos resultados mostraram que atividade citotóxica em cultura de células VERO do 4H3NC-Cu, não se reproduz quando utilizamos células VERO infectadas com *T. cruzi*. Estes dados são corroborados com dados anteriores de modificações na célula infectada por contato de glicofosfolipídeos de membrana do *T. cruzi* com a célula hospedeira via receptores Toll-like. Um mecanismo de sinalização de IP₃ e IP₃-kinases e ativado, produzindo agregação de vesículas lisossomais na membrana plasmática, favorecendo a entrada do parasito na célula. Simultaneamente, sinais pro inflamatórios são produzidos através de INF- γ , IL-12 e secreção de TNF- α , que conseqüentemente eleva níveis de NO intracelular essencial para atividade parasiticida do macrófago. Para escapar disto o parasito produz uma resposta inflamatória direcionada para evasão do sistema imune do hospedeiro, como indução de apoptose em diversas células e imunossupressão do hospedeiro (MAYA, 2006).

Outra abordagem neste trabalho foi estudar a modulação de expressão de genes nas formas epimastigotas das cepas G e CL com concentrações e associações de compostos selecionados a partir dos dados anteriormente obtidos. Demonstramos por análise em gel de SDS PAGE que o tratamento dos parasitos com Benznidazol induz expressão da mesma concentração de proteínas totais nas duas cepas, diferentemente dos compostos isolados 4H3NC-Fe, 4H3NC-Cu, 4H3NC que apresentam aumentada a concentração de proteínas totais obtidas na cepa G em relação à cepa CL. No caso de associações dos compostos A, B e C, os dados mostram diminuição da concentração total de proteínas em relação ao tratamento com Benznidazol nas duas cepas do

parasito e quando comparamos as concentrações obtidas nas duas cepas verificamos um aumento da expressão de proteínas totais de CL em relação à cepa G. Demonstramos assim que a associação A, B e C dos compostos experimentais no tratamento, interfere significativamente, mudando a quantidade de proteínas expressas entre as duas cepas, diferentemente do tratamento com Benznidazol que não é alterado nas cepas G e CL (Tabela 20).

Ao analisarmos o gel SDS-PAGE com o perfil eletroforético de 100 µg das proteínas totais das duas cepas dos parasitos tratados (Figuras 42 e 43, Tabela 21) observamos que, na cepa G não existe quase diferenças no perfil eletroforético definido pela quantidade (12) e tamanho das bandas protéicas apresentadas, entre os parasitos sem tratamento, tratados com Benznidazol e com os compostos isolados e associados. No caso da cepa CL temos uma significativa alteração do perfil eletroforético, onde os parasitos tratados com Benznidazol têm apenas 6 bandas protéicas, o tratamento com associação A mostra 9 bandas protéicas e o tratamento com os outros compostos apresentam 15 bandas protéicas, diferente dos parasitos sem tratamento, que exibem 12 bandas como a cepa G. Essa mudança no perfil de expressão protéico sugere uma modulação na expressão de genes possivelmente por interferência dos compostos utilizados com macromoléculas do parasito que modulam inibindo ou ativando a tradução de proteínas.

Estudos preliminares foram realizados através do método enzimático indireto descrito por Ewing e Janero (1995) que mede a atividade antioxidante dos compostos pela redução do NBT. A Figura 44 mostra a atividade antioxidante dos compostos medida pela formação de anions superóxido que doa elétrons para o NBT reduzir-se a formazan, composto de cor roxa. Verificamos que dos compostos utilizados apenas 4H3NC 96,5µM e 4H3NC-Cu 49,6µM têm boa atividade antioxidante, menor que 0,5 µM. Os demais compostos apresentaram leituras no espectrofotômetro de 0,978 a 1,186, sugerindo para o mecanismo de ação antiparasitário, outro diferente da geração de radicais livres.

A análise estatística apresentou muita significância para a ação dos compostos 4H3NC-Cu 186,2µM, 4H3NC-Fe 50,4µM e Cumarina 136,8µM, quando comparados ao controle na cepa G e extremamente significativa para a ação do composto 4H3NC-Fe 25,2µM, quando comparado ao controle na cepa CL.

Nossos dados são promissores e indicam a necessidade de continuação dos estudos *in vivo* dos compostos e suas associações em animais infectados por *T. cruzi*.

9 CONCLUSÃO

Nossos dados mostraram que nos experimentos com células VERO, o composto que apresentou maior citotoxicidade foi o 4H3NC-Zn.

Nas associações de compostos os experimentos em células VERO, apenas a Associação B apresentou uma citotoxicidade próxima de 50% de células viáveis.

A cepa CL na forma epimastigota demonstrou ser mais sensível aos compostos testados.

Na forma amastigota, a cepa CL apresentou maior sensibilidade aos compostos testados.

Com associações de compostos utilizados para tratamento na forma amastigota, a cepa G demonstrou maior sensibilidade que a cepa CL.

Em relação ao perfil de expressão protéica dos parasitas, a cepa CL foi mais sensível apresentando maiores diferenças em relação ao controle sem tratamento.

Os compostos 4H3NC 96,5 μ M e o 4H3NC-Cu 49,6 μ M, apresentaram atividade antioxidante. Isto sugere para os outros compostos, diferente mecanismo de ação antiparasitário a ser estudado.

Na análise estatística, os compostos que se destacaram foram a cumarina 136,8 μ M, 4H3NC-Cu 186,2 μ M, 4H3NC-Fe 50,4 μ M mostraram-se muito significantes quanto à ação antiparasitária na forma amastigota da cepa G de *T. cruzi* e o composto 4H3NC-Fe 25,2 μ M extremamente significativa para a cepa CL.

Nossos dados são promissores e indicam a necessidade de continuação dos estudos *in vivo* dos compostos e suas associações.

10 REFERÊNCIAS

- 1 - ANDRADE L. O AND ANDREWS N. W. **The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention.** *Nature Reviews Microbiology*, 2005.
- 2 - ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil.** Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.
- 3 - AVILA A. R, DALAGIOVANA B, YAMADA-OGATA S. F., MONTEIRO-GOES, V., FRAGOSO, S. P., KRIEGER, M. A. , GOLDENBERG, S. **Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** *Genet Mol Res.* Mar 31: 2 (1): 159-68, 2003.
- 4 - AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. S. **Hospedeiro Invertebrado.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11>> Acesso em: 06 ago. 2009a.
- 5 - BAPTISTA, C. S., VENCIO, R. Z., ABDALA, S., VALADARES, M. P., MARTINS, C., de BRAGANÇA, PEREIRA, C. A., ZINGALES, B. **DNA microarrays for comparative genomics and analysis of gene expression in *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol.* 2004 Dec;138(2):183-94.
- 6 - BEGHETTI, A. E.,. **Atividade antiulcerogênica do extrato bruto hidroalcoólico e da cumarina isolada da *Mikania Laevigata* Schultz.Bip.** F.C.M. UNICAMP. 1999
- 7 - BENITE, A. M. C., MACHADO, S. P., BARREIRO, E.J. **Uma visão química bioinorgânica medicinal.** *Revista Química Nova*, vol.30, No. 8, 2062-2067, nov. 2007.
- 8 - BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Chagas.** Brasília: MS/SVS, 2009. Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530> Acesso em: 20 set. 2009.

9 - BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista Instituto Médico Tropical São Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220-224, set./out. 1963.

10 - BRENER, Z. **Biology of *Trypanosoma cruzi***. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347 - 382, 1973.

11 - BRENIERE, S. F., PONCH, O., SELAES, H., TIBAYRENE, M., LEMESRE, J., ANTEZANA, G, DESJEUX, P. **Specific humoral depression in chronic patients by *Trypanosoma cruzi***. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 26: 245-258, 1984.

12 - CAPALDI, M. L. P. M. **Reguladores vegetais no desenvolvimento de plantas de Guaco**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade de Marília, Marília, 2007.

13 - CARVALHO, T. U. **Estudo por microscopia óptica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>> Acesso em: 26 jul. 2009.

14 - *CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*. ***Trypanosomiasis american***. Atlanta: CDC, 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/chagas/>> Acesso em: 26 jul. 2009.

15 - **Carlos Chagas e a descoberta de uma nova tripanossomíase humana**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=34>> Acesso em: 22 jul. 2009b.

16 - CARMO, E. V.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. **Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages**. *Mehrdad*

Matloubian, University of California, San Francisco, United States of América. Vol 5, Issue 11, e13815. November 2010.

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

18 - **Chagas**. Brasília: MS/SVS, 2007b. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacaochagas.pdf>> Acesso em: 20 set. 2009.

19 - CERCHIARO, G.; FERREIRA, A. M. C. **Oxindoles and copper complexes with oxindole-derivatives as potencial pharmacological agents**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 17, n. 08, p. 1473-1485, dec. 2006.

20 - CONCENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (supl.III), 2005.30 p.

21 - COURA, J. R. Síntese histórica e evolução dos conhecimentos sobre doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (Orgs.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**: Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. p. 469-486.

22 - COURA J. R., CASTRO S. L. **A critical review on Chagas' disease chemotherapy**. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.

23 - DIAS, J. C. P. Doenças de Chagas. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 11, p. 81-111.

24 - DIAS J. V C.P, LOYOLA C. C. P., BRENER Z. **Doença de Chagas em Minas Gerais: Situação atual e perspectivas**. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*. V 37:7-28, 1985.

25 - DIAZ D.E., TORANZO E.G., CASTRO J.A., FRANKE D.E., CAZZULO B.M., CAZZULO J.J. **Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*.** *Experientia* 44: 880-881, 1988.

26 - DOCAMPO R, MORENO S. N. **Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agent and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*.** *Rev Infect Dis* 6: 223-238, 1984.

27 - DORNAS, W.C. et al. **Flavanóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241-249, mar. 2008.

28 - DRÖGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

29 - **DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INICIATIVE. Sobre a doença de Chagas.** *DNDi*, 2009. Disponível em: <<http://www.treatchagas.org/default.aspx>> Acesso em: 20 set. 2009.

30 - ESCOBAR, H. Médico teve duas indicações ao Nobel. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 19 abr. 2009.

31 - FAUNDEZ M., PINO, L., ORTIZ, C., LOPEZ, R., SEGUEL, C., FERREIRA, J., PAVANI, M., MORELLO, A., MAYA, J. D. **Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*.** *Antimicrob Agentes Chemother.* 2005 Jan; 49 (1): 126-30.

32 - FIDALGO, C. **Análise do efeito *in vitro* do antioxidante curcumina e sua associação ao antitumoral bleomicina sobre os linfócitos humanos, pelo teste do micronúcleo.** 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Clínica), Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2007.

33 - FREILIJ H, ALTICHEH J. **Respuesta terapêutica AL nifurtimox em pacientes de edad pediátrica com enfermidade de Chagas crônica de la ciudad de Buenos Aires, Argentina.** *Rev Patol Trop 27 (Supl): 17-19,1998*

34 - GONTIJO, E. D.; SANTOS, S. E. **Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=25>> Acesso em: 09 ago. 2009.

35 - HARDING, J.; OLIVEIRA, J. T. R. de; SILVA, K. C. O.; FERNANDES, L. A.; HAYDEN, R. L. **Aspectos históricos da Doença de Chagas.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HISTÓRIA DA MEDICINA, 5., 2000, Santos. **Anais...** Santos: Universidade Metropolitana de Santos, 2000.

36 - **Hospedeiro vertebrado.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11>> Acesso em: 06 ago. 2009b.

37 - KOURY, J. C., DONANGELO, C.M., **Zinco, estresse oxidativo e atividade física.** *Revista de Nutrição, Campinas, 16(4):433-441, out/dez, 2003.*

38 - KROPF, S. P. **Carlos Chagas e a caracterização clínica da tripanossomíase americana (1909-1934).** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=52>> Acesso em: 22 jul. 2009.

39 - LAMOUNIER, J. A.; MOULIN, Z. S.; XAVIER, C. C. Recomendações quanto à amamentação na vigência de infecção materna. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. S181-S188, Rio de Janeiro, 2004.

40 - LANA, M. de; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* In: NEVES, D. P; MELO, A. L. de; GENARO, O; LINARD, P. M. **Parasitologia Humana.** 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 11, p. 85-108.

- 41 - LI, T-R., YANG, Z-Y., WANG, B-D. **Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity of Naringenin Schiff Base and Its Cu(II), Ni(II), Zn(II) Complexes.** Chem. Pharm. Bull, Japan, Vol. 55, 26-28, 2007.
- 42 - LIU Y AND ENGLUND PT. **The dynamics of Kinetoplast DNA replication.** *Mol. Microbiol* V 64: 676-690, 2007.
- 43 - LOPES E. R. AND CHAPADEIRO E. **Doença de Chagas no triângulo Mineiro.** *Rev. Goiana Med*, V 32:109-113, 1986.
- 44 - LUQUETTI A. O. **Megaesôfago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*.** *Ver Goiana Med* 33: 1-16,1987.
- 45 - MACEDO V. O. **Forma indeterminada da doença de Chagas.** In: Dias JCP, Coura JR (eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas.* Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, p.135-151, 1997.
- 46 - MAYA, J. D., RODRÍGUEZ, A., PINO, L., PABÓN, A., FERREIRA, JORGE, F., PAVANI, M., REPETTO, Y., MORELLO, A. **Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*.** (Review) *Biol. Res.* V.37. n.1. Santiago, 2004.
- 47 - MAYA, J. D, CASSELS, B. K, ITURRIAGA-VASQUEZ, P, FERREIRA, J, FÁUNDEZ, M, GALANTI, N, FERREIRA, A, MORELLO, A. **Mode Of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host** (Review) *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 601-620, 2006
- 48 - MAZZARINO, L. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo curcumina e avaliação *in vitro* e *in vivo* em modelos de melanoma murino B16-F10.** 2009. 156 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

- 49 - MIRANDA, J. A. Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas. 2001. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.
- 50 - MENDES, R. P, HOSHINO-SHIMIZU, S, SILVA, A. M. M., MOTA, I, HEREDIA, R. A, LUQUETI, A. O., LESER, P. G. **Serological diagnosis of Chagas disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi***. J Clin Microbiol 35: 1829-1834, 1997.
- 51 - MINING, T. A, BUA J., GARCIA, G. A, MCGRA, W. R. A, TARLETON, R. L. **Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi***. : Mol Biochem Parasitol. 2003 Sep;131(1):55-64.
- 52 - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento etiológico da doença de Chagas**, 2ª ed. Brasília: *Fundação Nacional Saúde*, 32 p, 1997.
- 53 - MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Secretária de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas**. Rev Soc Bras Med Trop 38 (supl III): 1-29, 2005.
- 54 - MIRANDA, J. A. **Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas**. 2001. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.
- 55 - MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays**. J Immunol. Methods, vol. 65, n. 1-2 (1983), p. 55-63.
- 56 - NEVES, D. P. Doença de Chagas. In: _____. **Parasitologia Dinâmica**. Belo Horizonte: Atheneu, 2003. cap. 19, p. 113-133a.

57 - **O ciclo do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007.
Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=24>>
Acesso em: 06 ago. 2009b.

58 - OLIVEIRA, A.C. *et al.* **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, mar.2009.

59 - OLIVEIRA, M. F, DIAS, A. T. N., PONTES, V. M. O., SOUZA, A. S. J. R., COELHO, H. L. L, COELHO, I. C. B. **Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil.** *Rev Patol Trop* 37 (3): 209-228, 2008.

60 - OLSZEWER, E. **O Perigoso Radical Livre.** São Paulo: Nova Linha Editorial, 1994.

61 - ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE – Organização Mundial de Saúde. **Tratamento Etiológico de La Enfermedad de Chagas. Conclusiones de reunión de especialistas.** OPC/HCP/HCT/140/99, Rio de Janeiro, 32p., 1998. In: *Revista de Patologia Tropical* 28: 247-279, 1999.

62 - PEREIRA, V. L, MARCOS De, A. A, Boainain E. **Xenodiagnostico, Hemocultura e teste de lise mediada pelo complemento, como critérios de seleção de pacientes chagásicos crônicos para quimioterapia.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 31: 301-307, 1989

63 - PLUMB, J. A., MILROY, R., KAYE, S. B. **Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay,** *American Association for Cancer Research*, Reino Unido, 1989.

64 - POLAK, A., AND RICHLE, A. **Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole.** *An Trop Med Parasitol.* V72; 45-54, 1978.

- 65 - REY, L. **Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: ecologia, epidemiologia e controle**. In: _____. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 13, p. 179-199.
- 66 - RODRIGUES, F. R, TACHIMA, A. K, PEREIRA, R. M. S, MOHAMED, R. S, CABRAL, F. A. **Coumarin solubility and extraction from emburana (*Torresea cearensis*) seeds with supercritical carbon dioxide**. J. of Supercritical Fluids 43 (2008) 375-382
- 67 - RODRIGUES, H.G. et al. **Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL**. Revista de Nutrição, Campinas, v. 16,n. 3, p. 315-320, jul./set.2003.
- 68 - ROMANHA, A. J., ALVES, R. O., MURTA, S. M. F., SILVA, J. S., ROPERT, C., GAZZINELLI, R. T. **Experimental Chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* Infection: Essential Role of Endogenous Interferon- γ in Mediating Parasitologic Cure**. The journal of infections diseases, Chicago, 2002; 186:823-8.
- 69 - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE (SVS) – Situação Epidemiológica da Doença de Chagas. Acesso Outubro 2010: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530.
- 70 - SILVEIRA, C. A. N, CASTILLO E, CASTRO C. **Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada**. Rev Soc Bras Med Trop 33: 191-196, 2000
- 71 - SILVA, J. P. M. S. C. **Efeitos de novos compostos azotados com potencial farmacológico na protecção do stresse oxidativo**. 2004. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular), Universidade de Minho, Braga, 2004.
- 72 - SIQUEIRA, A. M. Subfilo Mastigophora. In: NEVES, D. P; MELO, A. L.; GENARO, O; LINARD, P. M. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap. 6, p. 37-40.

73 - SOBRINHO, J. L. S, MEDEIROS, F. P. M. , LaROCA, M. F., SILVA, K. E. R. S., LIMA, L. N. A., ROLIM, P. J. N. **Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas.** Revista de Patologia Tropical, 2007. Vol. 36 (2): 103-118, maio-ago.

74 - SOUTO et al., Mol. Biochem. Parasitol. 83, 141-152, 1996

75 - SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados.** 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

76 - SOUZA, W. **Estudo por microscopia eletrônica de transição.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>> Acesso em: 26 jul. 2009a.

77 - Subfilo Mastigophora – Flagelados – Família Trypanosomatidae. In: _____. **Parasitologia Dinâmica.** Belo Horizonte: Atheneu, 2003. cap. 14, p. 73-77b.

78 - TEIXEIRA, A. R. L., NASCIMENTO, R. J., STURM, N. R. **Evolution and pathology in Chagas Disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, V 107: 463-491, 2006.

79 - Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: O parasito. In: _____. **Parasitologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, p. 152-160b.

80 - URBINA, J. A. **Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant?** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 349-355, 1999

81 - URBINA, J. A., DOCAMPO R. **Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances.** *Trends Parasitol* 19: 495-501,2003.

82 - VILLAREAL, D, NIRDÉ, P, HIDE, M, BARBABÉ, C, TIBAYRENC, M. **Differential gene expression in Benznidazole-Resistant Trypanosoma cruzi. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, July 2005,p.2701-2709,Vol.49,No.7.

83 - WHO. **Control of Chagas Disease. Second report of a WHO expert committee. WHO Technical Report Series, V 905,2002.**

84 - YOSHIDA, N. **Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi.** An. Acad. Bras. de Ciênc. Vol.78 n. 1 Rio de Janeiro Mar. 2006.

85 - YOSHIDA, N. **Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi.** Infect Immun. 1983 May; 40(2): 836-839.

86 - ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J.**Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** Química Nova Vol.21 n.6 São Paulo Nov/Dec.1998.

11 APÊNDICE

11.1 CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS UTILIZADOS EM μg E μM

Tabela 25 – Valores das concentrações dos compostos utilizados em μg e μM .

Compostos	Concentrações em μg	Concentrações em μM
Benznidazol	10	38,4
	20	76,8
Cumarina	10	68,4
	20	136,8
4H3NC	50	241
	75	362,10
4H3NC-Cu	50	124,13
	75	186,20
4H3NC-Fe	10	25,2
	20	50,4
4H3NC-Ni	10	24,4
	20	48,8
4H3NC-Zn	25	60,4
	50	121

Fonte: Acervo pessoal.

11.2 VALORES DAS LEITURAS DE ABSORBÂNCIAS

11.2.1 Determinação da citotoxicidade dos compostos

Tabela 26 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do solvente DMSO.

Controle	10µL	20µL	50µL	75µL	100µL	150µL
1.775	1.913	1.984	1.979	1.746	1.544	1.679
1.866	1.976	2.045	1.829	1.728	1.783	1.484
1.909	1.974	1.945	1.709	1.650	1.841	1.482

Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 27 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do fármaco Benznidazol.

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,869	0,826	0,631	0,618	0,400
0,862	0,935	0,657	0,579	0,375
0,894	0,799	0,608	0,603	0,351

Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 28 – Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade da Cumarina

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,869	0,932	0,669	0,460	0,236
0,862	0,869	0,671	0,520	0,251
0,894	0,935	0,692	0,488	0,212

Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 29 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC.

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,869	0,932	0,669	0,460	0,236
0,862	0,869	0,671	0,520	0,251
0,894	0,935	0,692	0,488	0,212

Fonte: Acervo Pessoal.

Tabela 30 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Cu.

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,804	0,525	0,441	0,452	0,391
0,929	0,507	0,375	0,485	0,274
0,789	0,559	0,378	0,455	0,334

Fonte: Acervo Pessoal.

Tabela 31 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Fe.

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,804	0,814	0,734	0,790	0,959
0,929	0,863	0,781	0,818	0,878
0,789	0,827	0,801	0,772	0,635

Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 32 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Ni.

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,869	0,577	0,531	0,681	0,282
0,862	0,583	0,406	0,403	0,338
0,894	0,556	0,637	0,404	0,356

Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 33 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade do composto 4H3NC-Zn.

Controle	50µg	75µg	100µg	150µg
0,869	0,385	0,374	0,311	0,301
0,862	0,423	0,378	0,395	0,289
0,894	0,358	0,366	0,467	0,310

Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 34 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes de redução do MTT para determinação da citotoxicidade das associações de compostos.

Controle Negativo	Controle Positivo	Associação A	Associação B	Associação C	Associação D	Associação E	Associação F
2.045	1.785	1.959	1.900	1.920	1.918	2.045	1.367
1.969	1.890	1.938	1.938	2.154	1.871	2.010	1.311
1.874	1.884	1.673	1.994	1.815	1.989	1.882	1.283

Fonte: Acervo pessoal.

11.2.2 Tempo de ação máxima do MTT em forma epimastigota de *T. cruzi*.

Tabela 35 - Leituras de absorbância em triplicatas dos testes para determinação do tempo de ação máxima do MTT em células viáveis de *T. cruzi* na forma epimastigota.

01h00	02h00	03h00	04h00	05h00	07h00	24h00
0,214	0,440	0,610	0,530	0,410	0,304	0,460
0,232	0,457	0,604	0,548	0,419	0,266	0,256
0,174	0,510	0,528	0,525	0,442	0,138	0,891

Fonte: Acervo pessoal.

11.3 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS EM CÂMERA DE NEUBAUER

11.3.1 Contagem para avaliação anti epimastigota da cepa G

Tabela 36 - Valores em triplicatas da contagem de células em câmara de Neubauer, para avaliação anti-epimastigota da cepa G de *T. cruzi*.

Compostos µg	Contagem 1	Contagem 2	Contagem 3
Controle 00	350	288	263

Fonte: Acervo pessoal.

Continuação da Tabela 36...

Tabela 36 - Valores em triplicatas da contagem de células em câmara de Neubauer, para avaliação anti-epimastigota da cepa G de *T. cruzi*.

Benznidazol	10	113	163	163
	20	200	313	263
Cumarina	10	125	313	263
	20	513	462	663
4H3NC	50	263	250	213
	75	175	100	263
4H3N-Cu	50	238	263	275
	75	100	113	263
4H3NC-Fe	10	263	300	275
	20	225	538	338
4H3NC-Ni	10	163	125	175
	20	150	288	225
4H3NC-Zn	25	188	250	225
	50	88	188	63

Fonte: Acervo pessoal.

11.3.2 Contagem para avaliação anti epimastigota da cepa CL

Tabela 37 - Valores em triplicatas da contagem de células em câmara de Neubauer, para avaliação anti-epimastigota da cepa CL de *T. cruzi*.

Compostos μg	Contagem 1	Contagem 2	Contagem 3	
Controle	00	250	375	350
Benznidazol	10	75	63	00
	20	13	75	88

Fonte: Acervo Pessoal

Continuação da Tabela 37...

Tabela 37 - Valores em triplicatas da contagem de células em câmara de Neubauer, para avaliação anti-epimastigota da cepa CL de *T. cruzi*.

Cumarina	10	38	125	238
	20	350	238	288
4H3NC	50	100	25	13
	75	113	275	400
4H3N-Cu	50	238	288	675
	75	675	125	75
4H3NC-Fe	10	88	38	188
	20	100	100	200
4H3NC-Ni	10	75	50	63
	20	75	38	63
4H3NC-Zn	25	200	75	63
	50	13	100	100

Fonte: Acervo pessoal

11.4 LEITURAS DE ABSORBÂNCIA PARA AVALIAÇÃO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE

Tabela 38 - Leituras de absorvância dos compostos para avaliação da ação antioxidante.

Compostos	Contagem 1	Contagem 2	Contagem 3
Controle	1,019	0,950	0,927
Cumarina	1,220	1,154	1,184
4H3NC	0,654	0,045	-
4H3NC-Cu	0,036	0,068	0,152
4H3NC-Fe	0,991	1,012	0,980

Fonte: Acervo pessoal.

