



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Yuri Barreiros

**Encapsulação do Antimoniato de Meglumina, Curcumina e 4-nitrochalcona em
Nanopartículas Lipídicas e Poliméricas para Aplicação Biomédica**

Florianópolis
2024

Yuri Barreiros

**Encapsulação do Antimoniato de Meglumina, Curcumina e 4-nitrochalcona em
Nanopartículas Lipídicas e Poliméricas para Aplicação Biomédica**

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Coorientadora: Profa. Claudia Sayer, Dra.

Florianópolis

2024

Barreiros, Yuri

Encapsulação do Antimoniato de Meglumina, Curcumina e 4-nitrochalcona em Nanopartículas Lipídicas e Poliméricas para Aplicação Biomédica / Yuri Barreiros ; orientador, Pedro Henrique Hermes de Araújo, coorientadora, Claudia Sayer, 2024.
106 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Leishmaniose. 3. Nanopartículas. 4. Dupla emulsão. I. Henrique Hermes de Araújo, Pedro. II. Sayer, Claudia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Yuri Barreiros

Encapsulação do Antimoniato de Meglumina, Curcumina e 4-nitrochalcona em Nanopartículas Lipídicas e Poliméricas para Aplicação Biomédica

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 27 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Ariovaldo Bolzan, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Leandro Guarezi Nandi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Jonathan Aleksander Bork, Dr.

Airela Indústria Farmacêutica Ltda

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Prof^a. Débora de Oliveira, Dr^a.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.

Orientador

Florianópolis

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e ao Laboratório de Controle e Processos de Polimerização pela disponibilização do espaço físico para realização dos ensaios experimentais.

Aos docentes e servidores que compõe o Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da UFSC (PosENQ).

Ao Prof. Pedro Hermes e Claudia Sayer pela orientação, disponibilidade e acessibilidade na resolução de problemas.

Ao Prof.^a Wander Pavanelli do Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer da Universidade de Londrina (UEL) por ter disponibilizado o laboratório e principalmente pela ajuda nos testes microbiológicos.

Ao Eduardo Isoppo do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) por ter disponibilizado o uso do microscópio eletrônico de transmissão para as análises morfológicas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES) pelo suporte financeiro e bolsa de estudos.

A Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Jonathan Bork, Leandro Guarezi e Ariovaldo Bolzan que se disponibilizaram a compor a banca examinadora desse documento.

A todos os meus colegas do PosENQ e do LCP que não farei distinção nesse trabalho, o meu muito obrigado.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. As formas principais da leishmaniose são a visceral (também conhecida como calazar), que é a forma mais grave, e a cutânea, a forma mais comum. É uma doença com preocupação global e geralmente é mais comum em áreas rurais, mas pode ser encontrada em áreas urbanas, principalmente nas periferias de algumas cidades. Para o tratamento convencional existe uma série de medicamentos a serem aplicados, e o que vai determinar o tipo de medicamento será o tipo de leishmaniose e o estado do paciente. Outro ponto é que os medicamentos apresentam uma série de desvantagens em termos de segurança, resistência e disponibilidade. Os medicamentos não são bem tolerados, têm que ser tomados por muito tempo e são difíceis de administrar. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar nanopartículas lipídicas sólidas à base de cera de abelha contendo antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona quanto às características físico-químicas, eficiência de encapsulação, morfologia, propriedades térmicas e atividade leishmanicida *in vitro* nas formas promastigota da *L. infantum* e *L. amazonensis*. As formulações foram preparadas pelo método de dupla emulsão (água/óleo/água) apresentando um tamanho médio na faixa de 211 e 283 nm, boa estabilidade coloidal e eficiência de encapsulação elevada para a curcumina e 4-nitrochalcona (valores próximos a 99%), enquanto o antimoniato de meglumina, apresentou eficiência de encapsulação relativamente baixa. A análise por espectroscopia por FTIR confirmou a presença dos fármacos nas nanopartículas e revelou que não houve interação físico-química entre os fármacos e a cera de abelha. A análise morfológica mostrou uma forma semiesférica, o que pode favorecer a absorção celular. A análise térmica por DSC e TGA indicou modificações nas propriedades térmicas das nanopartículas em comparação com a cera de abelha pura, sugerindo uma reorganização molecular durante a formação das nanopartículas. Nos testes de citotoxicidade em macrófagos J774.1, as nanopartículas e os fármacos individuais não demonstraram toxicidade significativa em concentrações de 1, 5 e 10 μM . Contra as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*, apenas as formas livres de curcumina e 4-nitrochalcona apresentaram redução significativa na viabilidade, enquanto as nanopartículas não exibiram efeitos observáveis. Outra abordagem focou-se na preparação de nanopartículas lipídicas/poliméricas para encapsular antimoniato de meglumina. A introdução do polímero aumentou a eficiência de encapsulação para aproximadamente 25,3%, conferindo às nanopartículas uma estrutura mais estável em comparação com as nanopartículas lipídicas. A morfologia e o tamanho médio apresentaram-se semelhante as nanopartículas lipídicas. A análise térmica indicou maior estabilidade térmica com a adição do polímero, revelando uma fusão menos propensa e decomposição gradual em temperaturas mais baixas. O teor de gel das nanopartículas lipídicas/poliméricas (65-67%) sugeriu uma rede polimérica bem formada, garantindo estabilidade estrutural ao longo do tempo. O estudo concluiu que as nanopartículas lipídicas se mostraram seguras para aplicações biomédicas, destacando a necessidade de investigações em modelos mais complexos. Além disso, combinando lipídios e polímeros de fontes renováveis, não apenas melhorou a eficiência de encapsulação, mas também promoveu práticas ecologicamente responsáveis. Em resumo, o estudo representou um avanço na entrega de fármacos, oferecendo uma formulação estável, com potencial aplicação no tratamento de doenças tropicais negligenciadas, contribuindo assim para avanços no desenvolvimento de novas terapias.

Palavras-chave: Leishmaniose; Nanopartículas; Dupla emulsão; Antimoniato de meglumina; Curcumina; 4-nitrochalcona.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease transmitted through the bite of infected female sandflies. The main forms of leishmaniasis are visceral (also known as kala-azar), the most severe form, and cutaneous, the most common form. It is a globally concerning disease, predominantly found in rural areas but also present in urban areas, particularly on the outskirts of some cities. Conventional treatment involves a variety of medications, with the choice depending on the type of leishmaniasis and the patient's condition. However, these medications have several drawbacks in terms of safety, resistance, and availability. They are poorly tolerated, require prolonged administration, and pose challenges in terms of management. This study aimed to develop and evaluate solid lipid nanoparticles based on beeswax containing meglumine antimoniate, curcumin, and 4-nitrochalcone concerning their physicochemical characteristics, encapsulation efficiency, morphology, thermal properties, and in vitro leishmanicidal activity against promastigote forms of *L. infantum* and *L. amazonensis*. Formulations were prepared using the double emulsion method (water/oil/water), with an average size ranging from 211 to 283 nm, good colloidal stability, and high encapsulation efficiency for curcumin and 4-nitrochalcone (close to 99%), while meglumine antimoniate showed relatively low encapsulation efficiency. FTIR spectroscopy confirmed the presence of drugs in nanoparticles, indicating no physicochemical interaction between drugs and beeswax. Morphological analysis revealed a semi-spherical shape, potentially enhancing cellular absorption. DSC and TGA thermal analyses suggested modifications in nanoparticle thermal properties compared to pure beeswax, indicating molecular reorganization during nanoparticle formation. Cytotoxicity tests on J774.1 macrophages showed no significant toxicity for nanoparticles and individual drugs at concentrations of 1, 5, and 10 μM . Against promastigote forms of *L. infantum* and *L. amazonensis*, only free forms of curcumin and 4-nitrochalcone exhibited a significant reduction in viability, while nanoparticles showed no observable effects. Another approach focused on lipid/polymeric nanoparticles to encapsulate meglumine antimoniate. The introduction of the polymer increased encapsulation efficiency to approximately 25.3%, providing nanoparticles with a more stable structure compared to lipid nanoparticles. Morphology and average size remained similar to lipid nanoparticles. Thermal analysis indicated increased thermal stability with the polymer, revealing less prone fusion and gradual decomposition at lower temperatures. The degree of cross-linking (65-67%) suggested a well-formed polymeric network, ensuring structural stability over time. The study concluded that lipid nanoparticles demonstrated safety for biomedical applications, emphasizing the need for investigations in more complex models. Furthermore, combining lipids and polymers from renewable sources not only improved encapsulation efficiency but also promoted environmentally responsible practices. In summary, the study represented an advancement in drug delivery, offering a stable formulation with potential applications in treating neglected tropical diseases, thereby contributing to advancements in new therapies' development.

Keywords: Leishmaniasis; Nanoparticles; Double emulsion; Meglumine antimoniate; Curcumin; 4-nitrochalcone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico da transmissão da leishmaniose	15
Figura 2 - Diferentes lesões da leishmaniose cutânea	16
Figura 3 - Número de casos de leishmaniose cutânea, Região das Américas e sub-regiões, 2001-2020	17
Figura 4 - Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção. Brasil, 2000 a 2019	18
Figura 5 - Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019	19
Figura 6 - Diferentes períodos de pacientes infectados por leishmaniose visceral	20
Figura 7 - Número de casos de leishmaniose visceral com maior número de casos, Região das Américas, 2001-2019	20
Figura 8 - Estratificação de risco da leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019	21
Figura 9 - Fórmula estrutural proposta para o antimoniato de meglumina em sua forma líquida comercial (Glucantime)	24
Figura 10 - Estrutura química da curcumina	25
Figura 11 - Estrutura básica das chalconas.....	27
Figura 12 - Representação esquemática da ação de alguns tipos de nanocarreadores empregadas em macrófagos infectados por <i>Leishmania</i>	28
Figura 13 - Esquema de preparação da dupla emulsão (A/O/A).....	45
Figura 14 - Mecanismo de polimerização de crescimento em etapas de tiol-eno	46
Figura 15 – Etapas da preparação das nanopartículas lipídicas sólidas branco.....	60
Figura 16 - Curva de calibração da curcumina em metanol	70
Figura 17 - Curva de calibração da 4-nitrochalcona em água destilada.....	71
Figura 18 – Espectros de FTIR do AM livre (A), CUR livre (B), 4NC livre (C), CRO (D), cera de abelha pura (E), NLS com AM (F), com 4NC (G), com CUR (H), com AM + 4NC (I) e com AM + CUR (J).....	74
Figura 19 - Imagem do TEM das nanopartículas de cera de abelha.....	76
Figura 20 - Termograma endotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para a cera de abelha pura (a) e nanopartícula lipídica (b).....	77
Figura 21 - Termograma exotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para a cera de abelha pura (a) e nanopartícula lipídica (b)	77

Figura 22 - Termogramas da análise termogravimétrica (TGA) da cera de abelha pura e nanopartícula lipídica	79
Figura 23 - Macrófagos de linhagem J774.1 foram tratados com diferentes concentrações (1, 5 e 10 μ M) de 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM, CUR, NP CUR, NP CUR + AM. Também foram tratados com RMPI (controle), NP branco (controle positivo) e H ₂ O ₂ (controle positivo). A proliferação dos parasitos foi analisada pelo método de resazurina no tempo de 24 h. A partir do ensaio de proliferação, foi calculada as concentrações que inibiam 50 % das formas promastigotas nesse mesmo tempo. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. **** Diferença significativa comparado com o grupo controle ($p \leq 0,0001$)	80
Figura 24 - Formas promastigotas de Leishmania infantum foram tratadas com diferentes concentrações (20, 30 e 40 μ M) de 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM, CUR, NP CUR, NP CUR + AM e NP AM. Também foram tratados com M199 (controle), DMSO (veículo), AM (controle positivo) e nanopartícula branco (controle positivo). A proliferação dos parasitos foi analisada pelo método de resazurina no tempo de 24 h. A partir do ensaio de proliferação, foi calculada as concentrações que inibiam 50 % das formas promastigotas nesse mesmo tempo. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** Diferença significativa comparado com o grupo controle ($p \leq 0,001$) e *** ($p \leq 0,0005$).	82
Figura 25 - Formas promastigotas de Leishmania amazonensis foram tratadas com diferentes concentrações (25, 50 e 100 μ M) de CUR, NP CUR, NP CUR + AM, 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM e NP AM. Também foram tratados com M199 (controle), etanol (veículo), AM (controle positivo) e nanopartícula branco (controle positivo). A proliferação dos parasitos foi analisada pelo método de resazurina no tempo de 24 h. A partir do ensaio de proliferação, foi calculada a concentração que inibiu 50 % das formas promastigotas nesse mesmo tempo. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** Diferença significativa comparado com o grupo controle ($p \leq 0,001$) e **** ($p \leq 0,0001$).	84
Figura 26 – Etapas da preparação das nanopartículas lipídicas sólidas branco.....	94
Figura 27 - Análises do TEM das (a, b) nanopartículas lipídica/polimérica e (c) nanopartículas lipídicas.....	100
Figura 28 - Termograma endotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para o polímero puro (a), cera de abelha pura (b), nanopartícula lipídica (c) e nanopartícula lipídica/polimérica (d)	101

Figura 29 - Termograma exotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para o polímero puro (a), cera de abelha pura (b), nanopartícula lipídica (c) e nanopartícula lipídica/polimérica (d)	102
Figura 30 - Termogramas da análise termogravimétrica (TGA) do polímero puro, cera de abelha pura, nanopartícula lipídica e nanopartícula lipídica/polimérica.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações preparadas pelo método de dupla emulsão A/O/A	62
Tabela 2 - Caracterização das nanopartículas em relação ao tamanho médio ($D_p \pm S$), índice de polidispersão ($PdI \pm S$) e potencial zeta ($\xi \pm S$)	68
Tabela 3 – Dados obtidos para a curva de calibração da curcumina em metanol	69
Tabela 4 – Dados obtidos para a curva de calibração da 4-nitrochalcona em água destilada ..	70
Tabela 5 - Eficiência de encapsulação das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas pelo método de dupla emulsão (A/O/A).....	71
Tabela 6 - Dados obtidos a partir das curvas de DSC	76
Tabela 7 - Dados obtidos a partir das curvas de TGA e DTG.....	79
Tabela 8 - Formulações preparadas pelo método de dupla emulsão A/O/A seguida da fotopolimerização	95
Tabela 9 - Caracterização das nanopartículas em relação ao tamanho médio ($D_p \pm S$), índice de polidispersão ($PdI \pm S$) e potencial zeta ($\xi \pm S$)	97
Tabela 10 - Eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina.....	98
Tabela 11 - Dados obtidos a partir das curvas de DSC	102
Tabela 12 - Dados obtidos a partir das curvas de TGA e DTG.....	105
Tabela 13 - Resultados dos testes do teor de gel do polímero nas nanopartículas lipídica/polimérica	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Medicamentos convencionais para leishmaniose.....	23
Quadro 2 - Alguns estudos utilizando nanopartículas no tratamento da leishmaniose com a curcumina, antimoniato de meglumina e 4-nitrochalcona.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ξ – Potencial zeta

4NC – 4-nitrochalcona

A/O/A – Água/óleo/água

AM – Antimoniato de meglumina

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CLN – Carreadores lipídicos nanoestruturados

CRO - Crodamol

CUR – Curcumina

DMSO - Dimetilsulfóxido

D_p – Diâmetro médio das partículas

EE – Eficiência de encapsulação

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose monocutânea

LV – Leishmaniose visceral

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NP - Nanopartícula

O/A/O – Óleo/água/óleo

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PdI – Índice de polidispersão

S – Desvio padrão

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo geral.....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO 2	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE.....	15
2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	16
2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL.....	19
2.4 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DAS LEISHMANIOSES.....	21
2.5 ANTIMONIATO DE MEGLUMINA.....	23
2.6 CURCUMINA.....	25
2.7 4-NITROCHALCONA.....	26
2.8 NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	27
2.9 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS VIA DUPLA EMULSÃO.....	45
2.10 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS VIA TIOL-ENO.....	46
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO 3	58
3 DESENVOLVIMENTO E EVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA CONTENDO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA, CURCUMINA E 4-NITROCHALCONA EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. INFANTUM</i> E <i>L. AMAZONENSIS</i>	58
3.1 INTRODUÇÃO.....	58
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.2.1 Materiais.....	59
3.2.2 Encapsulamento do antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona.....	60
3.2.3 Diâmetro médio.....	62
3.2.4 Potencial zeta.....	62
3.2.5 Curva de calibração da curcumina e 4-nitrochalcona.....	63
3.2.6 Eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona.....	63

3.2.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	64
3.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	64
3.2.9 Calorimetria exploratória diferencia (DSC)	65
3.2.10 Análise termogravimétrica (TGA)	65
3.2.11 Análise da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> nas formas <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	65
3.2.11.1 Manutenção das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	65
3.2.11.2 Viabilidade das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> por AlamarBlue®.....	66
3.2.11.3 Cultura celular.....	66
3.2.11.4 Viabilidade de macrófagos J774.1.....	67
3.2.11.5 Análise estatística.....	67
3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO	67
3.3.1 Tamanho das nanopartículas e potencial zeta	67
3.3.2 Curva de calibração da curcumina e 4-nitrochalcona	69
3.3.3 Eficiência de encapsulação	71
3.3.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	73
3.3.5 Morfologia	75
3.3.6 Estudo térmico	76
3.3.7 Atividade leishmanicida	79
3.4 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
CAPÍTULO 4	92
4 ENCAPSULAÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS/POLIMÉRICAS	92
4.1 INTRODUÇÃO.....	92
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
4.2.1 Materiais.....	93
4.2.2 Encapsulamento do antimoniato de meglumina.....	93
4.2.3 Diâmetro médio.....	96
4.2.4 Potencial zeta.....	96
4.2.5 Eficiência de encapsulação.....	96
4.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	96
4.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	96

4.2.8	Análise termogravimétrica (TGA)	96
4.2.9	Teor de gel	96
4.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	97
4.3.1	Tamanho das nanopartículas e potencial zeta	97
4.3.2	Eficiência de encapsulação	98
4.3.3	Morfologia	99
4.3.4	Estudo térmico	101
4.3.5	Teor de gel	106
4.4	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108
5	CONCLUSÃO GERAL	111
5.1	SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS	112

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária disseminada em áreas tropicais e subtropicais. Os parasitas de *Leishmania* são transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados, os quais os parasitas vivem e se multiplicam intracelularmente nos seus hospedeiros (STEVERDIN, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das sete doenças tropicais mais importantes e representa um grave problema de saúde mundial que apresenta amplo espectro de manifestações clínicas com desfecho potencialmente fatal.

A doença pode se manifestar em várias formas dependendo do tipo da espécie da *Leishmania*, mas as principais são a leishmaniose visceral e a cutânea (ASSOLINI *et al.*, 2022).

O tratamento da leishmaniose hoje é puramente baseado em quimioterapia, e pouquíssimos medicamentos estão disponíveis para esse fim. Diversos estudos na literatura têm destacado os desafios e as limitações enfrentadas pelos tratamentos convencionais, como toxicidade, alto custo de produção, eficácia diminuída, dificuldade de administração e, mais importante, o surgimento de cepas resistentes. Houve várias tentativas de desenvolver uma vacina contra o parasita, mas não houve avanços nessa área. Portanto, o método de tratamento atual é a terapia convencional, ou seja, antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, entre outros. Em geral, o tratamento da leishmaniose deve ser adaptado individualmente ao paciente e ao tipo de leishmaniose, bem como à subespécie do parasita, podendo ser bastante desafiador o tratamento (OZGOZTASI, 1997; CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; BRAGA, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020; SASIDHARAN; SAUDAGAR, 2021).

Devido aos grandes desafios no tratamento da leishmaniose surgiu a necessidade de buscar novas alternativas. A nanotecnologia é uma ferramenta promissora em diversas áreas, o que a torna uma excelente aliada na biomedicina.

A área da nanotecnologia surgiu para revolucionar o sistema de entrega de fármacos na medicina. Diversos são os sistemas de nanocarreadores como nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsão, nanoesferas, nanopartículas poliméricas, entre outros sistemas (SALEEM *et al.*, 2019).

Esses sistemas apresentam uma ampla gama de benefícios na medicina, como maior eficiência terapêutica, possibilidade de entrega de fármacos a alvos específicos, liberação controlada e diminuição da toxicidade. Essas vantagens tornam as formulações contendo nanotecnologia uma boa estratégia para pacientes com leishmaniose (RAMOS *et al.*, 2020).

Nanopartículas lipídicas sólidas tem sido amplamente estudada e vem ganhando espaço como sistemas carreadores nanoestruturados. As nanopartículas lipídicas são baseadas em uma matriz lipídica natural ou sintética, que se encontra no estado sólido à temperatura ambiente e corporal. A cera de abelha é um lipídio natural que vem sendo utilizado para o desenvolvimento de diversos sistemas de liberação de fármacos na área farmacêutica, mas pouca atenção tem sido dada à sua aplicação sendo que pode ser um material com potencial em aplicações farmacêuticas e cosméticas, pois possuem vantagens como sistemas de liberação de drogas devido às suas propriedades físicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade da pele e atividade antimicrobiana (SOUZA; FREITAS; CAMPOS, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2021).

As nanopartículas poliméricas formadas com diversos materiais poliméricos também são amplamente empregadas no carreamento de drogas, principalmente na indústria farmacêutica. A escolha do polímero desempenha um papel crucial na eficácia e segurança desses sistemas de entrega de fármacos, sendo essencial considerar propriedades como biocompatibilidade, degradação controlada e capacidade de encapsulação. Em busca de soluções mais sustentáveis e amigáveis ao meio ambiente, a pesquisa tem se voltado para o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas utilizando materiais provenientes de fontes renováveis (BELLETTI *et al.*, 2012; MO *et al.*, 2012; SANTINI, 2023).

A utilização da polimerização via tiol-eno representa uma alternativa promissora na produção de polímeros provenientes de fontes renováveis. Esse método envolve uma polimerização radicalar mediada por reações de transferência de cadeia. Uma característica interessante é a capacidade de produzir nanopartículas carregadas com compostos bioativos, seja através de polímeros pré-formados ou por meio da polimerização *in situ*. No entanto, é importante observar que a aplicação da polimerização *in situ*, especialmente na técnica de dupla emulsão, ainda é pouco explorada para a polimerização via tiol-eno (TÜRÜNÇ; MEIER, 2013; CRAMER *et al.*, 2003).

Nesse contexto, esse estudo busca combinar lipídio e polímeros sustentáveis na formulação de nanopartículas para entrega de fármacos. A estratégia proposta neste trabalho envolve a utilização da técnica de emulsão dupla (água/óleo/água), a qual se destaca por permitir a encapsulação tanto de fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos em comparação com as técnicas convencionais utilizadas na produção de nanopartículas lipídicas sólidas e poliméricas. Essa característica permite a formulação de sistemas de entrega adaptáveis a diferentes classes de substâncias bioativas, ampliando o espectro de aplicações farmacêuticas.

Dessa forma, o estudo concentrou-se na encapsulação de antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona em nanopartículas lipídicas à base de cera de abelha sendo avaliadas em espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum* na forma promastigota. Adicionalmente foram avaliados seu efeito citotóxico *in vitro* e suas características.

Em busca de uma abordagem mais sustentável, a pesquisa avançou na produção de nanopartículas lipídicas/poliméricas. O monômero escolhido, derivado de fontes renováveis e produzido pelo nosso grupo de pesquisa (2-(acrilóiloxi)etil undec-10-enoato), foi utilizado na síntese do polímero. O objetivo principal foi aprimorar a eficácia de encapsulação do antimoniato de meglumina nas nanopartículas lipídicas/poliméricas, uma vez que esta substância é hidrofílica, comparando-as com as nanopartículas lipídicas convencionais. A técnica de polimerização via tiol-eno, pouco explorada na técnica de dupla emulsão, foi adotada para a produção dessas nanopartículas.

A convergência entre nanopartículas lipídicas e poliméricas, aliada à nossa preocupação com fontes renováveis, destaca-se como uma abordagem promissora, visando não apenas a eficácia terapêutica, mas também a sustentabilidade.

Este estudo não só amplia o horizonte terapêutico para a leishmaniose, mas também estabelece um importante precedente para pesquisas futuras na interseção entre nanotecnologia, saúde e sustentabilidade. Ao unir esforços para desenvolver sistemas terapêuticos mais eficientes e ecologicamente conscientes, esperamos contribuir significativamente para avanços na área e inspirar investigações adicionais nesse campo inovador.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanopartículas lipídicas a base de cera de abelha contendo antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona a fim de avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* contra diferentes espécies de *leishmania* e aprimorar a eficácia de encapsulação do antimoniato de meglumina usando nanopartículas lipídicas/poliméricas com monômero renovável via polimerização tiol-eno.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Produzir nanopartículas lipídicas sólidas utilizando a técnica de emulsão dupla (água/óleo/água);
- b) Produzir nanopartículas lipídicas/poliméricas utilizando a técnica de emulsão dupla e polimerização tiol-eno;
- c) Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação, propriedades térmicas e teor de gel;
- d) Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida do antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona livre e encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*;
- e) Determinar *in vitro* a citotoxicidade do antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona livre e encapsulado nas nanopartículas lipídicas sólidas sobre macrófagos da linhagem J774.1.

CAPÍTULO 2

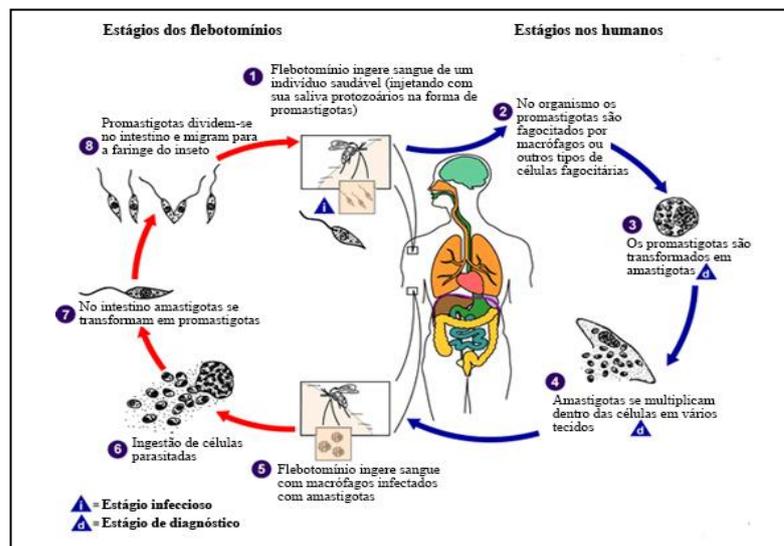
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses representam um conjunto de enfermidades originadas pela ação de mais de 20 variedades de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A propagação da leishmaniose ocorre por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, pequenos insetos vetores com 2–3 mm de comprimento (WHO, 2021).

O processo de transmissão segue o esquema ilustrado na Figura 1, começando quando as flebotomíneas, através de sua picada, injetam o estágio infeccioso (promastigotas) por meio de sua tromba (probóscide) (1). Os promastigotas que alcançam o local da picada são fagocitados por macrófagos (2) e outras células fagocíticas mononucleares. Dentro dessas células, os promastigotas se transformam no estágio tecidual do parasita (amastigotas) (3), os quais se reproduzem por divisão simples, continuando a contaminar outras células fagocíticas mononucleares (4). Ao se alimentarem de um hospedeiro infectado, as flebotomíneas adquirem a infecção pela ingestão de macrófagos contendo amastigotas (5, 6). Nas flebotomíneas, os amastigotas transformam-se em promastigotas, completam seu desenvolvimento no intestino (7) e migram para a probóscide (8) (CDC, 2020).

Figura 1 - Ciclo biológico da transmissão da leishmaniose



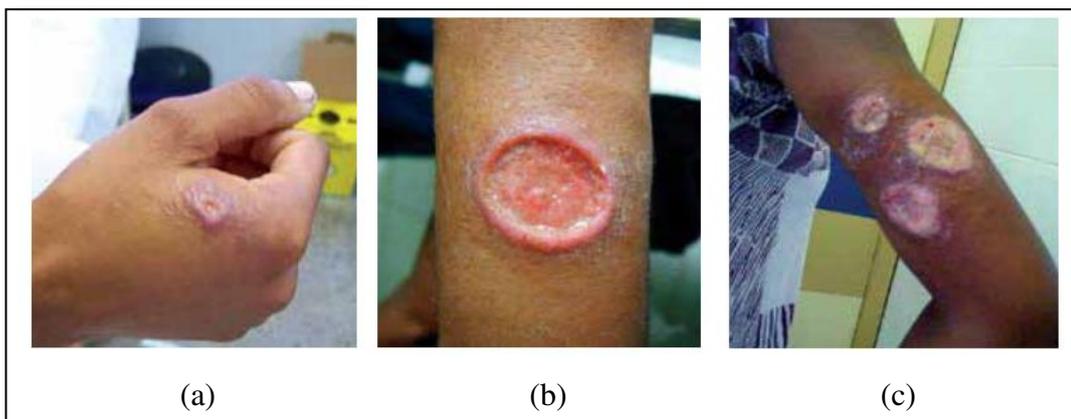
Fonte: Adaptado do CDC (2020)

Diferentes espécies de *Leishmania* estão associadas a diversas manifestações clínicas, variando a gravidade da doença. As três principais formas de variação incluem a leishmaniose tegumentar ou cutânea (LC), a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e a leishmaniose mucocutânea (LMC). A LC é a manifestação mais comum, enquanto a LV representa a forma mais grave, e a LMC é identificada como a variação mais incapacitante da doença. (WHO, 2021).

2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose tegumentar ou cutânea representa a forma mais comum, manifestando-se com lesões na pele no local da picada do inseto após várias semanas a meses. Em casos de múltiplas picadas, podem surgir lesões múltiplas ou disseminação metastática. A aparência da lesão pode variar, começando frequentemente como uma pápula que cresce gradualmente, ulcera no centro e forma uma borda eritematosa elevada, onde os parasitas intracelulares se concentram. Geralmente, as úlceras não causam dor e não apresentam sintomas sistêmicos, a menos que haja infecção secundária. Em geral, as lesões de leishmaniose cicatrizam espontaneamente ao longo de meses, mas podem persistir por anos, deixando uma cicatriz deprimida, semelhante a uma queimadura. A evolução da doença depende das espécies de *Leishmania* envolvidas e do estado imunológico do hospedeiro (PEARSON, 2020).

Figura 2 - Diferentes lesões da leishmaniose cutânea



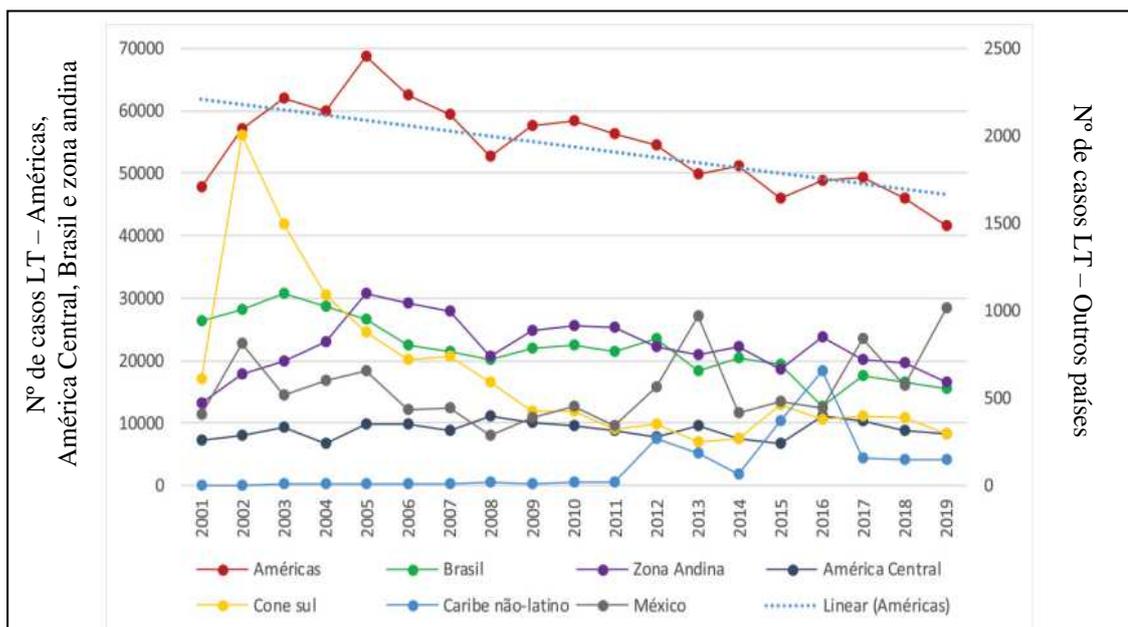
- (a) Lesão ulcerada franca, única, pequena, com bordas elevadas, infiltradas com hiperemia ao seu redor e fundo granuloso; (b) Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; (c) Lesões cutâneas múltiplas, ulceradas, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso com crosta.

Fonte: Brasil (2017)

Embora a leishmaniose tegumentar seja um fenômeno estudado há bastante tempo, ela continua a representar um desafio significativo para a saúde pública em 85 países, distribuídas por quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), registrando anualmente entre 0,7 e 1,3 milhão de novos casos. Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis doenças infecciosas mais importantes, a leishmaniose tegumentar destaca-se pelo seu elevado índice de detecção e pela capacidade de causar deformidades.

Conforme a Figura 3, aqui na região das Américas, entre os anos de 2001 a 2019, 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea (LC) foram notificados à OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde) por 17 dos 18 países endêmicos (com exceção da Guiana Francesa que continua a reportar dados diretamente para a França), com uma média de 54.108 casos por ano. Desde 2015, onde se registou o maior pico de número de casos (67.949), verifica-se uma tendência decrescente, atingindo em 2019 o menor número de casos (41.617), o que representa um decréscimo de 9% em relação ao ano anterior, dado pela redução do número de casos em 12 dos 17 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela). Por outro lado, cinco países (El Salvador, Guatemala, Honduras, México e Suriname) tiveram incremento dos casos, com destaque ao México e El Salvador com aumento de 76% e 360%, respectivamente (OPAS, 2020).

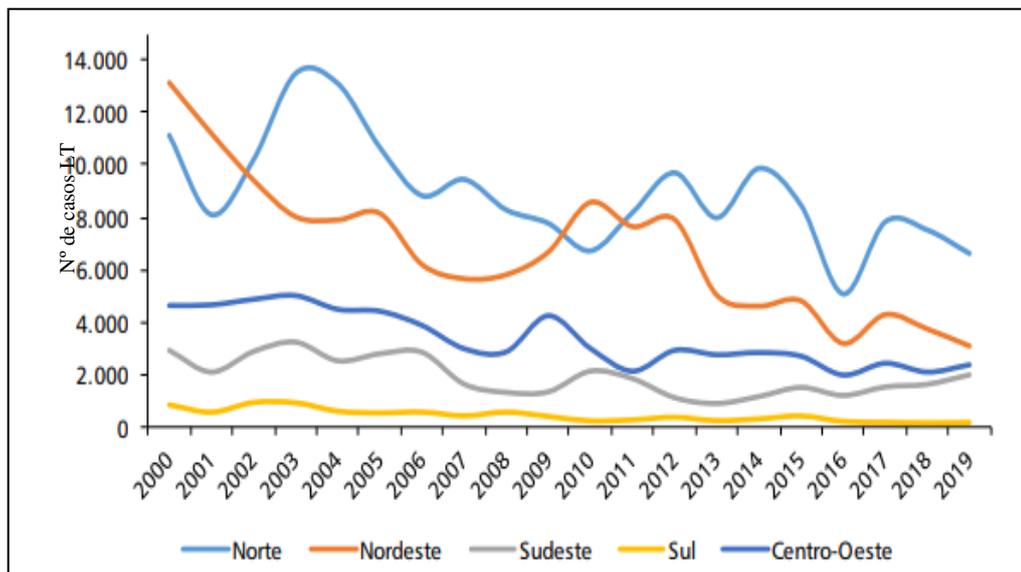
Figura 3 - Número de casos de leishmaniose cutânea, Região das Américas e sub-regiões, 2001-2020



Fonte: OPAS (2020)

De acordo a Secretaria de Vigilância em Saúde (2021), em 2019 foram confirmados 15.484 casos novos de LT no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes. Conforme a série histórica apresentada na Figura 4, a doença se distribui em todo o território brasileiro, com os maiores percentuais de casos registrados na região Norte (42,8%).

Figura 4 - Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção.
Brasil, 2000 a 2019



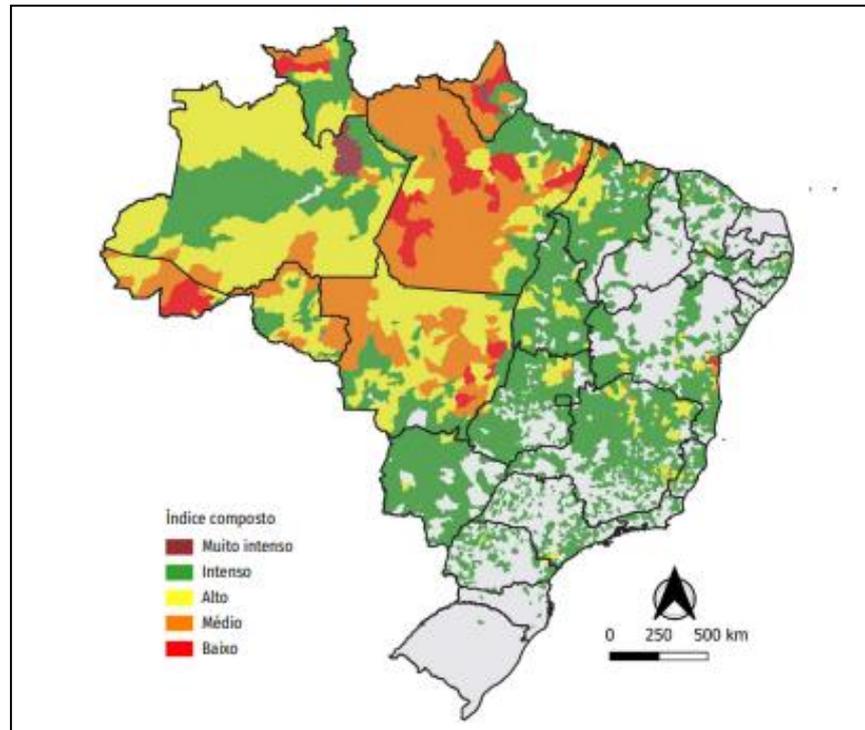
Fonte: Brasil (2021)

Além disso, conforme apresentado no boletim epidemiológico emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde no ano de 2021, ilustrado na figura 5, são minuciosamente delineadas as áreas de transmissão da leishmaniose em território brasileiro, subdivididas em cinco estratos distintos (muito intenso, intenso, alto, médio e baixo). Esse indicador fundamenta-se no número absoluto de casos novos e no coeficiente de detecção da doença nos últimos três anos, proporcionando uma análise abrangente da sua distribuição geográfica e intensidade.

Ao considerar a estratificação referente ao período entre 2017 e 2019, foram identificados municípios categorizados com transmissão muito intensa, destacando-se Rio Preto da Eva, Presidente Venceslau e Manaus, situados no estado do Amazonas; Serra do Navio, no estado do Amapá; e Teolândia, Valença, Venceslau Guimarães e Taperoá, localizados no estado da Bahia. Essa segmentação estratégica visa otimizar o direcionamento de recursos e a implementação de ações preventivas, fortalecendo a resposta eficiente contra a leishmaniose em áreas mais impactadas.

Figura 5 - Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção.

Brasil, 2017 a 2019



Fonte: Brasil (2021)

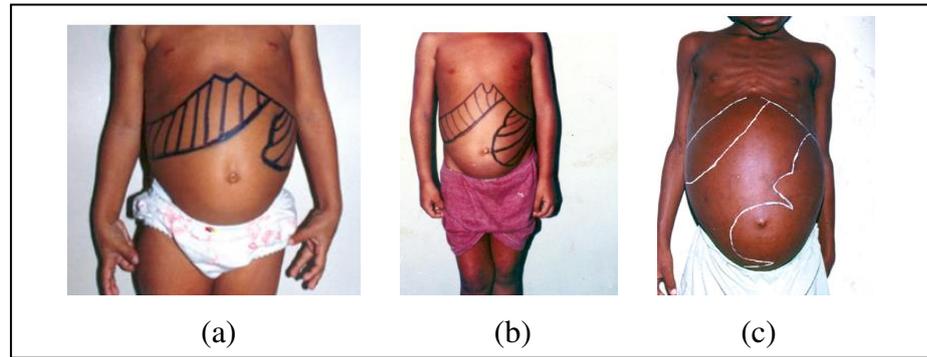
2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é a forma mais grave de leishmaniose também conhecida como calazar. Se o tratamento adequado não for iniciado em tempo hábil, pode evoluir para óbito em 90% dos casos (PAHO, 2021).

É uma doença sistêmica crônica que acomete principalmente crianças menores de cinco anos e suas manifestações clássicas incluem febre, esplenomegalia (inchaço do baço, manifestado na grande maioria dos pacientes), hepatomegalia (inchaço do fígado), palidez (causada por anemia grave), leucopenia (baixa contagem de glóbulos brancos) e perda de peso. Outros sinais e sintomas incluem problemas respiratórios ou distúrbios gastrointestinais (PAHO, 2021).

A LV é causada por duas espécies de *Leishmania*, *L. donovani* ou *L. infantum*, dependendo da área geográfica. *L. infantum* infecta principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos, enquanto *L. donovani* infecta todas as faixas etárias (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Figura 6 - Diferentes períodos de pacientes infectados por leishmaniose visceral

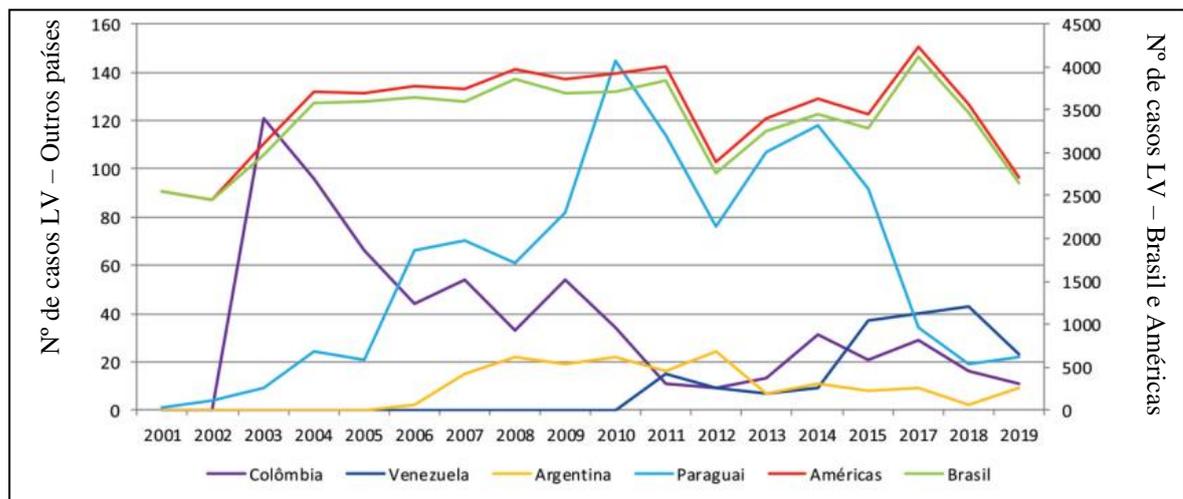


(a) Fase aguda; (b) Período de estado; (c) Período final

Fonte: Brasil (2014)

A prevalência da leishmaniose ocorre principalmente no Brasil, na África Oriental e na Índia. Estima-se que entre 50 e 90 mil casos novos de leishmaniose visceral surjam anualmente ao redor do mundo. No ano de 2020, mais de 90% dos registros recentes notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS) originaram-se em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (MSF, 2022).

Figura 7 - Número de casos de leishmaniose visceral com maior número de casos, Região das Américas, 2001-2019

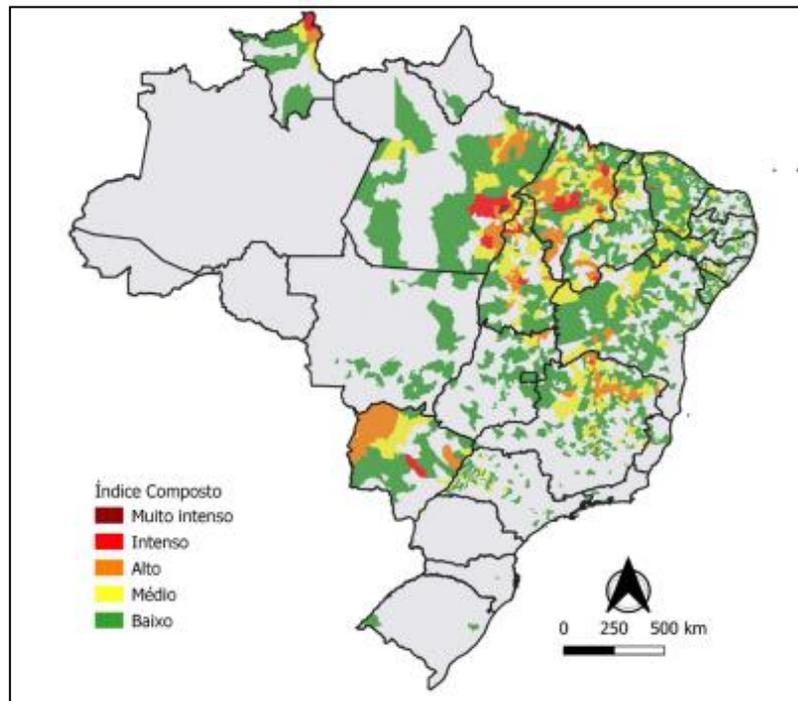


Fonte: OPAS (2020)

No Brasil, considerando a estratificação referente ao período de 2017 a 2019, o único município classificado com transmissão muito intensa para LV foi Eldorado dos Carajás, localizado no estado do Pará. Outros municípios do país, localizados nos estados de Roraima,

Pará, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, foram classificados com transmissão intensa (Figura 8).

Figura 8 - Estratificação de risco da leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019



Fonte: Brasil (2021)

2.4 TRATAMENTOS CONVENCIONAIS DAS LEISHMANIOSES

No momento o controle das leishmanioses se dá pelo uso de cinco medicamentos, no qual incluem antimoniais pentavalentes, anfotericina B e sua formulação lipossomal, miltefosina, paromomicina e pentamidina. Todas essas substâncias possuem atividade antileishmania, porém também estão associadas a problemas graves, como toxicidade, administração prolongada e possível surgimento de resistência do parasita (TIWARI *et al.*, 2018).

Atualmente, há duas formulações de antimoniais pentavalentes no mercado internacional, o antimoniato de meglumina e o estibugluconato de sódio. Essas substâncias são consideradas altamente eficazes e são a primeira linha de tratamento para a maioria das formas de *Leishmania*. Embora tenham sido relatados em diferentes regiões geográficas até 15% de resistência primária, elas permanecem como o fármaco mais tóxico para a maioria das espécies de *Leishmania* (UZUN, 2018).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico, foi aprovado pelo *US Food and Drug Administration* em 1965 devido à sua alta eficácia no tratamento de diversas infecções fúngicas disseminadas, como candidíase, aspergilose e criptococose. Além disso, também possui atividade potente contra o protozoário parasita *Leishmania.spp* (ZAIONCS; KHALIL; MAINARDES, 2017).

Embora o a anfotericina B seja um medicamento antimicótico e antileishmania altamente eficaz, seu uso é limitado devido à sua alta toxicidade, que pode causar sintomas clínicos nos pacientes, como alterações cardíacas, lesão hepática, náuseas, febre e nefrotoxicidade, que pode resultar em insuficiência renal. Nesse sentido, novas formulações de anfotericina B têm sido desenvolvidas, como lipossomas, emulsões e nanopartículas, que permitem a liberação controlada do fármaco na corrente sanguínea, reduzindo sua toxicidade e melhorando sua eficácia terapêutica. Embora seja recomendado pela OMS por sua alta eficácia e segurança, há um custo maior que limita o acesso do paciente ao tratamento (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Miltefosina é um análogo de fosfolípido sintético originalmente desenvolvido como um agente antineoplásico. Possui uma estrutura anfifílica, permitindo-lhe atravessar a membrana plasmática celular. Em 2002, a miltefosina foi aprovada para uso clínico na Índia, sendo o primeiro medicamento oral aprovado para o tratamento de leishmaniose visceral e cutânea. A miltefosina tem sido usada no tratamento da leishmaniose isoladamente ou em combinação com outras drogas antileishmania. Em geral, é um medicamento bem tolerado, mas já foram observados diversos efeitos colaterais (BRAGA, 2019).

A paromomicina é um aminoglicosídeo disponível em formulações parenterais e tópicas, e a forma tópica tem potencial para ser uma excelente opção em comparação com as aplicações parenterais e intralesionais. No entanto, o medicamento foi considerado menos eficaz ou ineficaz para algumas formas de LC (OZGOZTASI, 1997).

As pentamidinas fazem parte do grupo das diamidinas aromáticas, sendo uma opção para o tratamento da leishmaniose tegumentar em regiões endêmicas das Américas, Ásia e África. Embora seja considerado um medicamento de segunda linha, seu uso como agente leishmanicida é restrito devido aos seus efeitos adversos moderados e graves, que resultam em sua alta toxicidade. (OLIVEIRA, 2020).

Apesar dos tratamentos serem eficazes contra as leishmanioses, é bom lembrar que não existe um tratamento único considerado padrão ou ideal para cada tipo clínico. A resposta do

tratamento vai variar conforme a espécie do parasita, dosagem aplicada, estado do paciente, entre outros fatores ligados à doença.

Abaixo (Quadro 1) estão detalhados todos principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

Quadro 1 - Medicamentos convencionais para leishmaniose

Medicamento	Via de administração	Dose	EA	Vantagem	Desvantagem
Antimonial pentavalente	IM, IV e IL	20 mg/kg/dia por 28-30 dias	Cardiotoxicidade, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade	Fácil disponibilida de (em áreas endêmicas), baixo custo	Duração prolongada do tratamento, dor durante a injeção, EA tóxicos; resistência a droga
Anfotericina B	IV	0,75-1 mg/kg/dia por 15-20 dias, diariamente ou alternadamente diariamente	Toxicidade renal; reações relacionadas à injeção; hipocalêmia	A resistência primária não é comum;	Requer hospitalização para administração; nefrotoxicidade; aquecer; instabilidade
Anfotericina B lipossomal	IV	Dose única 3-5 mg/kg/dose; dose total de 10-30 mg/kg	Calafrios durante a injeção; nefrotoxicidade leve	Alta eficácia; baixa toxicidade	Alto custo; necessidade de infusão IV lenta
Miltefosine	Oral	100-150 mg/dia por 28 dias	EA GI; toxicidade renal e hepática; teratogenicidade	Eficaz	Alto custo; possivelmente teratogênico; resistência a droga; má conformidade
Paramomicina	IM (LV) ou tópico (LC)	15 mg/dia por 21 dias ou 20 mg/kg por 17 dias	Toxicidade renal, auditiva e hepática	Eficaz; relativamente barato	Eficácia variada de acordo com a área geográfica; potencial para resistência
Pentamidina	IM	3 mg/kg/dia, alternado diariamente para 4 injeções	Hiperglicemia; hipotensão; taquicardia; alteração eletrocardiográfica	Curso de curta duração necessário	Eficácia variada dependendo das espécies de <i>Leishmania</i>

EA – Efeito adverso; LV – Leishmaniose visceral; LC – Leishmaniose cutânea; GI – Gastrointestinal; IL –

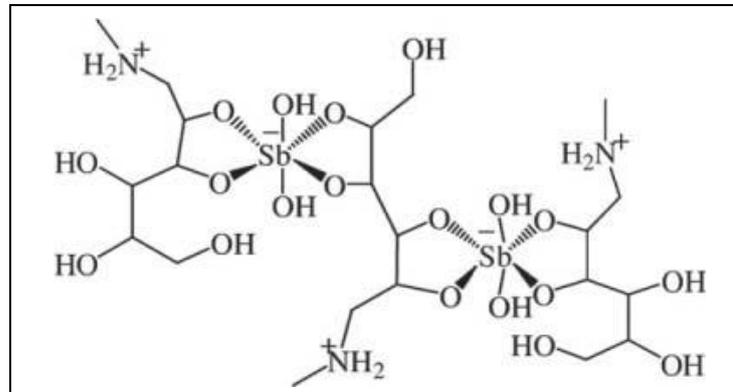
Intralesional; IM – Intramuscular; IV – Intravenoso. Fonte: Pradhan *et al.* (2021).

2.5 ANTIMONIATO DE MEGLUMINA

Disponível no Brasil desde a década de 1940, o antimoniato de meglumina continua sendo o único medicamento Sb(V) autorizado pelo Ministério da Saúde para uso no tratamento de primeira ou segunda linha contra todas as formas de leishmaniose.

O medicamento é apresentado comercialmente sob a forma de solução aquosa compreendendo complexos com a fórmula estrutural mostrada na Figura 9 (FRÉZARD *et al.*, 2013).

Figura 9 - Fórmula estrutural proposta para o antimoniato de meglumina em sua forma líquida comercial (Glucantime)



Fonte: Frézard *et al.* (2013)

Atualmente, o antimoniato de meglumina pertence exclusivamente a Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda comercializado pelo nome Glucantime® estando disponível no SUS - Sistema Único de Saúde (BULASMED, 2021; BRASIL, 2015).

O antimoniato de meglumina é comercializado em frascos de 5 ml, cada um contendo 1,5 g do antimoniato bruto, equivalente a 300 mg/mL, o que corresponde a 405 mg de Sb^{+5} . Portanto, uma ampola de 5 ml proporciona 405 mg de Sb^{+5} , resultando em uma concentração de 81 mg de Sb^{+5} por cada mililitro. Conforme orientado no manual de vigilância da leishmaniose tegumentar, o protocolo terapêutico para adultos e crianças varia de 10 a 20 mg $Sb(V)$ /kg/dia, administrados ao longo de 20 a 30 dias consecutivos, por via intravenosa (IV) ou intramuscular (IM). O tratamento pode ser repetido conforme necessário, dependendo do estado do paciente.

A forma de administração do antimoniato de meglumina representa uma grande desvantagem, pois é angustiante para a maioria dos pacientes, principalmente crianças, causa dor, reações locais e uma variedade de outros efeitos adversos em uma proporção significativa de pacientes, fatores que provavelmente são responsáveis pelo alto nível de não adesão ao tratamento (CARVALHO *et al.*, 2019). Os efeitos colaterais típicos incluem náuseas, vômitos, fraqueza e mialgia, cólica abdominal, diarreia, erupções cutâneas e hepatotoxicidade, juntamente com a cardiotoxicidade mais importante. O aparecimento de resistência aos medicamentos é outro problema importante no tratamento desta doença (BRASIL, 2017).

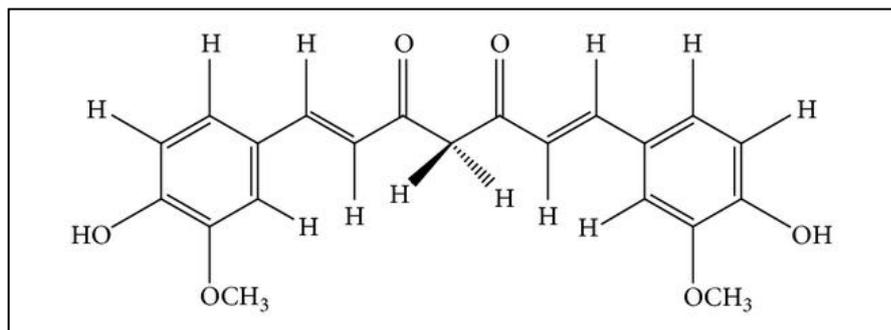
Diante dessas limitações, a OMS recomenda e apoia fortemente a pesquisa de novas alternativas de medicamentos e novas formas de aplicação contra a leishmaniose.

2.6 CURCUMINA

A *Curcuma longa L.*, conhecida como açafrão-da-terra, é uma planta rica em substâncias com propriedades farmacológicas sendo amplamente utilizada há séculos na medicina indígena para o tratamento de uma variedade de condições inflamatórias e outras doenças. Suas propriedades medicinais tem sido atribuída aos compostos fenólicos denominados curcuminóides, dentre tais a curcumina é o principal componente (AMMON; WAHL, 1991; JOE; VIJAYKUMAR; LOKESH, 2010).

Devido as diversas atividades biológicas, a curcumina (Figura 10) tem ganhado atenção em pesquisas em todo o mundo atraindo o interesse dos cientistas ao longo dos anos.

Figura 10 - Estrutura química da curcumina



Fonte: Moghadamtousi *et al.* (2014)

Diversos estudos antigos e recentes que demonstram que a curcumina possui propriedades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória (SATOSKAR; SHAH; SHENOY, 1986; FERGUSON; ABBOTT; GARG, 2021), anticancerígena (KUTTAN *et al.*, 1985; ZHENG *et al.*, 2021), antioxidante (TODA *et al.*, 1985; PONTES-QUERO *et al.*, 2021), cicatrização de feridas e efeitos antimicrobianos (SIDHU *et al.*, 1998; NEGI *et al.*, 1999; SALEHI *et al.*, 2021), sendo um assunto bastante difundido na literatura.

A curcumina também tem mostrado excelentes resultados como agente antiparasitário. Estudos realizados com o objetivo de avaliar o efeito da curcumina na infecção por *T. cruzi*, agente etiológico da doença de chagas, demonstraram que a curcumina inibiu a invasão do parasita. O tratamento com curcumina do *T. cruzi* em camundongos infectados reduziram a parasitemia e diminuíram o parasitismo do tecido cardíaco infectado. Isso foi associado a uma redução significativa na infiltração de macrófagos e inflamação no coração e no fígado; além disso, os camundongos infectados tratados com curcumina apresentaram uma taxa de

sobrevivência de 100% em contraste com a taxa de sobrevivência de 60% comumente observada em camundongos infectados não tratados (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012).

A curcumina também vem demonstrando atividade contra agentes causadores de leishmaniose de diferentes espécies desse parasita apresentando inibição do crescimento. Num estudo realizado por Saleheen *et al.* (2002) a curcumina foi submetida a diferentes cepas de leishmaniose, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania infantum*. A curcumina mostrou um IC50 médio de 5,3 microM contra promastigotas de várias cepas de leishmaniose, muito menor em comparação com a pentamidina, que é um dos tratamentos básicos contra a leishmaniose.

Outro estudo realizado com a curcumina e seus derivados demonstraram que houve inibição do crescimento para cada concentração dos agentes de teste. Os valores de IC50 para curcumina, curcumina de gálio, curcumina de índio, curcumina diacetileno foram 38 µg/ml, 32 µg/ml, 26 µg/ml e 52 µg/ml, respectivamente. A curcumina índia com valores de IC50 de 26 µg/ml foi mais eficaz do que outros três agentes de teste contra *Leishmania*. A droga de controle foi utilizada a anfotericina B, no qual apresentou inibição média de 20 µg/ml (FOULADVAND; BARAZEZ; TAHMASEBI, 2013).

Sendo assim, a curcumina e seus derivados apresentam diferentes atividades biológicas. Esse conjunto de resultados estudados fazem da curcumina uma excelente substância para o desenvolvimento de novas alternativas no tratamento de diferentes enfermidades.

2.7 4-NITROCHALCONA

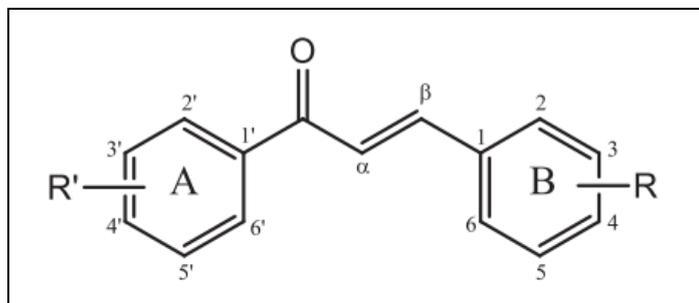
As chalconas são substâncias flavonóides abundantes em frutas, vegetais, chás, especiarias e muitas vezes importantes na pigmentação das flores (BATOVSKA; TODOROVA, 2010; MARINOV *et al.*, 2020).

Estruturalmente, as chalconas são compostos aromáticos (1,3-difenil-2-propen-1-ona), nos quais dois anéis aromáticos estão ligados por um sistema de três carbonos, um grupo carbonila e um α,β -insaturado (AHMED *et al.*, 2011).

É fato que as chalconas são utilizadas na medicina a séculos e além disso muitas pesquisas demonstraram que as chalconas e seus derivados possuem uma ampla variedade de bioatividade, incluindo atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antidiabéticas,

antitumoral, antioxidantes, antiparasitária, antiviral, antimicrobianas, entre outras (BATOVSKA; TODOROVA, 2010; ZHOU; XING, 2015).

Figura 11 - Estrutura básica das chalconas



Fonte: Marinov *et al.* (2020)

Em relação a 4-nitrochalcona, fármaco utilizado neste trabalho, alguns estudos foram descritos na literatura sobre sua bioatividade. Cordeiro *et al.* (2021) preparou nanopartículas de cera de abelha encapsulando dietilditiocarbamato de sódio e 4-nitrochalcona a fim de avaliar *in vitro* sua atividade biológica em células de melanoma. Seus resultados demonstraram que quando os fármacos estão na forma livre e encapsulados separadamente o IC₅₀ menor comparando com as nanopartículas contendo dietilditiocarbamato de sódio e 4-nitrochalcona demonstrando um efeito terapêutico sinérgico.

Assolini *et al.* (2020) testaram a atividade antiparasitária *in vitro* da 4-nitrochalcona livre sobre promastigotas e da 4-nitrochalcona encapsulada em cera de abelha sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*. De acordo com os resultados a 4-nitrochalcona livre mostrou efeito anti-promastigota e a encapsulada mostrou efeito nos macrófagos infectados.

2.8 NANOTECNOLOGIA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem sido fundamental no avanço do tratamento de doenças com foco em desenvolver novos sistemas para melhorar a entrega de agentes terapêuticos, conhecidos como nanocarreadores. Esse campo de estudo tem sido destacado no desenvolvimento de medicamentos inovadores por apresentar terapias mais promissoras e melhorar as propriedades farmacocinéticas (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

Os sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia avançaram de forma a aumentar a eficiência dos medicamentos, tal como diminuir a toxicidade, melhorar a excreção,

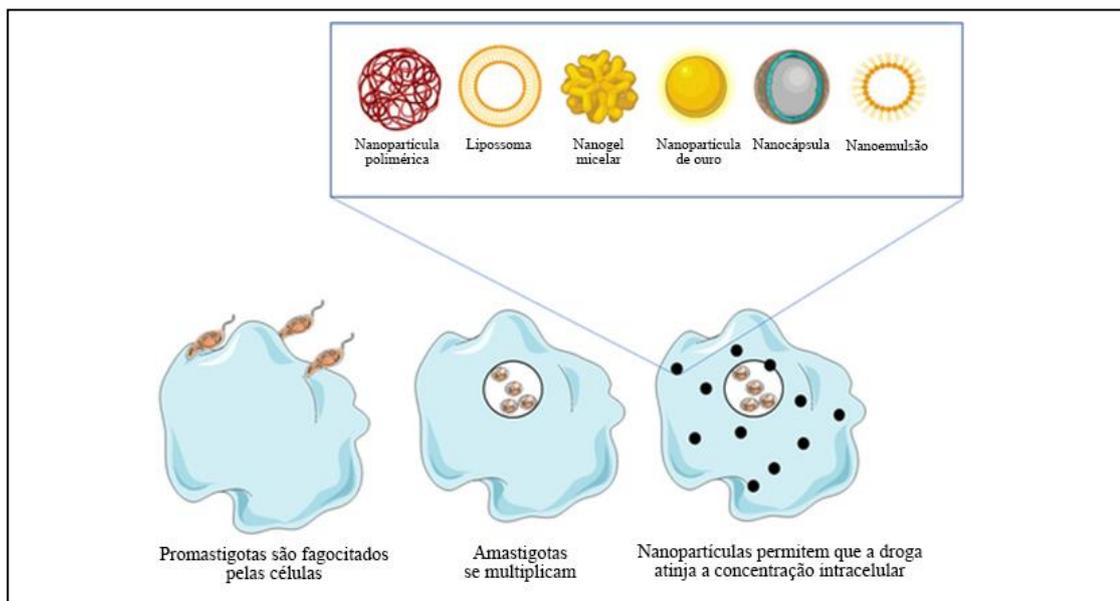
absorção e distribuição dos medicamentos, além disso, é possível direcionar os fármacos para células específicas e controlar sua liberação (FARAJI; WIPF, 2009).

Sendo assim, foram desenvolvidos diferentes tipos de nanocarreadores, como carreadores lipídicos nanoestruturados, lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, niossomas, nanocápsulas, nanoesferas metálicas, nanopartículas poliméricas, entre outros sistemas estudados, tudo para desencadear uma liberação eficiente de drogas para o tratamento de diversas doenças (ROATT *et al.*, 2020).

Em se tratando da leishmaniose, nos últimos anos os nanocarreadores foram muito estudados para melhorar a entrega de agentes terapêuticos antileishmania. Diversas foram as estratégias de nanocarreadores utilizadas no tratamento, em que foi demonstrado vantagens e desvantagens (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Como se sabe através das pesquisas, os parasitas de *Leishmania* infectam exclusivamente as células fagocitárias (macrófagos). Os nanocarreadores carregados de drogas ao entrar no corpo sofrem fagocitose pelos macrófagos, os quais liberam a droga agindo diretamente sobre os parasitas. Isso permite que as drogas atinjam uma concentração intracelular eficaz, juntamente com uma redução na toxicidade e dosagem da droga (ROATT *et al.*, 2020).

Figura 12 - Representação esquemática da ação de alguns tipos de nanocarreadores empregadas em macrófagos infectados por *Leishmania*



Fonte: Oliveira *et al.* (2020)

Apesar dos vários tipos de nanocarreadores existentes, os mais estudados contra a leishmaniose são os lipossomas e as nanopartículas poliméricas, devido à rápida e fácil internalização por parte dos macrófagos. Os lipossomas apresentam propriedades únicas, são capazes de carregar e entregar drogas hidrofóbicas e hidrofílicas por funcionalização de superfície. Porém, podem apresentar algumas limitações, como a instabilidade e toxicidade uma vez que o fármaco pode vazar para a corrente sanguínea (SALEEM *et al.*, 2019).

As nanopartículas poliméricas superam algumas limitações dos lipossomas oferecendo tamanho reduzido, baixa toxicidade e custo acessível para a liberação eficiente de vários medicamentos. Destacam-se pela capacidade de criar sistemas biodegradáveis, funcionalizar superfícies e apresentam maior estabilidade, evitando o vazamento de drogas na corrente sanguínea, ao contrário dos lipossomas. (SALEEM *et al.*, 2019).

A nanoemulsão é destacada como um excelente sistema de liberação de drogas devido à sua preparação simples, capacidade de solubilizar drogas hidrofóbicas e estabilidade físico-química de longa duração, permitindo produção em larga escala (BILIA *et al.*, 2014).

Outro sistema que vem se destacando são as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). As NLS são constituídas por lipídios sólidos tanto na temperatura ambiente quanto na corporal. Seu sistema tem a capacidade de preservar drogas encapsuladas contra instabilidade química e fornecer padrões de liberação controlada quando comparado com as nanoemulsões. As NLS fornecem estabilidade por um longo período de tempo em comparação com lipossomas. Com excipientes seguros, sua ampla aplicação (dérmica, oral, pulmonar, intravenosa) minimiza a citotoxicidade, diferenciando-se das nanopartículas poliméricas (BAHARI; HAMISHEHKAR, 2016). Apesar das vantagens, há desvantagens como crescimento de partículas, tendência imprevisível de gelificação, transições polimórficas e capacidades de incorporação inerentemente baixas devido à estrutura cristalina do lipídio sólido (LÓPEZ-GARCÍA; GANEM-RONDERO, 2015; NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015).

Mais tarde foi introduzido os sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), sistemas desenvolvidos como a segunda geração das NLS. Diferentemente das NLS, os CLN consistem em uma matriz lipídica sólida e líquida à temperatura ambiente, visando melhorar possíveis limitações das NLS. Esses sistemas aprimoram a estabilidade, capacidade de carga e previnem a expulsão da droga armazenada nas nanopartículas, uma desvantagem observada nas NLS (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015; COLA *et al.*, 2016).

No Quadro 2 apresenta alguns estudos que abordam o tratamento da leishmaniose com base na nanotecnologia utilizando os principais sistemas carreadores com os agentes terapêuticos utilizados nesse estudo.

Quadro 2 - Alguns estudos utilizando nanopartículas no tratamento da leishmaniose com a curcumina, antimoniato de meglumina e 4-nitrochalcona

Fármaco	Objetivo	Resultados principais	Referência
Antimoniato de Meglumina	Preparar nanopartículas poliméricas de poliprolactona contendo AM para o tratamento da leishmaniose	O tamanho das nanopartículas ficou entre 150 e 200 nm. Testes foram feitos em camundongos BALB/c infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> . Para <i>L. amazonensis</i> os resultados mostraram baixa captação pela lesão indicando melhor eficácia para <i>L. infantum</i> , no entanto uma aplicação mais adequada do que a injeção retro-orbital poderia melhorar a eficiência, como uma formulação tópica.	Souza-Batista et al. (2019)
Antimoniato de Meglumina	Desenvolver e caracterizar nanocarreadores coloidais poliméricos de maltodextrina para tratamento tópico de LC.	Apresentaram alta EE (87 a 92%), Dp entre 245,8 e 272,3 nm e relativamente baixo PDI (0,163 a 0,195). Teste feitos em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> . A aplicação tópica dos nanocarreadores coloidais poliméricos apresentaram eficiência semelhante a injeção do medicamento de referência (Glucantime®). As doses utilizadas foram 20 mg/Kg/dia para o Glucantime e 100 µL da suspensão do nanocarreador na área da infecção sendo uma vez por semana durante cinco semanas.	Horoiwa et al. (2020)
Antimoniato de Meglumina	Preparar uma formulação tópica lipossomal de antimoniato de meglumina com e sem ácido oleico e avaliar os efeitos terapêuticos em camundongos BALB/c infectados por <i>Leishmania major</i>	Os lipossomas tiveram EE de 55%, tamanho médio entre 100 nm com PDI de 0,392 a 0,383. Nos estudos <i>in vitro</i> a dose efetiva de 50% do lipossoma de antimoniato com e sem ácido oleico contra amastigotas de <i>L. major</i> foi de 46,36 e 41,01 µg/ml respectivamente. Nos testes <i>in vivo</i> os resultados mostraram que o tamanho da lesão ficou significativamente menor em comparação aos grupos de controle que receberam lipossomas vazios.	Kalat et al. (2014)
Antimoniato de Meglumina	Foi desenvolvido lipossomas de MA encapsulada em fosfatidilserina e analisado a atividade antileishmania <i>in vitro</i> , propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético em camundongo	A formulação lipossomal tinha um diâmetro interno médio de 114 nm e uma alta estabilidade no plasma e EE de 14,7% em média. A formulação foi 23 vezes mais eficaz <i>in vitro</i> contra macrófagos infectados por <i>Leishmania infantum</i> do que a droga livre, apresentando IC50 de 2,65 µg/mL e 60,28 µg/mL, respectivamente.	Borborema et al. (2018) .
Antimoniato de Meglumina	Avaliar a atividade do antimoniato de meglumina encapsulado em lipossomas de estearilamina contra a leishmaniose cutânea	O tamanho dos lipossomas ficou entre 139 e 760 nm com PDI entre 0,25 e 0,72, os valores variaram devido ao aumento da concentração da estearilamina. A EE variou entre 43 e 51%. Os resultados dos ensaios de promastigotas e amastigotas de <i>L. major</i> mostraram toxicidade significativamente aumentada nos lipossomas contendo AM e SA em comparação com lipossoma somente com AM. No modelo de camundongos BALB/c de leishmaniose cutânea, os grupos lipossomais exibiram tamanho de lesão significativamente menor em comparação aos grupos controle	Moosavian; Fallah; Jaafari (2019)

Antimoniato de Meglumina	Desenvolver e caracterizar nanocápsulas de poli-l-lactídeo (PLA) de núcleo aquoso contendo AM com o objetivo de aumentar a eficácia farmacológica do composto ativo	Os sistemas poliméricos apresentaram diâmetro médio de 300 nm. As nanocápsulas de PLA carregadas com AM mostraram uma grande atividade antileishmania em camundongos infectados com <i>L. infantum</i> em relação ao fármaco livre, favorecendo a diminuição dos tempos de administração, ambos sendo aplicados na concentração de 20 mg/kg.	Cosco et al. (2021)
Antimoniato de Meglumina	Encapsular o AM na albumina como carreador de drogas e avaliar o efeito antileishmania das nanopartículas preparadas	A citotoxicidade e a inibição de drogas foram avaliadas em macrófagos J774 e promastigotas de <i>L. major</i> . A maior atividade antileishmania foi observada nas nanopartículas preparadas com glutaraldeído (10 µl/ml) com IC50 de 8,35 µg/mL. Além disso, essa formulação apresentou melhor condição em termos de morfologia e tamanho.	Barazesh et al. (2018)
Curcumina	Formular e otimizar nanopartículas de quitosana manossilada de curcumina direcionadas a macrófagos para melhorar seu potencial terapêutico no tratamento da leishmaniose visceral	O tamanho das nanopartículas foi 215 nm, índice de polidispersidade 0,381, potencial zeta de + 24,37 mV e eficiência de encapsulação de 82,12%. O estudo de captação <i>in vivo</i> indicou que a endocitose ocorreu efetivamente dentro dos macrófagos do sistema reticuloendotelial.	Chaubey; Patel; Mishra (2014)
Curcumina	Sintetizar, caracterizar e avaliar a eficácia antileishmania de uma formulação de curcumina encapsulada em polímero e curcumina combinada com miltefosina	O tamanho médio e a carga das nanopartículas de curcumina foram de 182,3 nm e -12,7 ± 0,141 mV, respectivamente, e o PdI foi de 0,281. A EE foi de 93,27%. Nos testes <i>in vitro</i> as NP de curcumina exibiram IC50 de 1,34 e 1,61 µg/ml para promastigotas e amastigotas, respectivamente. Combinando os fármacos houve efeito sinérgico. A curcumina encapsulada sozinha exibiu 71% de inibição da carga parasitária, enquanto a miltefosina mostrou 55% e a combinação (nanocurcumina e miltefosina) mostraram 85% de inibição parasitária.	Tiwari et al. (2017)
Curcumina	Formular e avaliar sistemas de liberação de drogas autoemulsificantes carregados com curcumina para aplicação tópica em leishmaniose cutânea e mucocutânea	Foram desenvolvidas duas formulações e ambas apresentaram potencial antileishmania, a formulação A exibiu IC50 de 0,13 µg/ml e 0,25 µg/ml contra promastigota e amastigota, respectivamente, enquanto os valores de IC50 da formulação B foram 0,18 µg/ml e 0,27 µg/ml contra promastigota e amastigota, respectivamente.	Khan et al. (2018)
Curcumina	Sintetizar e caracterizar lipossomas contendo curcumina contra <i>L. major</i>	A curcumina foi carregada com sucesso em nanolipossomas com uma eficiência de encapsulamento de 92%. A carga superficial da nanopartícula era neutra e o tamanho da nanopartícula era de 176,5 nm. A concentração inibitória de curcumina nanolipossomal (IC50) nas horas 24, 48 e 72 foi de 6,41, 3,8 e 2,33 µg/mL, respectivamente. A curcumina nanolipossomal preparada mostrou um efeito antileishmania significativo e induziu um efeito melhor e mais tangível na sobrevivência de promastigotas de <i>L. major</i> .	Bafghi et al. (2021)

Curcumina	Sintetizar carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) carregados com curcumina para o tratamento da leishmaniose cutânea	Os CLNs preparados foram caracterizados quanto ao tamanho de partícula ($312 \pm 1,89$ nm), eficiência de encapsulamento ($88 \pm 2,45\%$), potencial zeta ($-38 \pm 0,93$ mV) e Índice de polidispersidade ($0,305 \pm 0,17$). Os testes <i>in vitro</i> das CLNs contra promastigotas e células semelhantes a amastigotas axênicas (AALCs) demonstrou IC50 de $105\mu\text{g/ml}$ e $190\mu\text{g/ml}$, respectivamente, em comparação com a solução de curcumina simples, com valores IC50 de $165\mu\text{g/ml}$ e $243\mu\text{g/ml}$ contra promastigotas e AALCs, respectivamente. Os resultados sugeriram que a aplicação tópica de NLCs carregados com drogas pode levar à entrega direcionada de drogas antileishmania ao local de ação, ou seja, macrófagos infectados que residem em camadas mais profundas da pele.	Riaz et al. (2019)
Curcumina	Sintetizar e otimizar nanopartículas de quitosana funcionalizadas com manose carregadas de curcumina (Cur-MCN) que superam as limitações das drogas para atingir os locais intracelulares e estabelecer seu potencial terapêutico na leishmaniose visceral	A atividade antileishmania <i>in vivo</i> em hamsters mostrou uma supressão significativamente maior da replicação do parasita no baço com Cur-MCN do que nanopartículas de quitosana não conjugadas. O estudo de citotoxicidade <i>in vitro</i> contra a linhagem celular testada demonstrou sua não toxicidade comparativa em relação às células macrofágicas. O potencial de Cur-MCN também foi confirmado pela citotoxicidade mínima observada nos estudos <i>in vivo</i>	Chaubey et al. (2018)
4-nitrochalcona	Avaliar a atividade <i>in vitro</i> da 4-nitrochalcona livre e encapsulada em promastigotas e macrófagos infectados investigando os possíveis mecanismos de ação possivelmente envolvidos	Os resultados demonstraram que a 4-nitrochalcona causa alterações morfológicas e bioquímicas em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , levando à morte por mecanismo de apoptose. A 4-nitrochalcona encapsulada foi capaz de ativar o mecanismos dos macrófagos para reduzir amastigotas intracelulares, aumentando mediadores pró-inflamatórios e mediadores microbicidas. Além disso, o fármaco encapsulado reduziu os efeitos tóxicos do fármaco livre em macrófagos murinos e melhorou significativamente o índice de seletividade <i>in vitro</i>	Assolini et al. (2020)
4-nitrochalcona	Encapsular simultaneamente dietilditiocarbamato de sódio (DETC) e 4-nitrochalcona (4NC), em nanopartículas de cera de abelha (BNs) a fim de avaliar a atividade sinérgica <i>in vitro</i> contra células de melanoma (B16F10)	A técnica de dupla emulsão mostrou-se eficaz para o encapsulamento simultâneo de DETC e 4NC com eficiências de 86,2% e 98,7%. DETC e 4NC carregados em BNs exibiram uma maior citotoxicidade para células B16F10 do que 4NC e DETC livres. Este encapsulamento simultâneo levou a um efeito sinérgico de DETC e 4NC nas células B16F10, diminuindo a viabilidade celular de 46% (DETC BNs) e 54% (4NC BNs) para 64% (DETC+4NC BNs). Esta combinação demonstrou ser capaz de gerar um efeito terapêutico sinérgico <i>in vitro</i> em células B16F10.	Cordeiro et al. (2021)

Fonte: Autor (2024)

2.9 CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS VIA DUPLA EMULSÃO

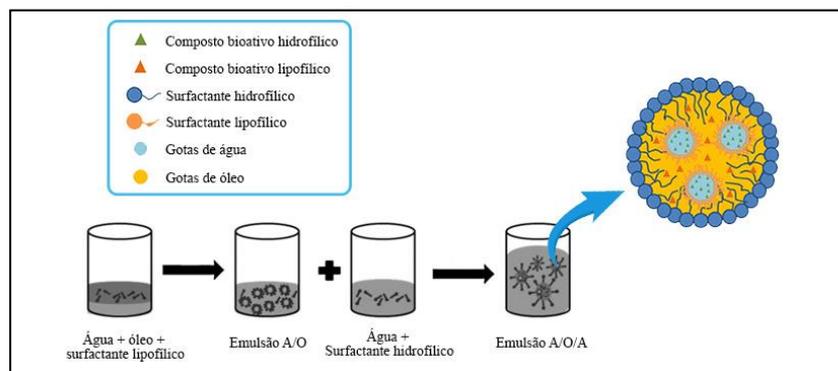
Atualmente os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) vem sendo desenvolvidos como uma alternativa às nanopartículas poliméricas, lipossomas e emulsões. Além disso, os carreadores lipídicos nanoestruturados são os transportadores lipídicos da segunda geração desenvolvidos para superar os problemas associados às nanopartículas lipídicas sólidas (SALVI; PAWAR, 2019).

Devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, facilidade de preparação e aumento de escala e alta estabilidade, os CLNs têm sido explorados em inúmeras abordagens terapêuticas. Para preparar os CLN existe diversas técnicas relatadas na literatura, que inclui homogeneização de alta pressão, microemulsão, sonicação de sonda, difusão de solvente, emulsificação-evaporação de solvente, injeção de solvente, inversão de fase e dupla emulsão (GOMAA *et al.*, 2021). Apesar dos diferentes métodos será apresentado a descrição detalhada do método de dupla emulsão que é técnica utilizado nesse trabalho.

Comumente as emulsões duplas podem ser classificadas em dois tipos: emulsões água/óleo/água (A/O/A) e emulsões óleo/água/óleo (O/A/O). Porém, as emulsões A/O/A são as mais utilizadas no campo farmacêutico (QI; WANG; ZHU, 2010).

O método consiste em primeiramente dissolver o fármaco hidrofílico em solvente aquoso (fase aquosa interna), e em seguida dispersar na fase lipídica (lipídio fundido + lipídio líquido + tensoativo lipofílico) para produzir a emulsão primário, emulsão A/O. Em seguida, a emulsão primária é dispersa em um grande volume de solução aquosa de surfactante seguida de sonicação para formar uma emulsão dupla (A/O/A). As nanopartículas lipídicas são então purificadas por ultrafiltração ou evaporação do solvente (CHAUHAN *et al.*, 2020).

Figura 13 - Esquema de preparação da dupla emulsão (A/O/A)



Fonte: Adaptado de Rao; Geckeler (2011) e Salvia-Trujillo *et al.* (2018)

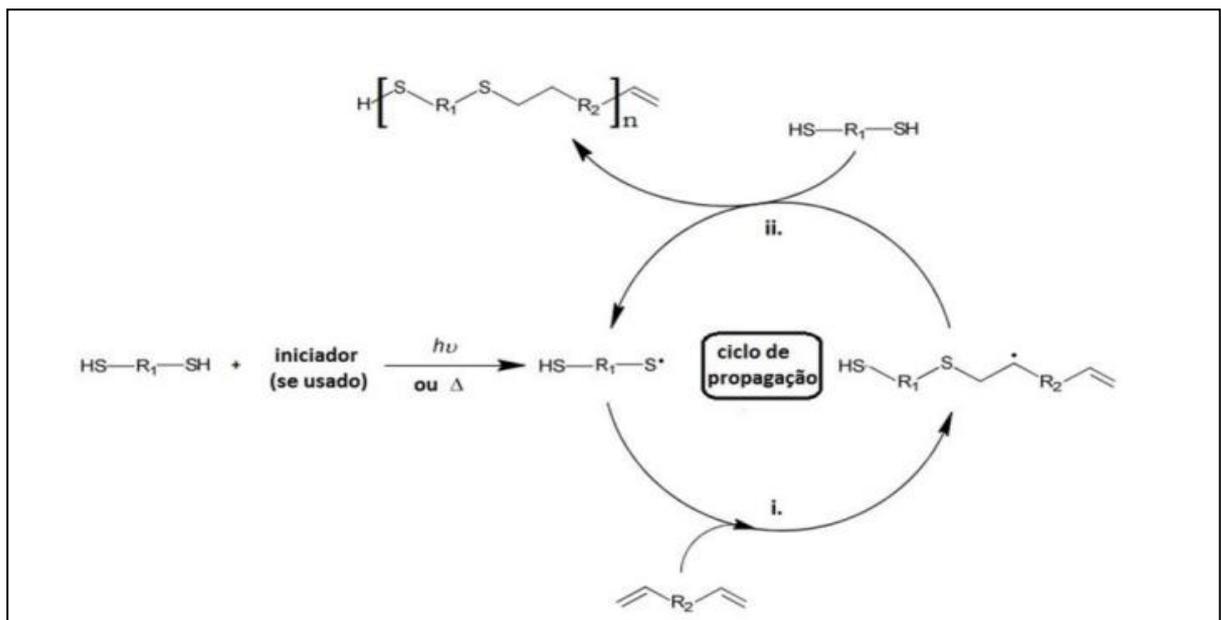
Resumidamente, temos na emulsão dupla gotículas de água dentro da fase oleosa sendo a fase oleosa estabilizada pelo surfactante hidrofílico (alto HLB, *hydrophilic lipophilic balance*) e a fase aquosa pelo surfactante lipofílico (baixo HLB). A estrutura originada na emulsão dupla apresenta vantagens de encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos simultaneamente, onde os compostos hidrofílicos ficam na fase aquosa interna e os lipofílicos na fase oleosa (SALVIA-TRUJILLO *et al.*, 2018).

2.10 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS VIA TIOL-ENO

As polimerizações tiol-eno são reações químicas que ocorrem via radicais livres. Muitas vezes as polimerizações tiol-eno são consideradas uma reação do tipo “*click*”, pois podem ser realizadas em condições suaves e normalmente fornecem alto rendimento e geração de subprodutos inofensivos (MACHADO; SAYER; ARAÚJO, 2017). Além disso, os polímeros desenvolvidos por esta reação única demonstram excelente desempenho, incluindo menor encolhimento e estrutura de reticulação uniforme (XUE *et al.*, 2021).

Geralmente, a reação tiol-eno são induzidas fotoquimicamente. Sob tais condições, ela prossegue por meio de um processo típico em cadeia com etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 14).

Figura 14 - Mecanismo de polimerização de crescimento em etapas de tiol-eno



Fonte: Machado; Sayer; Araújo (2017)

A iniciação envolve o tratamento de um tiol com fotoiniciador, sob irradiação, resultando na formação de um radical tiil, porém a simples energia térmica também pode gerar radicais tiil. A propagação é um processo de duas etapas envolvendo primeiro a adição direta do radical tiil a ligação dupla do grupo eno produzindo um radical intermediário no carbono central da cadeia seguido pela transferência da cadeia para uma segunda molécula de tiol para dar o produto de adição tiol-eno com a geração concomitante de um novo radical tiil reiniciando o ciclo. Possíveis reações de terminação envolvem processos típicos de acoplamento radical-radical (LOWE, 2010).

Devido às suas múltiplas vantagens, a polimerização do tiol-eno vem ganhando grande importância no campo científico e tecnológico com interesse crescente no desenvolvimento de biomateriais visando aplicações em sistemas de administração de fármacos, engenharia de tecidos e para tratar de questões ambientais devido às suas características não tóxicas, biodegradabilidade e propriedades adesivas (ORTIZ *et al.*, 2009).

Nesse contexto são relatados na literatura diversas contribuições apresentando a polimerização tiol-eno como uma ferramenta na síntese de micro e nanopartículas poliméricas como alternativa em sistemas de liberação de fármacos.

Zou *et al.* (2011) obtiveram nanopartículas e nanocápsulas biodegradáveis por reticulação de tiol-eno induzida por UV de polímeros precursores à base de polilactídeo (PLA) pré-montados em miniemulsões transparentes. As nanopartículas apresentaram alto potencial de aplicabilidade como biomaterial devido ao seu rápido comportamento de degradação confirmando a biocompatibilidade das nanopartículas.

Amato *et al.* (2015) também realizaram a síntese de nanopartículas via fotopolimerização tiol-eno em miniemulsão usando homogeneização de alta pressão. No trabalho os autores avaliaram os efeitos na formulação conforme diferentes parâmetros. Como resultado foram obtidas nanopartículas com tamanho médio de 46 nm, além do esforço em demonstrar o potencial do uso das nanopartículas via polimerização tiol-eno, os autores exploraram o mecanismo radical de crescimento gradual da fotopolimerização de tiol-eno sob condições não estequiométricas para fabricar nanopartículas funcionais que expressam excesso de tiol ou alceno na superfície da partícula.

Machado *et al.* (2017) realizaram a síntese e caracterização de nanopartículas de poli(tioéter-éster) via polimerização em miniemulsão de tiol-eno usando um monômero α,ω -dieno-diéster de base biológica, chamado dianidro- d -glicetil diundec-10-enoato. A cumarina foi encapsulada nas nanopartículas poliméricas com alta eficiência, no foi feita aplicação biomédica das nanopartículas as quais apresentaram biocompatibilidade em células de

fibroblastos murinos (L929) e de câncer de cólon uterino sugerindo potencial uso no tratamento do câncer de cólon uterino.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. R. *et al.* **Synthesis and cytotoxic, antioxidante activites of new chalcone derivatives.** Rasayan Journal of Chemistry. Vol. 4 (2), p. 289-294, 2011.

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. **Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review.** Acta Tropica. Vol. 172, p. 86-90, 2017.

AMATO, D. V. *et al.* **Functional, sub-100 nm polymer nanoparticles via thiol-ene miniemulsion photopolymerization.** Polymer Chemistry. Vol. 6 (31), p. 5625-5632, 2015.

AMMON, H. P. T.; WAHL, M. A. **Pharmacology of Curcuma longa.** Planta Medica. Vol. 57, 1991.

ASSOLINI, J. P. *et al.* **4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity.** European Journal of Pharmacology. Vol. 884, 2020.

ASSOLINI, J. P. *et al.* **Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview.** European Journal of Pharmacology. Vol. 923, 2022.

BAFGHI, A. F. *et al.* **A novel delivery of curcumin by the efficient nanoliposomal approach against *Leishmania major*.** Preparative Biochemistry & Biotechnology. Vol. 51 (10), p. 990-997, 2021.

BAHARI, L. A. S.; HAMISHEHKAR, H. **The Impact of Variables on Particle Size of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers; A Comparative Literature Review.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 6 (2), p. 143-151, 2016.

BARAZESH, A. *et al.* **Preparation of meglumine antimonate loaded albumin nanoparticles and evaluation of its anti-leishmanial activity: an *in vitro* assay.** *Journal of Parasitic Diseases*. Vol. 42, p. 416–422, 2018.

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. **Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones.** *Current Clinical Pharmacology*. Vol. 5 (1), p. 1-29, 2010.

BELLETTI, D. *et al.* **Chemico-physical investigation of tenofovir loaded polymeric nanoparticles.** *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 436 (1-2), p. 753-763, 2012.

BILIA, A. R. *et al.* **Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach.** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicin*. 2014.

BORBOREMA, S. E. T. *et al.* **Pharmacokinetic of meglumine antimoniate encapsulated in phosphatidylserine-liposomes in mice model: A candidate formulation for visceral leishmaniasis.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol. 103, p. 1609-1616, 2018.

BRAGA, S. S. **Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 183, 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico – Doenças tropicais negligenciadas.** Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília, N° especial, 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar.** Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica N° 233/2013 – Antimoniato de Meglumina**. Brasília, 2015.

BULASMED. **Bulas de medicamento – Glucantime**, 2021. Disponível em: < <https://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/2792/glucantime.htm>>. Acesso em: 02/02/2022.

CARVALHO, S. H. *et al.* **American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment**. Tropical Medicine and International Health. Vol. 24 (4), p. 380-391, 2019.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Leishmaniasis - Biology**, 2020. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em 29/11/2021.

CHAPPUIS, F. *et al.* **Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?**. Nature Reviews Microbiology. Vol. 5, p. 837-882, 2007.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. **A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis**. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 416 (1-2), p. 7-12, 2011.

CHAUBEY, P. *et al.* **Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against Leishmania donovani**. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 111, p. 109-120, 2018.

CHAUBEY, P.; PATEL, R. R.; MISHRA, B. **Development and optimization of curcumin-loaded mannosylated chitosan nanoparticles using response surface methodology in the treatment of visceral leishmaniasis**. Expert Opinion on Drug Delivery. Vol. 11 (8), p. 1163-1181, 2014.

CHAUHAN, I. *et al.* **Nanostructured Lipid Carriers: A Groundbreaking Approach for Transdermal Drug Delivery.** *Advanced Pharmaceutical Bulletin.* Vol. 10 (2), p. 150-165, 2020.

COLA, D. F. **Sistemas Carreadores Lipídicos Nanoestruturados para Ivermectina e Metopreno Visando Controle de Parasitas.** *Química Nova.* Vol. 39 (9), p. 1034-1043, 2016.

CORDEIRO, A. P. *et al.* ***In vitro* synergic activity of diethyldithiocarbamate and 4-nitrochalcone loaded in beeswax nanoparticles against melanoma (B16F10) cells.** *Materials Science and Engineering: C.* Vol. 120, 2021.

COSCO, D. *et al.* **Meglumine Antimoniate-Loaded Aqueous-Core PLA Nanocapsules: Old Drug, New Formulation against Leishmania-Related Diseases.** *Macromolecular Bioscience.* Vol. 21 (7), 2021.

CRAMER, N. B. *et al.* **Thiol-Ene Photopolymerization Mechanism and Rate Limiting Step Changes for Various Vinyl Functional Group Chemistries.** *Macromolecules.* Vol. 36, p. 7964-7969, 2003.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. **Nanoparticles in cellular drug delivery.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* Vol. 17 (8), p. 2950-2962, 2009.

FERGUSON, J. J. A.; ABBOTT, K. A.; GARG, M. L. **Anti-inflammatory effects of oral supplementation with curcumin: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *Nutrition Reviews.* Vol. 79 (9), p. 1043–1066, 2021.

FOULADVAND, M.; BARAZESH, A.; TAHMASEBI, R. **Evaluation of *in vitro* antileishmanial activity of curcumin and its derivatives "gallium curcumin, indium curcumin and diacethyle curcumin".** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* Vol. 17 (24), p. 3306-3308, 2013.

FRÉZARD, F. *et al.* **Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action.** *Reviews in Inorganic Chemistry.* Vol. 33 (1), p. 1-12, 2013.

GOMAA, E. *et al.* **Methods for preparation of nanostructured lipid carriers.** *Methods.* 2021.

HOROIWA, T. A. *et al.* **Sugar-based colloidal nanocarriers for topical meglumine antimoniate application to cutaneous leishmaniasis treatment: Ex vivo cutaneous retention and *in vivo* evaluation.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* Vol. 147, 2020.

JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B. R. **Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* Vol. 44 (2), p. 97-111, 2010.

KALAT, S. A. M. *et al.* **Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of L. major lesion in BALB/c mice.** *Experimental Parasitology.* Vol. 143, p. 5-10, 2014.

KHAN, M. *et al.* **Formulation and Characterization of a Self-Emulsifying Drug Delivery System (SEDDS) of Curcumin for the Topical Application in Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis.** *Current Topics Medicinal Chemistry.* Vol. 18 (18), p. 1603-1609, 2018.

KUTTAN, R. *et al.* **Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*).** *Cancer Letters.* Vol. 29 (2), p. 197-202, 1985.

LÓPEZ-GARCÍA, R.; GANEM-RONDERO, A. **Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Ability.** *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.* Vol. 5 (2), 2016.

LOWE, A. B. **Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis.** *Polymer Chemistry.* Vol. 1, p. 17-36, 2010.

MACHADO, T. O. *et al.* **Thiol-ene miniemulsion polymerization of a biobased monomer for biomedical applications.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 159, p. 509-517, 2017.

MACHADO, T. O.; SAYER, C.; ARAUJO, P. H. H. **Thiol-ene polymerisation: A promising technique to obtain novel biomaterials.** *European Polymer Journal*. Vol. 86, p. 200-215, 2017.

MARINOV, R. *et al.* **Antiviral properties of chalcones and their synthetic derivatives: a mini review.** *Pharmacia*. Vol. 67 (4), p. 325-337, 2020.

MO, L. *et al.* **Preparation and characterization of teniposide PLGA nanoparticles and their uptake in human glioblastoma U87MG cells.** *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 436 (1-2), p. 815-824, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. *et al.* **A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin.** *BioMed Research International*. 2014.

MOOSAVIAN, S. A.; FALLAH, M.; JAAFARI, M. R. **The activity of encapsulated meglumine antimoniate in stearylamine-bearing liposomes against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice.** *Experimental Parasitology*. Vol. 200, p. 30-35, 2019.

MSF (Médicos Sem Fronteiras). **Leishmaniose visceral (calazar)**, 2022. Disponível em: <https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/leishmaniose/?utm_source=adwords_msf&utm_medium=&utm_campaign=doencas_geral_comunicacao&utm_content=_exclusao-saude_brasil_39923&gclid=Cj0KCQjwI92XBhC7ARIsAHLI9aly4qylvY_n3aJUY9Cc2IKYtGsCWTtThgCU-FWswlqvrHvLhpQAn80aArGAEALw_wcB>. Acesso em 13/08/2022.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* **Curcumin treatment provides protection against Trypanosoma cruzi infection.** *Parasitology Research*. Vol 110, p. 2491-2499, 2012.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. **Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application**. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Vol. 5 (3), p. 305-313, 2015.

NEGI, P. S. *et al.* **Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47 (10), p. 4297-430, 1999.

OLIVEIRA *et al.* **Overcoming multi-resistant leishmania treatment by nanoencapsulation of potent antimicrobials**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol. 96 (8), p. 2123-2140, 2020.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). **Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Américas**. Nº 9, 2020.

ORTIZ, R. A. *et al.* **An effective method to prepare sucrose polymers by Thiol-Ene photopolymerization**. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 78 (2), p. 282–286, 2009.

OZGOZTAZI, O., BAYDAR, I. **A randomized clinical trial of topical paromomycin versus oral ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Turkey**. *International Journal of Dermatology*. Vol. 36 (1), p. 61-63, 1997.

PAHO (Pan American Health Organization). **Leishmaniose Visceral**. Disponível em: <https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en>. Acesso em: 13/08/2021.

PEARSON, R. D. Leishmaniasis. **MSD Manual**, 2020. Disponível em: <<https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/extraintestinal-protozoa/leishmaniasis>>. Acesso em: 29/11/2021.

PONTES-QUERO, G. M. *et al.* **Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-inflammatory and biocompatibility studies**. *Materials Science and Engineering: C*. Vol. 121, 2021.

PRADHAN, S. *et al.* **Treatment options for leishmaniasis.** Clinical and Experiment Dermatology. 2021.

QI, X.; WANG, L.; ZHU, J. **Water-In-Oil-In-Water Double Emulsions: An Excellent Delivery System for Improving the Oral Bioavailability of Pidotimod in Rats.** Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 100 (6), p. 2203–2211, 2011.

RAMOS, M. A. S. *et al.* **Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review.** International Journal of Pharmaceutics. Vol. 589, 2020.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. **Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters.** Progress in Polymer Science. Vol. 36 (7), p. 887-913, 2011.

RIAZ, A. *et al.* **Formulation of topical NLCs to target macrophages for cutaneous leishmaniasis.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. Vol. 54, 2019.

ROATT, B. M. *et al.* **Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment.** Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 104, p. 8965–8977, 2020.

SALEEM, K. *et al.* **Applications of Nanomaterials in Leishmaniasis: A Focus on Recent Advances and Challenges.** Nanomaterial. Vol. 9 (12), p. 1749, 2019.

SALEHEEN, D. *et al.* **Latent activity of curcumin against leishmaniasis *in vitro*.** Biological and Pharmaceutical Bulletin. Vol. 25 (3), p. 386-389, 2002.

SALEHI, B. *et al.* **Curcumin nanoformulations for antimicrobial and wound healing purposes.** Phytotherapy Research. Vol. 35 (5), p. 2487-2499, 2021.

SALVI, V. R.; PAWAR, P. **Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. Vol. 51, p. 255-267, 2019.

SALVIA-TRUJILLO, L. *et al.* **Emulsion-Based Nanostructures for the Delivery of Active Ingredients in Foods.** *Frontiers in Sustainable Food Systems.* Vol. 2, 2018.

SANTINI, J. V. C. **Enzymatic Synthesis of Allyl-(meth)acrylate Monomers for Thiol-ene Biodegradable Polymers.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2023.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. **Leishmaniasis: where are we and where are we heading?.** *Parasitology Research.* Vol. 120, p. 1541-1554, 2021.

SATOSKAR, R. R.; SHAH, S. J.; SHENOY, S. G. **Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation.** *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology.* Vol. 24 (12), p. 651-654, 1986.

SIDHU, G. S. *et al.* **Enhancement of wound healing by curcumin in animals.** *Wound Repair and Regeneration.* Vol. 6 (2), p. 167-177, 1998.

SOUZA, C.; DE FREITAS, L. A. P.; CAMPOS, P. M. B. G. M. **Topical Formulation Containing Beeswax-Based Nanoparticles Improved *In vivo* Skin Barrier Function.** *AAPS PharmSciTech.* Vol. 18, p. 2505–2516, 2017.

SOUZA-BATISTA, A. J. *et al.* **Polycaprolactone Antimony Nanoparticles as Drug Delivery System for Leishmaniasis.** *American Journal of Therapeutics.* Vol. 26 (1), p. e12-e17, 2019.

STEVERDING, D. **The history of leishmaniasis.** *Parasites & Vectors.* Vol. 10 (82), 2017.

TIWARI, B. *et al.* **Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* Vol. (3), 2017.

TIWARI, N. *et al.* **Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis.** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. Vol. 18 (1), 2018.

TODA, S. *et al.* **Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L.** Chemical and Pharmaceutical Bulletin. Vol. 33 (4), p. 1725-1728, 1985.

TÜRÜNÇ, O.; MEIER, M. A. R. **The thiol-ene (click) reaction for the synthesis of plant oil derived polymers.** European Journal of Lipid Science and Technology. Vol. 115 (1), p. 41-54, 2013.

UZUN, S. *et al.* **Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of cutaneous leishmaniasis in Turkey.** International Journal of Dermatology. Vol. 57 (8), p. 973-982, 2018.

WHO (World Health Organization). **Leishmaniasis**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: 28/11/2021.

XUE, J. *et al.* **Novel eugenol-based allyl-terminated precursors and their bio-based polymer networks through thiol-ene click reaction.** Industrial Crops and Products. Vol 171, 2021.

ZAIONCS, S.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. **Exploring the Role of Nanoparticles in Amphotericin B Delivery.** Current Pharmaceutical Design. Vol. 23 (3), p. 509-521, 2017.

ZHENG, X. *et al.* **Low curcumin concentration enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil against colorectal cancer.** Phytomedicine. Vol. 85, 2021.

ZHOU, B.; XING, C. **Diverse Molecular Targets for Chalcones with Varied Bioactivities.** Medicinal Chemistry. Vol. 5 (8), p. 388-404, 2015.

ZOU, J. *et al.* **Clicking Well-Defined Biodegradable Nanoparticles and Nanocapsules by UV-Induced Thiol-Ene Cross-Linking in Transparent Miniemulsions.** Advanced Materials. Vol. 23 (37), p. 4274-4277, 2011.

CAPÍTULO 3

3 DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE NANOPARTÍCULAS DE CERA DE ABELHA CONTENDO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA, CURCUMINA E 4-NITROCHALCONA EM PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM* E *L. AMAZONENSIS*

3.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária transmitida pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (STEVERDIN, 2017). Classificada como uma das doenças tropicais mais importante, ela representa um grave problema de saúde mundial conforme descrito pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

A leishmaniose pode assumir diferentes formas clínicas, como leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea e a visceral são as duas formas principais. Embora a visceral seja mais grave, a cutânea é a que mais prevalece no mundo. A leishmaniose cutânea produz úlceras na pele em partes do corpo, como braços, pernas e rosto deixando o paciente com cicatrizes permanentes, já a visceral afeta os órgãos internos causando inchaço no baço, fígado, além de outras complicações (IRSHAD; KHALID, 2022).

Na região das Américas, entre 2001 a 2019, 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea (LC) foram notificados à OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde), enquanto a visceral foi registrada 65.934 casos, o que representa um importante problema de saúde pública.

Atualmente o tratamento da leishmaniose representa um grande desafio, pois os medicamentos usualmente disponíveis como antimoniais pentavalente, anfotericina B, miltefosine, paramomicina e pentamidina apresentam eficiência variada, além disso, também estão associadas a problemas graves como toxicidade, alta dosagem e possível resistência do parasita. Entretanto, é bom lembrar que não existe um tratamento padrão, o tratamento vai depender da espécie do parasita, estado do paciente, entre outros fatores (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; TIWARI *et al.*, 2018).

Diante desse contexto, com o objetivo de reduzir as limitações dos medicamentos, pesquisas tem se concentrado em procurar novas alternativas ou melhorar os medicamentos já existentes para o tratamento da leishmaniose.

A nanotecnologia é uma ferramenta inovadora na entrega de medicamentos, com diversos nanocarreadores que oferecem benefícios como eficiência no tratamento, direcionamento a alvos específicos, controle da liberação e redução da toxicidade (RAMOS *et al.*, 2020).

O sistema de carreador lipídico nanoestruturado tem sido amplamente estudado e vem ganhando espaço como sistemas carreadores. Esse tipo de sistema é baseado em uma matriz lipídica natural sólida e líquida, à temperatura ambiente e corporal. A cera de abelha é um lipídio natural que vem sendo utilizado para o desenvolvimento de diversos sistemas de liberação de fármacos na área farmacêutica, mas pouca atenção tem sido dada à sua aplicação sendo que pode ser um material com potencial em aplicações farmacêuticas e cosméticas, pois possuem vantagens como sistemas de liberação de drogas devido às suas propriedades físicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade da pele e atividade antimicrobiana (SOUZA; FREITAS; CAMPOS, 2017; CORDEIRO *et al.*, 2021).

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar o efeito de nanopartículas a base de cera de abelha em espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum* na forma promastigota. As nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas pelo método de dupla emulsão (água/óleo/água), encapsulando antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona. Além disso, as nanopartículas foram caracterizadas e avaliadas quanto ao seu efeito citotóxico *in vitro*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

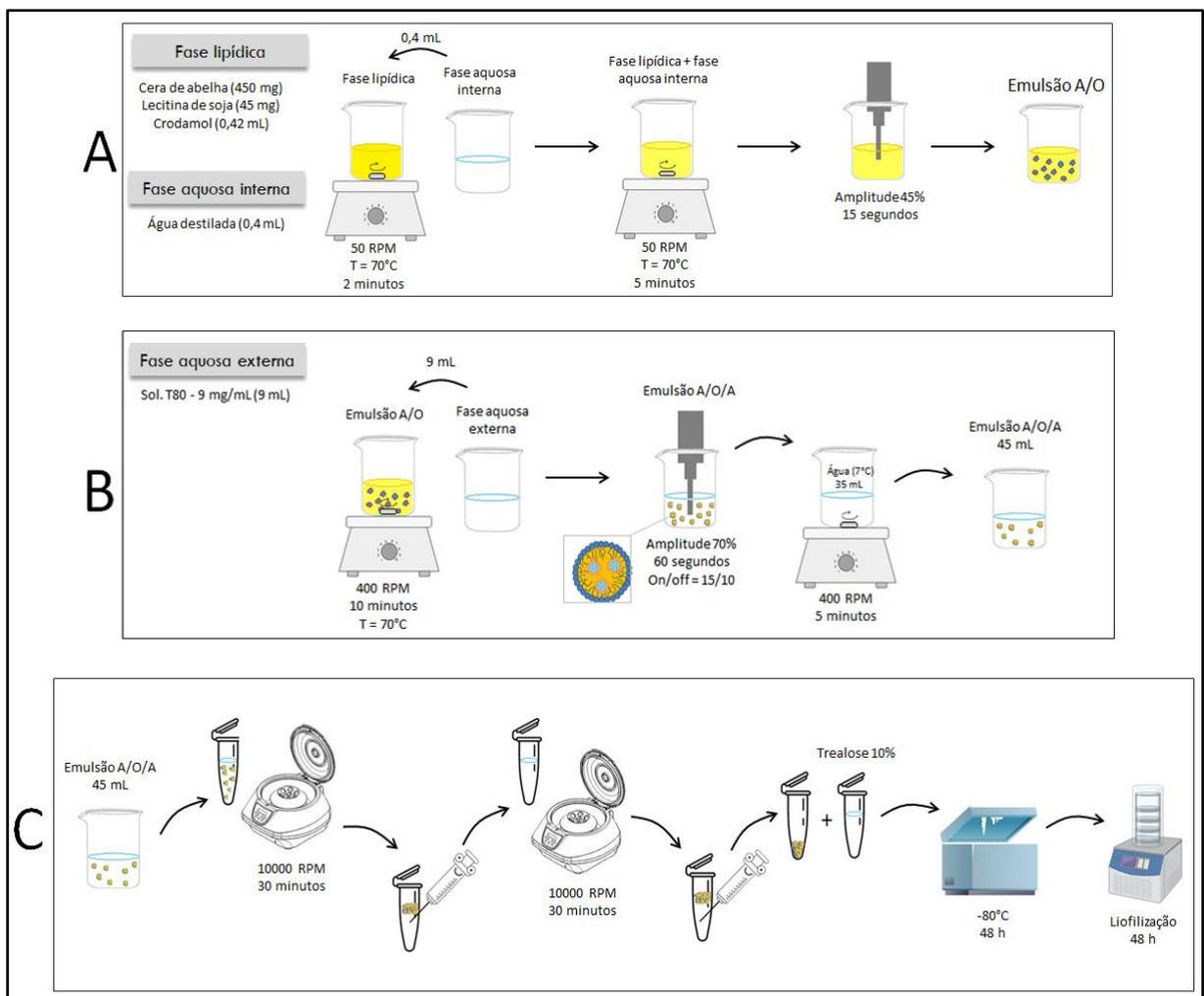
3.2.1 Materiais

A cera de abelha branca (GM Ceras, Brasil) foi obtida da Chemical Alpha e o ácido caprílico (Crodamol GTCC, Alpha Química, Brasil) da Croda Brasil, ambas substâncias utilizadas como matriz lipídica. Lecitina de soja (Alfa Aesar, Alemanha) e monooleato de polioxietileno-20-sorbitano (Tween 80, Vetec, Brasil) foram utilizados como surfactantes. Antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda) foi utilizado como fármaco hidrofílico. A curcumina (Neon) e a 4-nitrochalcona (Sigma-Aldrich) foram utilizadas como fármacos lipofílico.

3.2.2 Encapsulamento do antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona

Foram desenvolvidas seis formulações de nanopartículas utilizando a técnica de emulsão dupla A/O/A, seguindo metodologias previamente estabelecidas em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo de pesquisa (CORDEIRO *et al.*, 2021; MAZUR *et al.*, 2019). A primeira formulação consistiu em nanopartículas brancas, sem a presença de antimoniato de meglumina, curcumina ou 4-nitrochalcona. A preparação das nanopartículas está ilustrada na Figura 15 e descrita logo abaixo.

Figura 15 – Etapas da preparação das nanopartículas lipídicas sólidas branco



A – Primeira emulsão (A/O); B – Segunda emulsão (A/O/A); C – Separação das nanopartículas.

Fonte: Autor (2024)

A metodologia se dividiu em três etapas, emulsão A/O, emulsão A/O/A e separação das nanopartículas. Para preparação da emulsão A/O foi preparado a fase lipídica fundindo 450 mg de cera de abelha a 70°C, juntamente com 45 mg de lecitina de soja e 0,42 mL de crodamol sob agitação magnética por 2 minutos.

Como fase aquosa interna foi utilizada 0,4 mL de água à fase lipídica sob agitação magnética a 50 rpm, sendo mantida essa agitação por mais 5 minutos. A mistura resultante foi submetida a ultrassom (modelo 500 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific) por 15 segundos a uma amplitude de 45%, formando assim a primeira emulsão A/O. Em seguida, 9 mL da fase aquosa externa, composta por uma solução de Tween 80 (9 mg/mL), foram introduzidos na emulsão A/O, sendo agitados a 400 rpm por 10 minutos a 70°C. A emulsão inicial foi novamente submetida a ultrassom por 1 minuto (15 segundos ligado, 10 segundos desligado) a uma amplitude de 70%, originando a emulsão dupla A/O/A. Por fim, a emulsão dupla foi transferida à 35 mL de água destilada a 7°C, sob agitação magnética a 400 rpm por 5 minutos, promovendo o rápido resfriamento das nanopartículas lipídicas. Como resultado, obteve-se aproximadamente 45 mL da emulsão diluída.

Com pequenas alterações e seguindo o mesmo procedimento na preparação das nanopartículas branca, foram preparadas nanopartículas com adição de antimoniato de meglumina, curcumina, 4-nitrochalcona e a mistura das substâncias. Nas formulações contendo antimoniato de meglumina, no lugar da água na fase aquosa interna foi utilizado uma solução aquosa de antimoniato de meglumina (300 mg/mL), e nas formulações contendo a curcumina e 4-nitrochalcona, no lugar do crodamol puro foram preparadas soluções de curcumina e 4-nitrochalcona em crodamol (50 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente).

Após o preparo final da emulsão, as mesmas foram centrifugadas (MiniSpin, Eppendorf, Alemanha) a 10000 rpm por 30 minutos afim de promover a separação das nanopartículas no meio aquoso, o líquido foi removido com o auxílio de uma seringa, transferido para outro eppendorf e centrifugado novamente sob as mesmas condições. As nanopartículas foram separadas do meio aquoso seguindo o mesmo procedimento anterior e dispersas em solução aquosa de D-(+)-Trealose a 10%, congeladas a -80°C por 48 horas e liofilizadas (L101, Liotop, Brasil) por 48 horas. Na Tabela 1 são apresentadas as formulações preparadas.

Tabela 1 - Formulações preparadas pelo método de dupla emulsão A/O/A

Formulação	Fase lipídica			Fase aquosa interna		Fase aquosa externa		
	CA	LS	CRO	Sol. CUR (50 mg/mL)	Sol. 4NC (10 mg/mL)	Sol. AM (300 mg/mL)	AD	Sol. T80 (9mg/mL)
NP BRANCO	4,4	0,4	4,1	-	-	-	3,9	87,2
NP AM	4,4	0,4	4,1	-	-	3,9	-	87,2
NP CUR	4,4	0,4	-	4,1	-	-	3,9	87,2
NP 4NC	4,4	0,4	-	-	4,1	-	3,9	87,2
NP AM + CUR	4,4	0,4	-	4,1	-	3,9	-	87,2
NP AM + 4NC	4,4	0,4	-	-	4,1	3,9	-	87,2

Valores expresso em porcentagem da emulsão A/O/A m/m (%); CA: Cera de abelha; LS: Lecitina de soja; CRO: Crodamol; Sol.: Solução; T80: Tween 80; AD: Água destilada; AM: Antimoniato de meglumina; CUR: Curcumina; 4NC: 4-nitrochalcona. Fonte: Autor (2024)

3.2.3 Diâmetro médio

O tamanho médio em intensidade das nanopartículas foi determinado no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano S da Malvern Instruments®, U.K. Foram preparadas amostras de 0,5 mL da emulsão final, as quais foram subsequentemente diluídas em 1,5 mL de água destilada. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em termos de Dp e PdI, que indicam, respectivamente, o tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão.

3.2.4 Potencial zeta

O potencial zeta oferece informações sobre a estabilidade das nanopartículas, considerando as cargas em sua superfície. As análises foram conduzidas em triplicata no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) utilizando o Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments®, Reino Unido, através da técnica de espalhamento eletroforético de luz (ELS).

Amostras de 0,5 mL em pH 7 da emulsão final foram preparadas e, posteriormente, diluídas em 1,5 mL de água destilada para as análises.

3.2.5 Curva de calibração da curcumina e 4-nitrochalcona

Para determinar a concentração de curcumina e 4-nitrochalcona e avaliar a eficiência de encapsulação, elaboraram-se curvas de calibração no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Soluções padrão, contendo concentrações conhecidas de curcumina e 4-nitrochalcona, foram preparadas e analisadas em um intervalo de comprimento de onda de 190 a 500 nm. A absorbância máxima da curcumina ocorre em 425 nm, enquanto a da 4-nitrochalcona a 324 nm. Metanol foi utilizado para diluições da curcumina, e água destilada foi empregada para a 4-nitrochalcona.

As análises, realizadas em triplicata, foram médias desses pontos usando um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi, U-1900). Após a análise, a curva de calibração foi gerada, relacionando concentrações ($\mu\text{g/mL}$) no eixo x com valores de absorbância no eixo y. A linearidade foi estabelecida por meio de regressão linear, e a qualidade do ajuste do modelo foi avaliada através da análise de variância.

3.2.6 Eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina, curcumina e 4-nitrochalcona

A eficiência de encapsulação das nanopartículas contendo curcumina, antimoniato de meglumina, 4-nitrochalcona e a mistura das substâncias foi quantificada em relação aos fármacos não encapsulados. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

As análises da eficiência da curcumina e 4-nitrochalcona foram feitas no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todas as nanopartículas na emulsão final foram centrifugadas (MiniSpin, Eppendorf, Alemanha) utilizando filtro de Limite de Peso Molecular Nominal de 100 kDa (Amicon® Ultra, Millipore). Alíquotas de 0,5 mL das amostras foram adicionadas nos filtros e centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos.

O filtrado das nanopartículas que continham curcumina foram diluídas em 1,5 mL de metanol e os que continham 4-nitrochalcona foram diluídos em 1,5 mL de água destilada e quantificados por espectroscopia UV/Vis a 425 nm e 324 nm respectivamente, usando um espectrofotômetro Hitachi (U-1900). A concentração da curcumina e 4-nitrochalcona foi

calculada utilizando as curvas de calibração previamente preparada e a eficiência de encapsulação (EE) calculada utilizando a Equação 1,

$$EE(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_1} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq 1})$$

onde C_1 é a concentração total do fármaco na emulsão A/O/A no final do processo e C_2 é a concentração do fármaco livre no filtrado.

Para a quantificação do antimoniato de meglumina não encapsulado, a amostra filtrada foi adicionada em uma solução de ácido nítrico e aquecida até secar. Essa etapa foi repetida até a completa digestão do material orgânico. O produto seco final foi redissolvido em uma mistura de 1:1 de ácido clorídrico concentrado e água e fervido por 1 h (FRÉZARD *et al.*, 2000). No final a concentração de antimônio foi determinada num espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer modelo PINAACLE 900T em forno de grafite localizado na Central de Análises no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros de absorção das nanopartículas lipídicas sólidas liofilizadas foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Shimadzu (IRPrestige21) pelo método convencional de pastilha de KBr. As amostras foram moídas e comprimidas com KBr anidro obtendo-se a pastilha. A faixa de varredura foi de 400-4000 cm^{-1} e a resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram feitas na Central de Análises no Departamento de Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PosENQ) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A avaliação da morfologia das nanopartículas foi conduzida utilizando um microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM-1011 operando a 100 kV localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para a preparação da amostra, a emulsão final foi diluída até atingir uma concentração de

sólidos de 0,5%. Posteriormente, uma gota da amostra foi aplicada sobre uma grade revestida de carbono e deixada secar por 24 horas. Em seguida, a grade foi submetida a um processo de revestimento com carbono antes da realização da análise.

3.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise das amostras de cera de abelha pura e nanopartículas de cera de abelha foram conduzidas através da calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizando o modelo JADE da Perkin Elmer. O equipamento operou em condições de atmosfera inerte (N₂, 20 mL/min) em uma faixa de temperatura que variou de -30 a 150°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min. As análises foram feitas na Central de Análises no Departamento de Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PosENQ) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2.10 Análise termogravimétrica (TGA)

Foram realizadas análises termogravimétricas (TGA) no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para caracterizar amostras de cera de abelha pura e nanopartículas de cera de abelha, utilizando o equipamento STA 449 F3 Jupiter da NETZSCH. As amostras foram colocadas em uma panela de platina e submetidas à análise em uma faixa de temperatura de 25 a 600 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e uma vazão de 60 mL/min, sob atmosfera de nitrogênio.

3.2.11 Análise da atividade leishmanicida *in vitro* nas formas *L. amazonensis* e *L. infantum*

3.2.11.1 Manutenção das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

As formas promastigotas da *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ((MHOM/BR/Josefa) e *Leishmania (Viannia) infantum* (MCAN/BR/97/p142) provenientes da Universidade Estadual de Maringá, foram cultivadas em um meio de cultura composto por 199 (GIBCO Invitrogen, EUA), ao qual foram adicionados 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO Invitrogen, EUA), uma solução de HEPES 1M, 1% de urina humana, 1% de L-glutamina, estreptomicina e penicilina (GIBCO, Invitrogen) e 10% de bicarbonato de sódio. As culturas celulares foram incubadas na estufa B.O.D a 25° C, usando frascos de cultura de 25 cm². Para

todos os experimentos, promastigotas na fase de crescimento estacionária (cultura de 5 dias) foram utilizadas.

3.2.11.2 Viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* por AlamarBlue®

A viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foi mensurada pelo método fluorimétrico AlamarBlue® no Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer da Universidade de Londrina (UEL). Esse método detecta a atividade metabólica de células através da redução da resazurina (7-hidroxi-3 H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) a resorufina (forma reduzida) por enzimas mitocondriais (Zachari *et al.*, 2013). Formas promastigotas de *L. infantum* (10⁶ parasitos/mL) foram tratadas com concentrações de 20, 30 e 40 µM e as formas promastigotas de *L. amazonensis* (10⁶ parasitos/mL) foram tratadas com concentrações de 25, 50 e 100 µM com a CUR livre, 4NC livre e as nanopartículas produzidas. O tratamento foi feito em placas de 96 poços e incubadas por 24 h em estufa B.O.D 25° C. Como controle negativo, utilizou-se promastigotas mantidas em cultura sem tratamento (meio 199), como controle positivo utilizou-se antimoniato de meglumina e nanopartícula branco na concentração de 100 µM. Em seguida foi adicionado 1 µL de AlamarBlue (2000 µM) e incubado por 2 h. Ao final, a placa foi lida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan, USA) a 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo controle e calculada com a seguinte fórmula: % (promastigotas viáveis) = amostra do grupo tratado/média do controle não tratado) x 100.

3.2.11.3 Cultura celular

J774.1 (ATCC®TIB-67™) é uma linhagem celular de macrófago isolada da ascite de camundongo com sarcoma de células reticulares. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen) contendo 1% de L-glutamina, 10% de bicarbonato de sódio, 5% de SBF, 10 u/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (GIBCO, Invitrogen). As células foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm² em estufa (37° C, 5% CO₂).

3.2.11.4 Viabilidade de macrófagos J774.1

O ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MTT; Sigma-Aldrich, EUA) baseia-se na mensuração da atividade metabólica da mitocôndria conforme descrito por Mosmann, 1983. Os testes foram feitos no Laboratório de Imunoparasitologia de Doenças Negligenciadas e Câncer da Universidade de Londrina (UEL).

Macrófagos J774.1 (3×10^4 células/mL) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços (Kasvi, Brasil) e incubadas com diferentes concentrações de 4NC livre, CUR livre, NP 4NC, NP 4NC + AM, NP CUR, NP CUR + AM e NP AM (1, 5 e 10 μ M) por 24 h a 37° C em 5% de CO₂. As células foram lavadas e MTT (0,33 mg/mL) foi adicionado durante 4 h. O produto MTT (cristais de formazan) foi solubilizado em 100 μ g/mL de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) e lido em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan, EUA) a 550 nm de absorvância. Células contendo apenas meio RPMI-1640 foram utilizadas como controle negativo e 0,4% de H₂O₂ como controle positivo. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade em comparação com o grupo controle e calculada com a seguinte fórmula: % (células viáveis) = amostra do grupo tratado/média do controle não tratado) x 100.

3.2.11.5 Análise Estatística

Para as análises estatísticas, foi empregado o método ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para realizar comparações entre grupos. Três conjuntos de experimentos independentes foram conduzidos, cada um com dados replicados três vezes. Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi conduzida utilizando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância estatística.

3.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.3.1 Tamanho das nanopartículas e potencial zeta

Na Tabela 2, são apresentados os diâmetros médios, índice de polidispersão e o potencial zeta das nanopartículas lipídicas sólidas, as quais foram preparadas através do método de dupla emulsão.

Essas características físico-químicas exercem influência direta sobre as nanopartículas lipídicas sólidas, impactando aspectos como estabilidade durante o armazenamento, perfil toxicológico, absorção celular e biocompatibilidade nas áreas biológicas e farmacêuticas (PRESTIDGE; RAO; TAN, 2013; CAMPOS *et al.*, 2020).

Tabela 2 - Caracterização das nanopartículas em relação ao tamanho médio ($D_p \pm S$), índice de polidispersão ($PdI \pm S$) e potencial zeta ($\xi \pm S$)

Formulações	$D_p \pm S$ (nm)	$PdI \pm S$	$\xi \pm S$ (mV)
NP Branco	211,83 \pm 2,76	0,205 \pm 0,013	-32,38 \pm 1,17
NP AM	212,43 \pm 3,61	0,167 \pm 0,015	-36,94 \pm 0,92
NP CUR	227,93 \pm 4,57	0,243 \pm 0,007	-39,33 \pm 1,53
NP 4NC	251,33 \pm 0,91	0,256 \pm 0,006	-35,64 \pm 0,72
NP AM + CUR	283,70 \pm 1,39	0,254 \pm 0,007	-32,78 \pm 0,98
NP AM + 4NC	260,27 \pm 3,06	0,249 \pm 0,009	-40,14 \pm 0,76

NP: Nanopartícula; AM: Antimoniato de meglumina; CUR: Curcumina; 4NC: 4nitrochalcona.

Fonte: Autor (2024)

Conforme destacado por Assolini *et al.* (2022), embora a literatura ainda não forneça uma faixa de tamanho ideal para a absorção celular, observa-se uma preferência por dimensões na faixa submicrométrica. A preferência está intimamente relacionada à capacidade desejada das nanopartículas de atravessar barreiras biológicas, como os vasos sanguíneos altamente permeáveis. Nanopartículas entre 10 a 500 nm são estrategicamente escolhidas para possibilitar a eficiente passagem através desses vasos, uma característica crucial para alcançar áreas específicas, como tumores em crescimento. Essa seleção de tamanho visa otimizar a capacidade das nanopartículas de circular de maneira eficaz na corrente sanguínea, favorecendo a entrega direcionada a células-alvo e tecidos específicos. Ainda, devemos lembrar que a interação das nanopartículas com as células alvos vai depender de cada tipo de célula e das diferentes rotas de internalização, mas normalmente a distribuição de tamanho é de aproximadamente 200 nm na área biomédica (LINCE *et al.*, 2011; AUGUSTINE *et al.*, 2020).

Outro ponto relevante é que nanopartículas com dimensões inferiores a 100 nm tendem a se acumular no fígado e em outros tecidos, indicando uma correlação entre tamanho reduzido e toxicidade (ASSOLINI *et al.*, 2022).

Portanto, os diâmetros obtidos das nanopartículas lipídicas sólidas estão alinhados com aplicações biomédicas, uma vez que os valores médios estão dentro da faixa de 211 a 283 nm. Ademais, as nanopartículas exibem um índice de polidispersão (PdI) satisfatório, uma vez que, em aplicações de entrega de fármacos utilizando transportadores à base de lipídios, um PdI menor ou igual a 0,3 é considerado aceitável mesmo sendo a distribuição de tamanho relativamente larga para PdI entre 0,2 e 0,3 (DANAEI *et al.*, 2018).

Além disso, as nanopartículas demonstram boa estabilidade, conforme evidenciado pelos resultados de potencial zeta, apresentando uma carga negativa inferior a -30 mV. Valores de potencial zeta entre -10 e +10 mV são considerados aproximadamente neutros, enquanto potenciais zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV indicam uma estabilidade coloidal eficaz devido a maior repulsão eletrostática entre as partículas, prevenindo a formação de agregados (CLOGSTON; PATRI, 2011).

3.3.2 Curva de calibração da curcumina e 4-nitrochalcona

As curvas de calibração foram construídas considerando a média das três curvas obtidas com 10 pontos para a curcumina (Tabela 3) e 8 pontos para a 4-nitrochalcona (Tabela 4).

Tabela 3 – Dados obtidos para a curva de calibração da curcumina em metanol

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância média \pm S (nm)
9	1,060 \pm 0,081
8	0,972 \pm 0,088
6	0,746 \pm 0,074
4	0,503 \pm 0,046
2	0,248 \pm 0,030
1	0,123 \pm 0,016
0,5	0,064 \pm 0,004
0,25	0,033 \pm 0,002
0,1	0,015 \pm 0,001
0,05	0,0087 \pm 0,003

Fonte: Autor (2024)

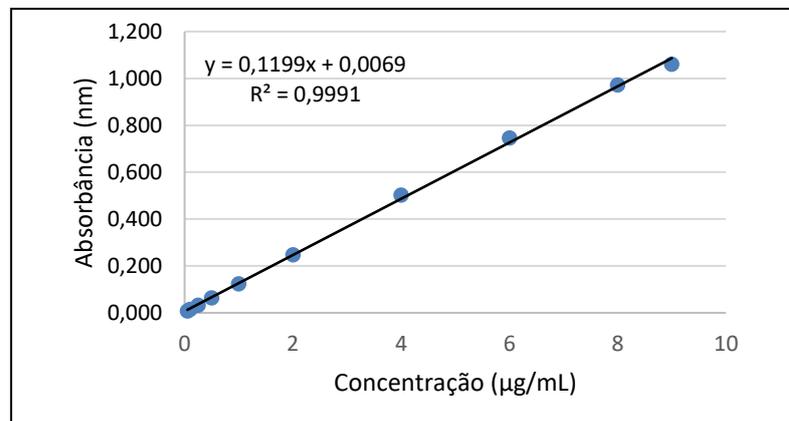
Tabela 4 – Dados obtidos para a curva de calibração da 4-nitrochalcona em água destilada

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância média \pm S (nm)
9	$0,923 \pm 0,072$
6	$0,611 \pm 0,026$
3	$0,311 \pm 0,061$
1	$0,107 \pm 0,012$
0,4	$0,045 \pm 0,006$
0,3	$0,039 \pm 0,001$
0,2	$0,014 \pm 0,003$
0,1	$0,007 \pm 0,003$

Fonte: Autor (2024)

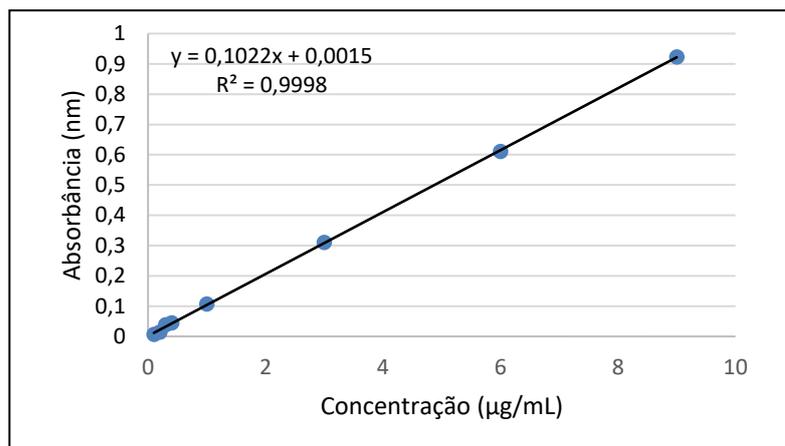
As curvas de calibração para quantificar a curcumina e a 4-nitrochalcona estão apresentadas na Figura 16 e 17. Conforme os resultados, ambas as curvas de calibração apresentaram o coeficiente de determinação (R^2) de 0,99, o que indica que a concentração e a absorbância estão com elevado índice de proporcionalidade.

Figura 16 - Curva de calibração da curcumina em metanol



Fonte: Autor (2024)

Figura 17 - Curva de calibração da 4-nitrochalcona em água destilada



Fonte: Autor (2024)

A partir das curvas de calibração da curcumina e 4-nitrochalcona foram obtidas as Equações 2 e 3, onde CCUR é a concentração da curcumina entre 0,05 a 9 µg/mL e C4NC é a concentração da 4-nitrochalcona entre 0,1 a 9 µg/mL e Abs é a absorbância.

$$\text{Abs} = 0,1199.\text{CCUR} - 0,0069 \quad (\text{Eq 2})$$

$$\text{Abs} = 0,1022.\text{C4NC} - 0,0015 \quad (\text{Eq 3})$$

3.3.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação dos fármacos individuais e simultâneos estão apresentados na Tabela 5. Conforme os resultados podemos observar que o método de dupla emulsão (A/O/A) demonstrou ser eficiente na encapsulação dos fármacos hidrofóbicos.

Tabela 5 - Eficiência de encapsulação das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas pelo método de dupla emulsão (A/O/A)

Formulação	Eficiência de encapsulação ± S (%)		
	AM	CUR	4NC
NP AM	20,1 ± 0,25	-	-
NP CUR	-	99,25 ± 0,45	-
NP 4NC	-	-	99,48 ± 0,30
NP AM + CUR	18,8 ± 0,8	99,28 ± 0,20	-
NP AM + 4NC	19 ± 0,65	-	97,75 ± 1,30

Fonte: Autor (2024)

Mesmo com a adição simultânea do fármaco hidrofílico e do hidrofóbico, a eficiência de encapsulação apresentou ser muito próxima das nanopartículas com os fármacos hidrofóbicos encapsulados individualmente, com valores de eficiência próximas a 99%.

Conforme descrito por Cordeiro *et al.* (2021), valores similares da eficiência de encapsulação foram encontrados. Em seu trabalho foi observado eficiência de encapsulação de 99% para a 4-nitrochalcona em cera de abelha pelo método de dupla emulsão (A/O/A). Em outro trabalho, Riaz *et al.* (2019) estudou a encapsulação da curcumina em carreadores lipídicos nanoestruturados obtendo eficiência de encapsulação de 88%, porém utilizando outra técnica de preparo.

As formulações contendo antimoniato de meglumina apresentaram eficiência de encapsulação relativamente baixa, conforme observado na Tabela 5. Na formulação contendo somente antimoniato de meglumina a eficiência atingiu 20,1%. Ao combinar o antimoniato de meglumina com a curcumina e 4 nitrochalcona, apresentaram eficiência de 18,8% e 19%, respectivamente, mostrando tendência similar a formulação contendo somente antimoniato de meglumina. Ao contrário, a curcumina e a 4-nitrochalcona atingiram eficiência de encapsulação elevada de 99,28% e 97,75%, respectivamente.

A baixa eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina em comparação com os outros fármacos pode ser atribuída à sua natureza hidrofílica. O antimoniato de meglumina é uma substância mais polar e solúvel em água, o que pode dificultar sua incorporação eficaz nas nanopartículas lipídicas, que são estruturas predominantemente lipofílicas.

As nanopartículas de cera de abelha são compostas por uma fase lipídica, que proporciona um ambiente mais propício para fármacos lipofílicos. No entanto, para substâncias hidrofílicas como o antimoniato de meglumina, a afinidade com a fase lipídica pode ser reduzida, impactando diretamente na eficiência de encapsulação.

Ainda é importante lembrar que uma das variáveis a serem consideradas é a concentração do fármaco a ser encapsulado. No caso deste estudo, a concentração de antimoniato de meglumina utilizada foi de 300 mg/mL, concentração mínima utilizada nos tratamentos convencionais. Certamente, é válido questionar se a alta concentração de antimoniato de meglumina poderia ter saturado o processo de encapsulamento, levando parte do fármaco para a fase externa das nanopartículas. Conforme descrito por Jyothi (2010) quanto maior a concentração de fármaco na fase dispersa, menor a eficiência de encapsulação. Esse fenômeno pode ter limitado o aumento na eficiência de encapsulação observada, uma vez que a alta

concentração do antimoniato de meglumina pode ter dificultado a encapsulação na matriz lipídica. Parte do fármaco pode ter excedido a capacidade de encapsulamento das nanopartículas, resultando em uma fração do antimoniato de meglumina sendo exposta à fase externa das partículas.

Sendo assim, os resultados obtidos para os fármacos hidrofóbicos concordam com outros trabalhos similares descritos anteriormente, porém a baixa eficiência observada para o antimoniato de meglumina sugere a necessidade de otimização das condições de formulação para melhorar sua incorporação nas nanopartículas lipídicas.

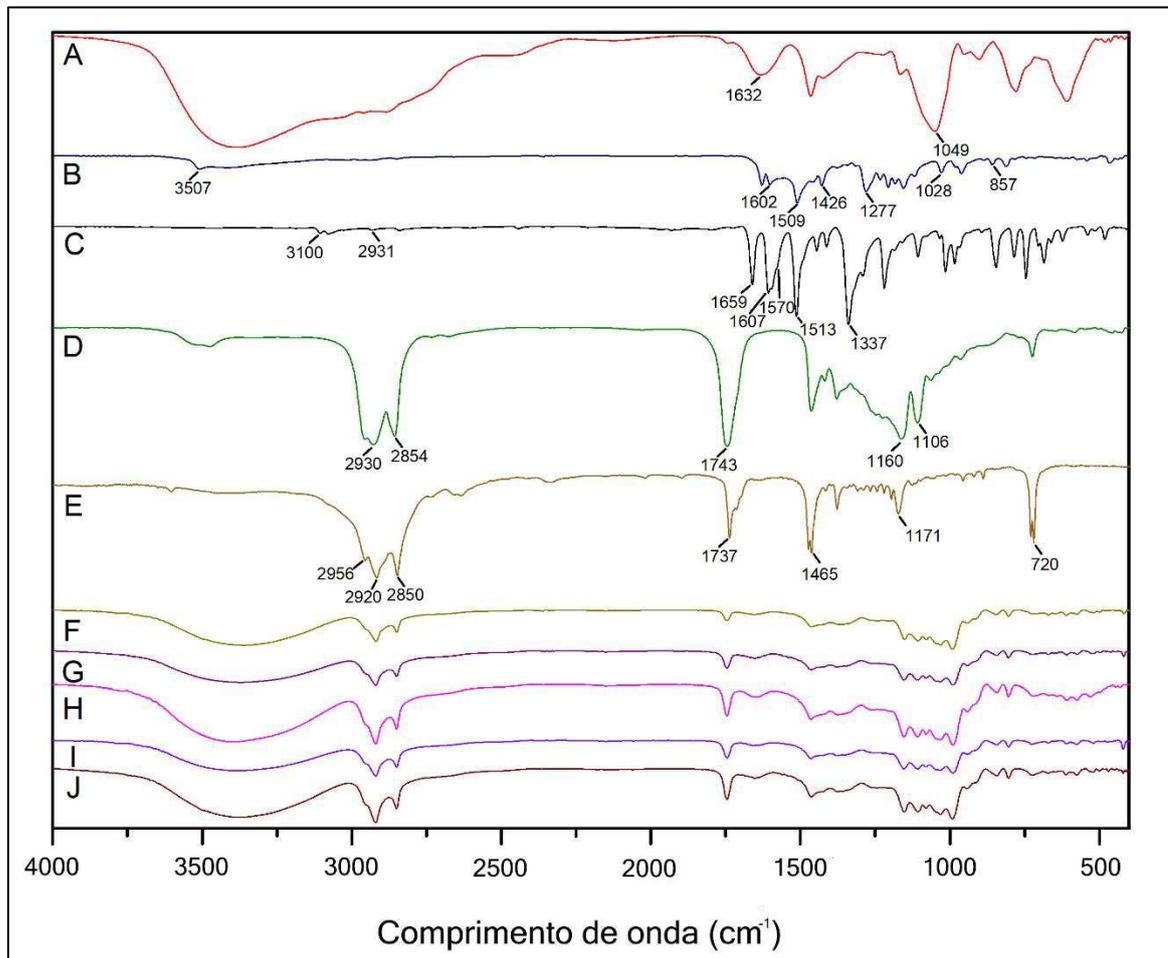
3.3.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 18 estão apresentados os espectros de FTIR para o antimoniato de meglumina, 4-nitrochalcona, curcumina, crodamol, cera de abelha e das nanopartículas lipídicas sólidas preparadas.

O antimoniato de meglumina livre apresentou absorção na região de 2300 a 3000 cm^{-1} sendo atribuída ao estiramento NH_2^+ presente no fármaco. Além disso, as bandas em 1632 e 1049 cm^{-1} são devidas as vibrações de estiramento C–O e Sb–O–C, respectivamente, indicando que são picos característicos do antimoniato de meglumina (DEMICHELI *et al.*, 1999; NAVAEI *et al.*, 2013).

No espectro da curcumina livre podemos encontrar à vibração de estiramento fenólico O–H em 3507 cm^{-1} . Ainda, bandas de absorção em 1602 cm^{-1} devido a vibrações de estiramento do anel benzênico, 1508 cm^{-1} devido as vibrações C = O e C = C, 1426 cm^{-1} devido à vibração de flexão olefínico C–H, 1277 cm^{-1} devido à vibração de estiramento C–O aromático e 1028/857 cm^{-1} devido a vibrações de estiramento C–O–C (DARANDALE; VAVIA, 2013).

Figura 18 – Espectros de FTIR do AM livre (A), CUR livre (B), 4NC livre (C), CRO (D), cera de abelha pura (E), NLS com AM (F), com 4NC (G), com CUR (H), com AM + 4NC (I) e com AM + CUR (J)



Fonte: Autor (2024)

A 4-nitrochalcona livre apresentou picos característicos em 3100 e 2933 cm^{-1} correspondente ao estiramento aromático e alifático. Além disso, apresentou picos em 1659 cm^{-1} referente ao estiramento C=O, 1607-1570 cm^{-1} ao estiramento C=C, 1513 cm^{-1} ao estiramento NO_2 e 1337 cm^{-1} ao estiramento C=C- NO_2 . (ARÉVALO *et al.*, 2019; CORDEIRO *et al.*, 2021).

No espectro do crodamol podemos observar picos em 1743 cm^{-1} referentes ao estiramento C=O, 1160 cm^{-1} e 1106 cm^{-1} referente ao estiramento C-O-C e na região de 2930 e 2854 cm^{-1} em relação as bandas dos grupos CH_3 presentes na molécula (YE *et al.*, 2016).

A cera de abelha apresentou bandas de absorção de hidrocarbonetos com vibrações de estiramento assimétricos de grupos CH_3 em 2956 cm^{-1} , vibrações de estiramento assimétricos e

simétricos de grupos CH_2 em 2920 e 2850 cm^{-1} , e vibrações de deformação em tesoura e vibrações de balanço dos grupos CH_2 em 1465 e 720 cm^{-1} . Além disso, vibrações de estiramento $\text{C}=\text{O}$ em 1737 e 1171 cm^{-1} e vibrações de flexão $\text{C}-\text{H}$ em 1172 cm^{-1} foram observadas como bandas de absorção características para os monoésteres da cera de abelha (TANNER; LICHTENBERG-KRAAG, 2019).

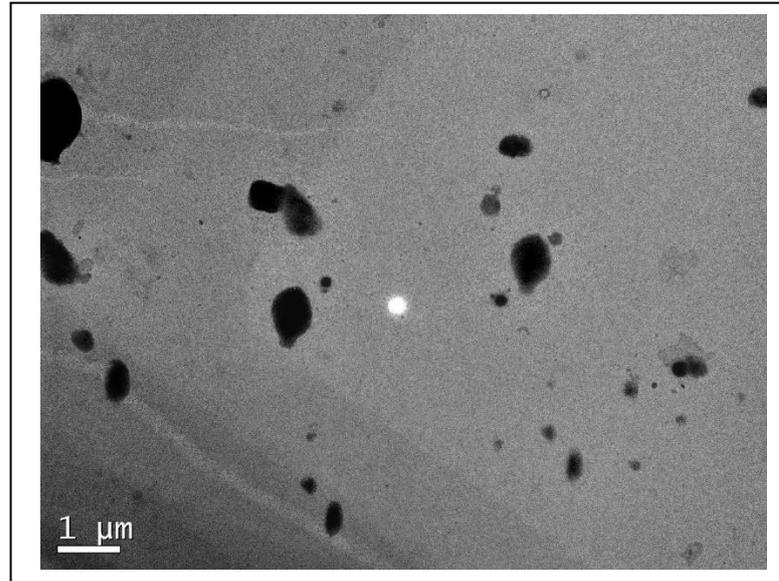
Sendo assim, ao observar os espectros das nanopartículas com os fármacos encapsulados podemos ressaltar que as nanopartículas lipídicas apresentam os mesmos picos característicos no espectro da cera de abelha, com exceção de alguns picos referentes ao crodamol. Isto indica que não houve interação físico-química entre os fármacos e a cera de abelha.

3.3.5 Morfologia

Foi possível obter informações precisas sobre a morfologia e estrutura das nanopartículas através da utilização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Observou-se que as nanopartículas apresentam uma forma semiesférica e um tamanho submicrométrico.

A forma das nanopartículas é de grande importância para o aumento da absorção celular, e quanto mais próxima da esfericidade maior a absorção pela célula. Isso ocorre porque quando a diferença entre o diâmetro maior e o menor é menor, a capacidade de interação com as células é aprimorada. Esse fenômeno é extremamente desejável em aplicações que envolvem a entrega de substâncias terapêuticas, pois aumenta a eficiência na penetração das nanopartículas nas células alvo, possibilitando uma maior absorção dos medicamentos e, conseqüentemente, um melhor resultado terapêutico (VILLANUEVA-FLORES *et al.*, 2020).

Figura 19 - Imagem do TEM das nanopartículas de cera de abelha



Fonte: Autor (2024)

3.3.6 Estudo Térmico

As características térmicas de diferentes materiais proporcionam informações importantes acerca de seus comportamentos em variadas condições de temperatura. A seguir, são apresentados os resultados obtidos a partir da análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimétrica (TGA) para a cera de abelha pura e a nanopartícula lipídica sólida.

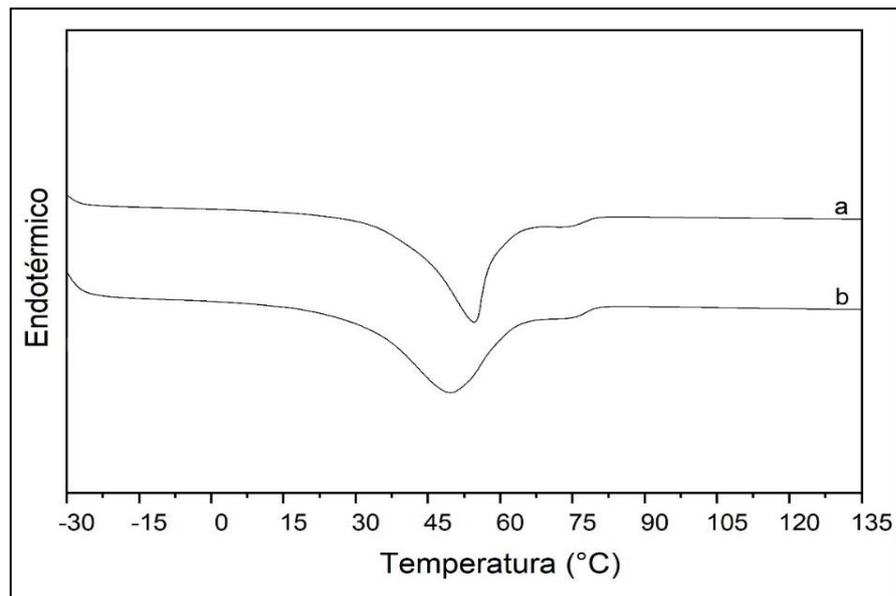
Nas Figuras 20 e 21, observam-se os perfis endotérmicos e exotérmicos derivados das análises de DSC, enquanto a Tabela 6 detalha os dados extraídos desses gráficos os revelam informações sobre as propriedades térmicas desses materiais.

Tabela 6 - Dados obtidos a partir das curvas de DSC

Amostra	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)
Cera de abelha pura	54,72	173,44	44,48	-180,62
NP lipídica	49,04	74,85	41,94	-86,07

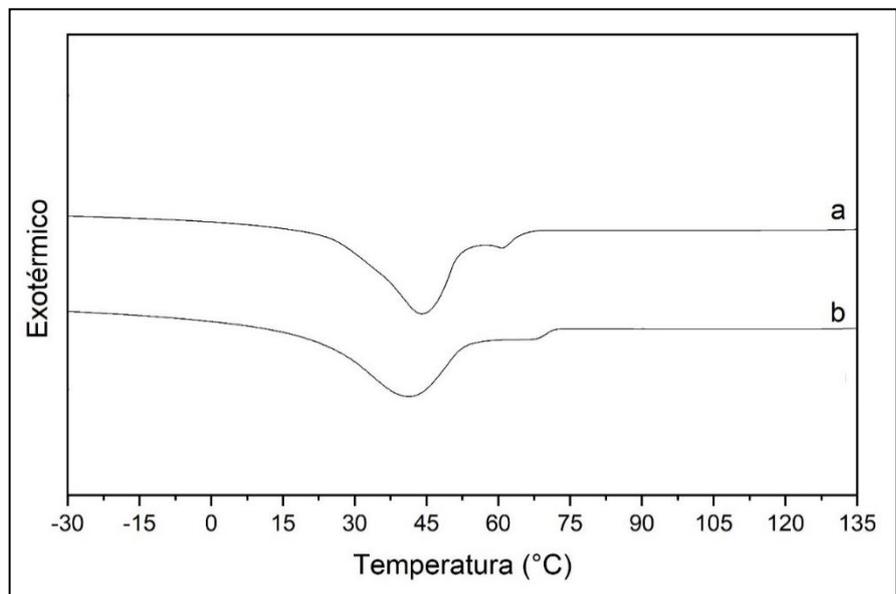
Fonte: Autor (2024)

Figura 20 - Termograma endotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para a cera de abelha pura (a) e nanopartícula lipídica (b)



Fonte: Autor (2024)

Figura 21 - Termograma exotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para a cera de abelha pura (a) e nanopartícula lipídica (b)



Fonte: Autor (2024)

A temperatura de fusão (T_m) da cera de abelha pura é marcada por um valor de $54,72^\circ\text{C}$, caracterizando sua consistência sólida em condições ambientais normais. Essa elevada T_m sugere uma estrutura molecular complexa, com ligações fortes, demandando uma quantidade de energia considerável para romper essas interações durante o processo de fusão. A

temperatura de cristalização (T_c) foi de $44,48^\circ\text{C}$, representando o ponto de transição da fase líquida para a fase sólida. A cera também não apresenta uma temperatura de transição vítrea, indicando uma transição mais gradual entre o estado vítreo e o estado sólido.

Ao analisar as nanopartículas lipídicas, observou-se uma redução tanto na temperatura de fusão (T_m) quanto na temperatura de cristalização (T_c) em comparação com a cera de abelha pura, sendo registrada a $49,04^\circ\text{C}$ e $41,94^\circ\text{C}$, respectivamente. Este fenômeno sugere uma modificação na organização molecular das nanopartículas, tornando as transições de fase menos energéticas.

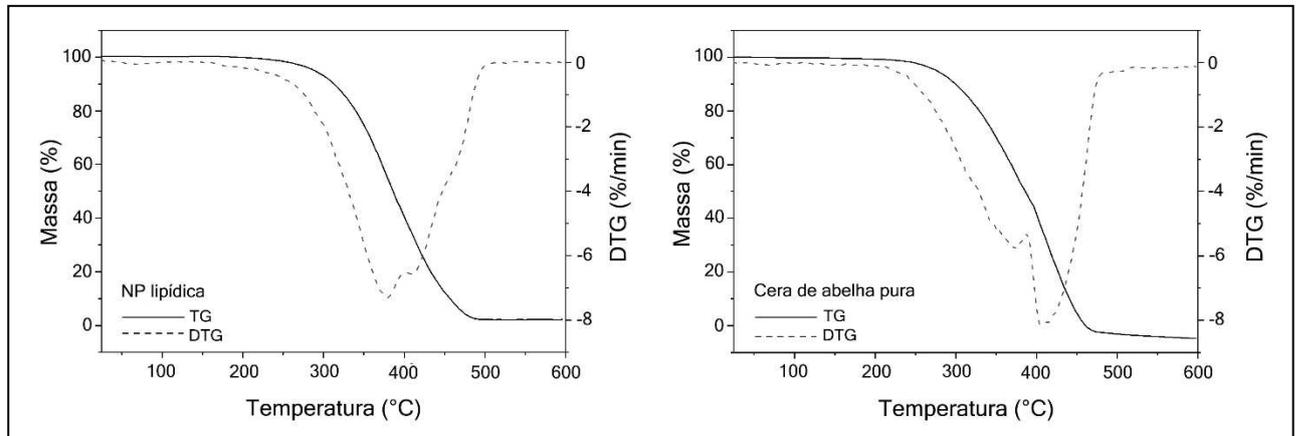
A comparação desses dados evidencia que a nanoestruturação da cera de abelha pura altera as suas propriedades térmicas. As diferenças nas temperaturas de fusão e cristalização, bem como nas energias associadas, indicam modificações na organização molecular durante o processo de formação das nanopartículas, porém devemos lembrar que não são modificações acentuadas pois nas nanopartículas de cera de abelha há a presença de surfactante e outras substâncias.

Na Figura 22 estão apresentados os gráficos de TGA e DTG dos materiais estudados, os quais foram investigados a estabilidade térmica. A partir dos dados (Tabela 7) extraídos dos gráficos, observamos uma temperatura inicial de decomposição (T_i) de 240°C e uma temperatura final (T_f) de 480°C para a cera de abelha pura, a qual resistiu antes de entrar em processo de decomposição indicando que mantém sua estabilidade estrutural nesta faixa de temperatura.

Para as nanopartículas lipídicas sólidas observou-se uma temperatura inicial de decomposição (T_i) de 220°C e final (T_f) de 490°C sendo notável que a substância possui uma estabilidade térmica semelhante à cera de abelha pura. A ausência de resíduo em ambas substâncias analisadas sugere uma completa decomposição das amostras no intervalo de temperaturas analisado.

Ambas as amostras exibiram uma faixa de temperaturas de decomposição ampla, indicando a formação de diversos constituintes voláteis. A semelhança nas temperaturas de início e fim sugere que a formação das nanopartículas lipídicas não alterou significativamente as características térmicas da cera de abelha.

Figura 22 - Termogramas da análise termogravimétrica (TGA) da cera de abelha pura e nanopartícula lipídica



Fonte: Autor (2024)

Tabela 7 - Dados obtidos a partir das curvas de TGA e DTG

Amostra	TGA			DTG	
	T _i (°C)	T _f (°C)	Perda de massa (%)	Etapas da degradação	T _{max} (°C)
Cera de abelha pura	240	480	100	Etapa 1	370
				Etapa 2	410
NP lipídica	220	490	100	Etapa 1	380
				Etapa 2	410

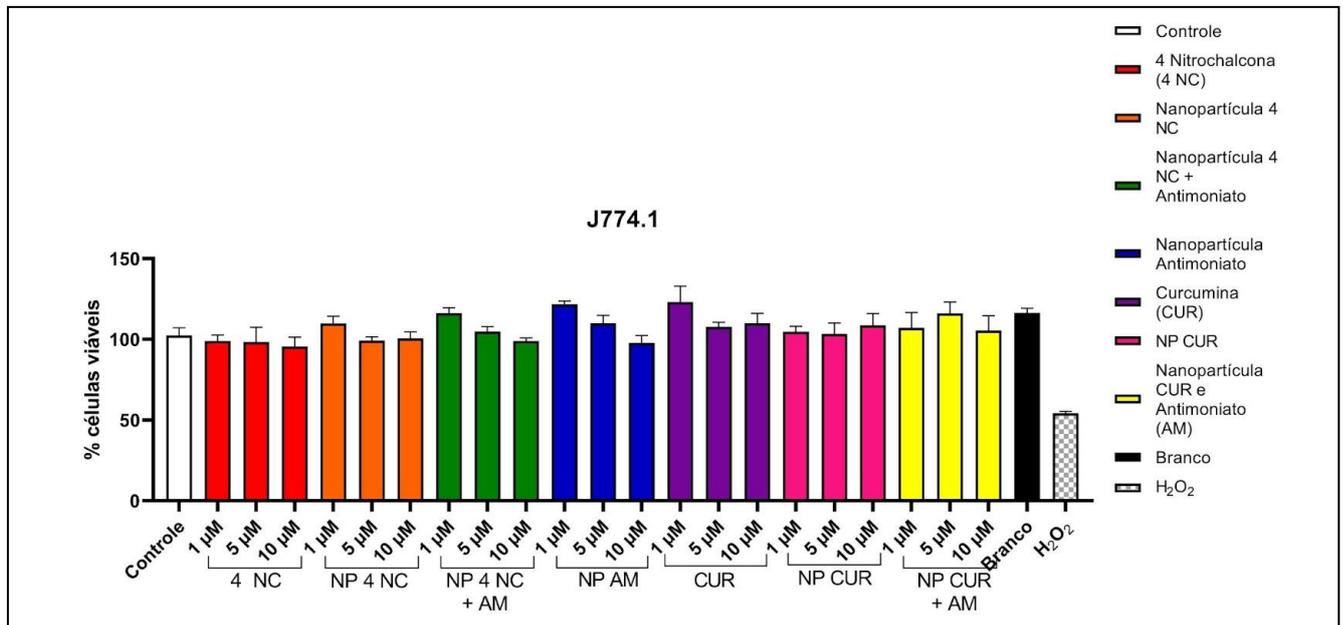
Fonte: Autor (2024)

3.3.7 Atividade leishmanicida

Devido aos tratamentos limitados para a leishmaniose e a toxicidade elevada do fármaco convencional, a busca por alternativas terapêuticas faz-se necessário e é de grande interesse por alguns pesquisadores (FATIMA *et al.*, 2016). Desse modo, o presente estudo fornece informações sobre a segurança e a potencial eficácia das formulações testadas em células *in vitro*.

Primeiramente, avaliamos a possível citotoxicidade da 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM, NP AM, CUR, NP CUR, NP CUR + AM e Branco em macrófagos da linhagem J774.1. Das concentrações testadas (1, 5 e 10 μM) nenhuma demonstrou toxicidade para as células conforme demonstrado na Figura 23.

Figura 23 - Macrófagos de linhagem J774.1 foram tratados com diferentes concentrações (1, 5 e 10 μ M) de 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM, CUR, NP CUR, NP CUR + AM. Também foram tratados com RMPI (controle), NP branco (controle positivo) e H₂O₂ (controle positivo). A proliferação dos parasitos foi analisada pelo método de resazurina no tempo de 24 h. A partir do ensaio de proliferação, foi calculada as concentrações que inibiam 50 % das formas promastigotas nesse mesmo tempo. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. **** Diferença significativa comparado com o grupo controle ($p \leq 0,0001$)



Fonte: Autor (2024)

É relevante destacar que estudos anteriores realizados por Assolini *et al.* (2020) evidenciaram citotoxicidade da 4NC livre em concentrações de 10 e 50 μ M em macrófagos peritoneais, linhagem diferente da testada nesse trabalho. No entanto, é interessante observar que, quando a 4NC foi utilizada em sua forma nanoparticulada (NP 4NC), não foi observada citotoxicidade. Isso pode sugerir que a nanopartícula lipídica pode ter influenciado positivamente a segurança da 4NC em relação às células testadas alterando a toxicidade da substância e como consequência reduziu a citotoxicidade nas condições testadas (AZARNEZHAD *et al.*, 2020).

Em relação a CUR, Chaubey *et al.* (2018) conduziram estudos que não identificaram qualquer citotoxicidade, tanto na forma livre quanto na forma nanoparticulada utilizando

quitosana. A ausência de toxicidade em concentrações de 1, 5 e 10 μM nos testes realizados reforça a segurança potencial da CUR na sua forma livre. Esses resultados diferem da observação de citotoxicidade da 4NC estudada por Assolini *et al.* (2020), indicando que diferentes compostos podem responder de maneiras diferentes.

Outro ponto a destacar é que a utilização da cera de abelha na formulação das nanopartículas pode ter influenciado na baixa citotoxicidade nos macrófagos da linhagem J774.1 preservando a viabilidade celular conforme observado na Figura 23. A escolha desse material foi estratégica uma vez que a cera de abelha é conhecida por suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis, sugerindo que as nanopartículas podem interagir de maneira suave com as células, minimizando potencialmente respostas negativas (SUBHA *et al.*, 2018).

Por fim, a análise das concentrações das nanopartículas produzidas testadas (1, 5 e 10 μM) destaca a segurança em relação aos macrófagos J774.1 utilizados no presente estudo. Essa informação é crucial ao considerar possíveis aplicações terapêuticas ou biomédicas dessas substâncias, uma vez que a preservação da viabilidade celular é um indicativo positivo de baixa citotoxicidade.

A partir dos experimentos realizados, investigamos também a atividade direta da 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM, CUR, NP CUR, NP CUR + AM, NP AM e AM, sobre as formas promastigotas de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

Observamos que todas as concentrações de 4 NC na sua forma livre apresentaram uma redução significativa na proliferação de *L. infantum* e *L. amazonensis* em comparação com o grupo controle (Figura 24 e 25) ($p \leq 0,0005$).

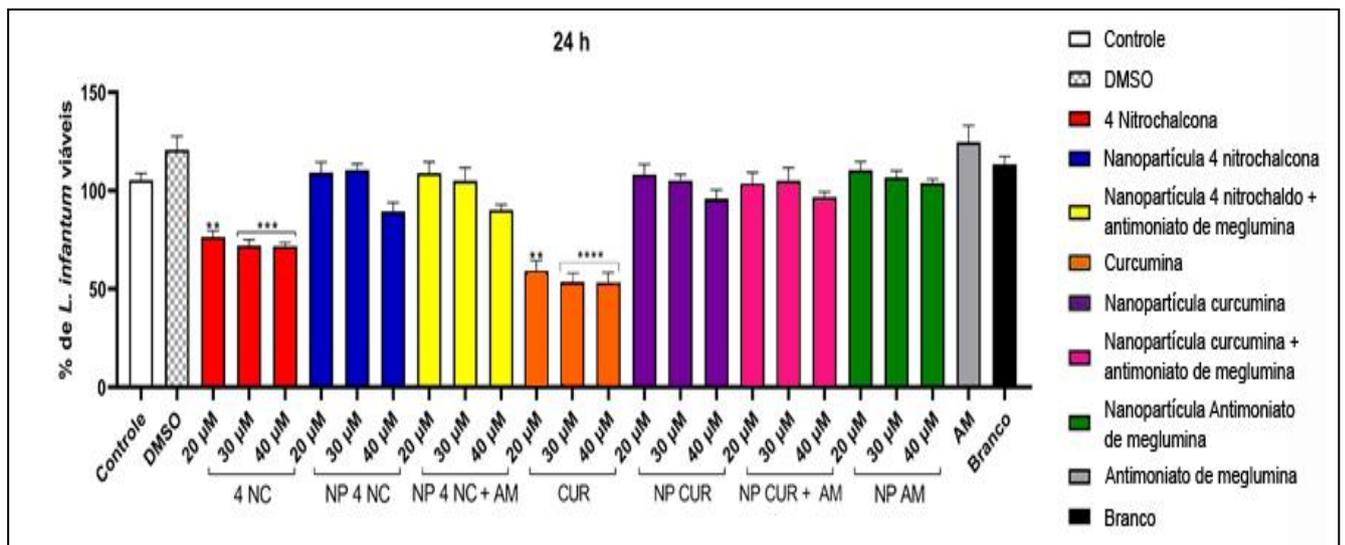
Os resultados obtidos para a CUR seguiram um padrão semelhante aos encontrados com a 4 NC, tanto para a espécie *L. infantum* como a *L. amazonensis*. Apenas a forma livre da curcumina nas concentrações testadas demonstraram uma redução significativa na viabilidade das promastigotas ($p \leq 0,0001$).

Além disso, notamos que enquanto a forma livre da 4NC e CUR exibiram efeito nas promastigotas, as nanopartículas produzidas não exibiram efeito bem como também o AM na sua forma livre.

Em relação às pesquisas anteriores com 4 NC em modelos experimentais de leishmaniose, observa-se uma lacuna na literatura. Boeck *et al.* (2006) demonstraram que chalconas nitrosiladas têm efeito anti-amastigota e promastigota *in vitro* e são capazes de reduzir a infecção murina por *L. amazonensis*. Estudo conduzido por Assolini *et al.* (2020), mostraram também uma redução da viabilidade apenas na forma livre da 4NC sobre a forma promastigota de *L.*

amazonensis em todas as concentrações testadas (0,1 - 100 μ M), porém ao testar na forma nanoparticulada foi observado que não houve redução da viabilidade celular.

Figura 24 - Formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram tratadas com diferentes concentrações (20, 30 e 40 μ M) de 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM, CUR, NP CUR, NP CUR + AM e NP AM. Também foram tratados com M199 (controle), DMSO (veículo), AM (controle positivo) e nanopartícula branco (controle positivo). A proliferação dos parasitos foi analisada pelo método de resazurina no tempo de 24 h. A partir do ensaio de proliferação, foi calculada as concentrações que inibiam 50 % das formas promastigotas nesse mesmo tempo. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** Diferença significativa comparado com o grupo controle ($p \leq 0,001$) e *** ($p \leq 0,0005$).



Fonte: Autor (2024)

Em outra abordagem, Akbari *et al.* (2023) utilizaram nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) carregadas com artemisinina, um metabólito secundário derivado da *Artemisia annua* amplamente utilizado na fitoterapia tradicional chinesa. Os resultados revelaram a atividade direta da artemisinina livre na inibição do crescimento e proliferação de formas promastigotas de *L. infantum*. No entanto, a forma nanoparticulada não exibiu efeito tóxico direto, o que reforça a limitada eficácia das nanopartículas sobre as formas promastigotas.

Conforme Akbari *et al.* (2023) a eficácia terapêutica das nanopartículas lipídicas sólidas só foi observada em macrófagos infectados e no modelo experimental de infecção em camundongos BALB/c. Os autores atribuíram esse aumento de eficácia ao aumento da

biodegradabilidade e biodisponibilidade das nanopartículas, sendo fagocitadas por macrófagos residentes. As nanopartículas possuem a capacidade de se decompor ou serem metabolizadas dentro do ambiente biológico, no caso os macrófagos, e isso pode facilitar a liberação controlada e gradual do fármaco ativo, garantindo uma exposição prolongada às formas promastigotas do parasita. Quando as nanopartículas são fagocitadas por macrófagos, elas se tornam efetivamente internalizadas e podem direcionar a carga terapêutica para o interior das células parasitadas oferecendo maior biodisponibilidade do fármaco. Essa internalização dos macrófagos é muito importante pois o parasita reside no interior da célula do sistema imunológico. A fagocitose das nanopartículas pelos macrófagos oferece uma rota eficaz para a entrega localizada do agente terapêutico nas proximidades das células parasitadas. Esse direcionamento preciso aumenta a eficácia terapêutica ao concentrar a ação do fármaco nas regiões onde o parasita está ativo. Quando as nanopartículas são aplicadas diretamente nas formas promastigota possivelmente precisa ser metabolizada intracelularmente para manifestar seu efeito terapêutico, se as formas promastigotas não possuírem as condições adequadas para essa ativação intracelular, a eficácia das nanopartículas pode ser comprometida.

Ainda, neste modelo testado pelos autores os resultados sugerem que as nanopartículas de artemisina além da eficácia em reduzir a carga parasitária houve também a diminuição da inflamação nos órgãos afetados, como o baço e fígado, o que é bom para reduzir dano a esses órgãos contribuindo para a recuperação do paciente. Em contraste, a artemisina na sua forma livre eliminou vestígios de parasitas do baço e fígado, mas causou uma resposta inflamatória mais intensa (AKBARI *et al.*, 2023).

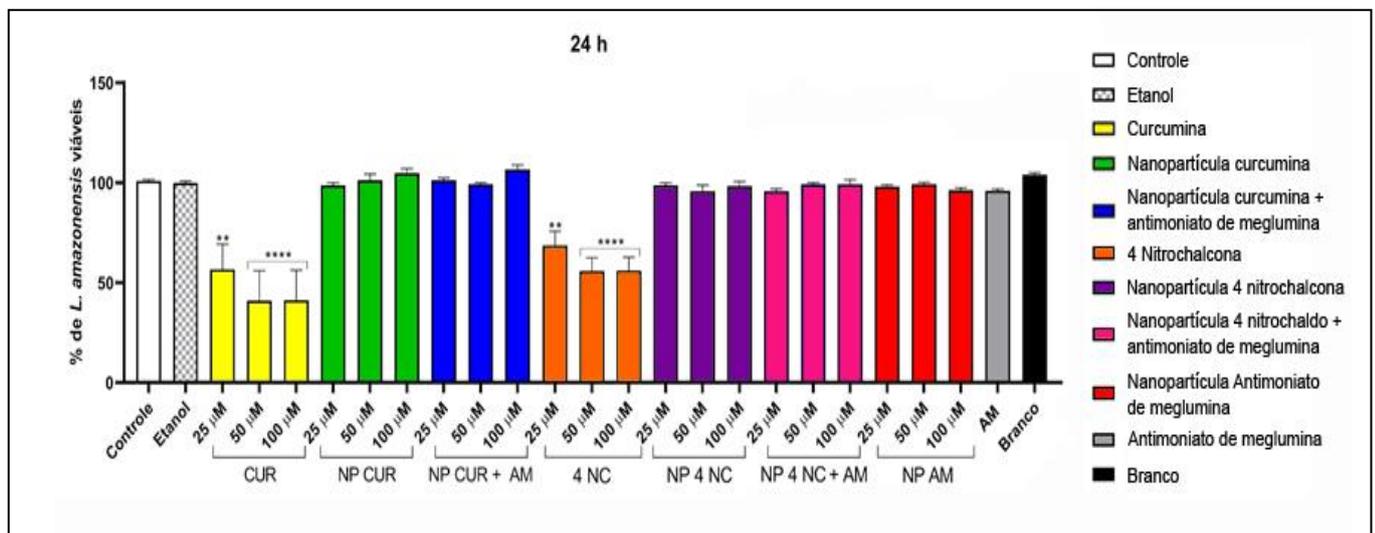
Embora a eficácia da curcumina livre seja reconhecida na literatura para diferentes cepas de *Leishmania*, como *L. donovani*, *L. major* e *L. tropica* (DAS *et al.*, 2008; SALEHEEN *et al.*, 2002), seu uso prático é limitado devido à rápida degradação, baixa disponibilidade oral e solubilidade aquosa limitada. A combinação da CUR com nanomateriais tem sido proposta como uma estratégia para melhorar suas propriedades como a solubilidade, proteger contra a degradação, aumentar a biodisponibilidade e entrega controlada a alvos específicos (AMINI *et al.*, 2023).

Em relação à eficácia das formulações nanoparticuladas de curcumina frente às formas promastigotas, nenhum dos níveis de concentração testados apresentou resultados positivos. Esses achados são diferentes do encontrado na literatura existente, onde nanopartículas de ouro revestidas com curcumina, curcumina lipossômica e curcumina nanotizada demonstraram efeito anti-*Leishmania* contra diferentes espécies na forma promastigota, como *L. major*, *L. major* e *L. donovani*, respectivamente. Esses resultados podem ser atribuídos a diversas

variáveis que precisam ser estudadas detalhadamente para entender a influência nos resultados observados na literatura como a composição das nanopartículas, suas propriedades físicas e químicas específicas, assim como sua capacidade de penetração celular e interações com as células parasitárias. (AMINI *et al.*, 2023; BAFGHI *et al.*, 2021; TIWARY *et al.*, 2017).

Conforme descrito anteriormente, somente os resultados obtidos com a 4NC e a CUR em sua forma livre apresentaram redução significativa na viabilidade das formas parasitárias em estudo, enquanto as nanopartículas não resultaram em nenhum efeito. Esse efeito pode ser atribuído à possível resposta xenobiótica desencadeada pela presença direta dessas substâncias nas células parasitadas, já que a exposição das formas promastigotas a substâncias químicas estranhas, como a 4NC e CUR, pode induzir estresse celular e ativar mecanismos de resposta celular. Esse estresse celular pode levar à ativação de vias de sinalização de defesa, levando a alterações na viabilidade celular e na capacidade replicativa (GOETZ *et al.*, 2016).

Figura 25 - Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações (25, 50 e 100 μ M) de CUR, NP CUR, NP CUR + AM, 4NC, NP 4NC, NP 4NC + AM e NP AM. Também foram tratados com M199 (controle), etanol (veículo), AM (controle positivo) e nanopartícula branco (controle positivo). A proliferação dos parasitos foi analisada pelo método de resazurina no tempo de 24 h. A partir do ensaio de proliferação, foi calculada a concentração que inibiu 50 % das formas promastigotas nesse mesmo tempo. Os valores representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** Diferença significativa comparado com o grupo controle ($p \leq 0,001$) e **** ($p \leq 0,0001$).



Fonte: Autor (2024)

No que diz respeito ao antimoniato de meglumina, apesar de seu amplo uso clínico no tratamento da leishmaniose, seus mecanismos farmacológicos e toxicológicos permanecem incertos. Estudos iniciais sugeriram que o antimônio interfere na β -oxidação de ácidos graxos e na glicólise do parasita. A interrupção dessas vias metabólicas críticas resultaria na depleção dos níveis intracelulares de ATP no parasita. O ATP é a principal moeda de energia nas células, e a sua falta compromete funções vitais, levando à diminuição da capacidade de sobrevivência e replicação do parasita. Outra hipótese propõe que o antimônio (Sb^{V}) age como um pró-fármaco, sendo convertido intracelularmente na forma trivalente mais tóxica, o antimônio trivalente (Sb^{III}). Esta forma é associada à toxicidade do antimônio e acredita-se ser responsável pelos efeitos terapêuticos (BERMAN *et al.*, 1987; DEMICHELI *et al.*, 2002).

Por fim, nossa interpretação sugere que as nanopartículas produzidas podem não ter um efeito direto como explicado anteriormente, mas, em vez disso, age como um veículo para manter os princípios ativos protegidos, preservando suas propriedades químicas e biológicas de maneira a ser metabolizada intracelularmente. Além disso, acreditamos que a nanopartícula desempenha um papel crucial na distribuição controlada do composto no local alvo, permitindo liberação gradual e minimizando a toxicidade, conforme sugerido por Alanazi e Said (2022). Contudo, para uma compreensão mais completa, são necessários estudos adicionais, especialmente *in vivo*, para analisar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção da formulação nanoparticulada.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo destacam a relevância das nanopartículas lipídicas sólidas a base de cera de abelha como promissores veículos de entrega para compostos terapêuticos, especialmente no contexto do tratamento da leishmaniose. As características físico-químicas das nanopartículas lipídicas sólidas, incluindo tamanho, potencial zeta e estabilidade térmica, foram cuidadosamente avaliadas e demonstraram estar alinhadas com os requisitos desejados para aplicações biomédicas.

A análise do tamanho das nanopartículas revelou diâmetros médios dentro da faixa submicrométrica, uma escolha estratégica para otimizar a eficiente circulação na corrente sanguínea e favorecer a entrega direcionada a células-alvo. A estabilidade coloidal eficaz, evidenciada pelo potencial zeta negativo, sugere a prevenção da formação de agregados, contribuindo para a segurança e eficácia das nanopartículas durante o armazenamento e administração.

A caracterização por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) proporcionou uma compreensão detalhada das interações moleculares nos componentes das nanopartículas, confirmando a ausência de interações físico-químicas indesejadas entre os fármacos e os constituintes das nanopartículas lipídicas sólidas.

Os estudos térmicos, por meio de análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA), ofereceram informações importantes sobre as propriedades térmicas das nanopartículas lipídicas sólidas. A redução nas temperaturas de fusão e cristalização indicou modificações na organização molecular das nanopartículas, sugerindo transições de fase menos energéticas e potencialmente contribuindo para uma liberação controlada dos compostos terapêuticos.

Além disso, os ensaios de atividade leishmanicida forneceram evidências sobre a eficácia das formulações testadas em células *in vitro*. A ausência de citotoxicidade nas concentrações estudadas para macrófagos J774.1 indica um perfil de segurança favorável, destacando a biocompatibilidade das nanopartículas e a preservação da viabilidade celular.

A análise da atividade direta sobre as formas promastigotas de *Leishmania* revelou que as nanopartículas, apesar de não exibirem efeito tóxico direto, podem atuar como veículos eficazes para os fármacos, possibilitando uma liberação controlada e gradual dos princípios ativos no ambiente intracelular. Essa estratégia pode contribuir para a eficácia terapêutica ao concentrar a ação do fármaco nas regiões onde o parasita está ativo.

Embora os resultados *in vitro* sejam promissores, é importante destacar a necessidade de estudos adicionais, especialmente *in vivo*, para aprofundar a compreensão da absorção, distribuição, metabolismo e excreção da formulação nanoparticulada. Esses estudos poderiam corroborar e expandir as descobertas deste trabalho, fornecendo uma base sólida para a potencial aplicação clínica das nanopartículas produzidas no tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

AKBARI, M. *et al.* **A novel outlook in the delivery of artemisinin: production and efficacy in experimental visceral leishmaniasis.** *Pathogens and Global Health.* 2023.

ALANAZI, A. D.; SAID, M. B. **Plant Bioactive Ingredients in Delivery Systems and Nanocarriers for the Treatment of Leishmaniasis: An Evidence-Based Review.** Iranian Journal of Parasitology. Vol. 17 (4), p. 458-472, 2022.

AMINI, S. M. *et al.* **The Therapeutic Effects of Curcumin-coated Gold Nanoparticle Against Leishmania Major Causative Agent of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL): An *In vitro* and *In vivo* Study.** Current Microbiology. Vol. 80 (104), p. 1-12, 2023.

ARÉVALO, J. M. C. *et al.* **Preparation and characterization of 4-nitrochalcone-folic acid-poly(methyl methacrylate) nanocapsules and cytotoxic activity on HeLa and NIH3T3 cells.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. Vol. 54, 2019.

ASSOLINI, J. P. *et al.* **4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. n* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity.** European Journal of Pharmacology. Vol. 884, 2020.

ASSOLINI, J. P. *et al.* **Nanomedicine in leishmaniasis: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview.** European Journal of Pharmacology. Vol. 923, 2022.

AUGUSTINE, R. *et al.* **Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components.** Materials Today Communications. Vol. 25, 2020.

AZARNEZHAD, A. *et al.* **Toxicological profile of lipid-based nanostructures: are they considered as completely safe nanocarriers?.** Critical Reviews in Toxicology. Vol. 50 (2), p. 148-176, 2020.

BAFGHI, A. F. *et al.* **A novel delivery of curcumin by the efficient nanoliposomal approach against *Leishmania major*.** Preparative Biochemistry & Biotechnology. Vol. 51 (10), p. 990-997, 2021.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. **Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes.** *Biochemical Pharmacology*. Vol. 36 (2), p. 197-201, 1987.

BOECK, P. *et al.* **Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 14 (5), p. 1538-1545, 2006.

CAMPOS, J. R. *et al.* **Chapter 1 - Solid lipid nanoparticles (SLN): prediction of toxicity, metabolism, fate and physicochemical properties.** *Nanopharmaceuticals*. Vol. 1, p. 1-15, 2020.

CHAUBEY, P. *et al.* **Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against *Leishmania donovani*.** *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 111, p. 109-120, 2018.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. **Zeta Potential Measurement. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery.** Vol. 697, p. 63-70, 2011.

CORDEIRO, A. P. *et al.* ***In vitro* synergic activity of diethyldithiocarbamate and 4-nitrochalcone loaded in beeswax nanoparticles against melanoma (B16F10) cells.** *Materials Science and Engineering: C*. Vol. 120, 2021

DANAEI, M. *et al.* **Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems.** *Pharmaceutics*. Vol. 10 (2), 2018.

DARANDALE, S. S.; VAVIA, P. R. **Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization.** *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. Vol. 75, p. 315-322, 2013.

DAS, R. *et al.* **Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in Leishmania donovani.** Apoptosis. Vol. 13, p. 867-882, 2008.

DEMICHELI, C. *et al.* **Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. Vol. 1570 (3), p. 192-198, 2002.

DEMICHELI, C. *et al.* **Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate.** BioMetals. Vol. 12, 1999.

FATIMA, N. *et al.* **Fungal Metabolites and Leishmaniasis: A Review.** British Journal of Pharmaceutical Research. Vol. 12 (2), p. 1-12, 2016.

FRÉZARD *et al.* **Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol. 33 (7), p. 841-846, 2000.

GOETZ, F. *et al.* **Sea lampreys elicit strong transcriptomic responses in the lake trout liver during parasitismo.** BMC Genomic. Vol. 675, 2016.

IRSHAD, H.; KHALID, M. Z. **Types and Treatments of Leishmaniasis.** Biomedical Journal of Scientific and Technical Research. Vol. 42 (5), p. 34037-34042, 2022.

JYOTHI, N. V. N. *et al.* **Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency.** Journal of Microencapsulation. Vol. 27 (3), p. 187-197, 2010.

LINCE, F. *et al.* **Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery.** Chemical Engineering Research and Design. Vol. 89 (11), p. 2410-2419, 2011.

MAZUR, K. L. *et al.* **Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death *in vitro*.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 176 (1), p. 507-512, 2019.

NAVAEI, A. *et al.* **Double-walled microspheres loaded with meglumine antimoniate: preparation, characterization and *in vitro* release study.** Drug Development and Industrial Pharmacy. 2013.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). **Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Américas.** Nº 9, 2020.

PRESTIDGE, C. A.; RAO, S.; TAN, A. **Transforming Lipid-Based Oral Drug Delivery Systems into Solid Dosage Forms: An Overview of Solid Carriers, Physicochemical Properties, and Biopharmaceutical Performance.** Pharmaceutical Research. Vol. 30, p. 2993-3017, 2013.

RAMOS, M. A. S. *et al.* **Nanotechnological strategies for systemic microbial infections treatment: A review.** International Journal of Pharmaceutics. Vol. 589, 2020.

RIAZ, A. *et al.* **Formulation of topical NLCs to target macrophages for cutaneous leishmaniasis.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. Vol. 54, 2019.

SALEHEEN, D. *et al.* **Latent activity of curcumin against leishmaniasis *in vitro*.** Biological and Pharmaceutical Bulletin. Vol. 25 (3), p. 386-389, 2002.

SOUZA, C.; DE FREITAS, L. A. P.; CAMPOS, P. M. B. G. M. **Topical Formulation Containing Beeswax-Based Nanoparticles Improved *In vivo* Skin Barrier Function.** AAPS PharmSciTech. Vol. 18, p. 2505–2516, 2017.

STEVERDING, D. **The history of leishmaniasis.** Parasites & Vectors. Vol. 10 (82), 2017.

SUBHA, V. *et al.* **Sustained drug delivery of capecitabine using natural (bee wax) and synthetic polymer (PLGA).** Drug Design Development & Therapy. Vol. 2 (3), 2018.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. **An update on pharmacotherapy for leishmaniasis.** Expert Opinion on Pharmacotherapy. Vol. 1 (2), p. 237-252, 2015.

TANNER, N.; LICHTENBERG-KRAAG, B. **Identification and Quantification of Single and Multi-Adulteration of Beeswax by FTIR-ATR Spectroscopy**. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol. 121 (12), 2019.

TIWARI, N. *et al.* **Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis**. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 18 (1), 2018.

TIWARY, B. *et al.* **Nanotized Curcumin and Miltefosine, a Potential Combination for Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 61 (3), p. 1-13, 2017.

VILLANUEVA-FLORES, F. *et al.* **Understanding cellular interactions with nanomaterials: towards a rational design of medical nanodevices**. *Nanotechnology*. Vol. 31 (13), 2020.

YE, K. *et al.* **Use of caprylic/capric triglyceride in the encapsulation of dementholized peppermint fragrance leading to smaller and better distributed nanocapsules**. *RSC Advances*. Vol. 6, p. 84119-84162, 2016.

CAPÍTULO 4

4 ENCAPSULAÇÃO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS/POLIMÉRICAS

4.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem emergido como uma poderosa ferramenta no campo da entrega de fármacos, oferecendo soluções inovadoras para os desafios associados à administração de medicamentos. A utilização de nanopartículas para encapsular agentes terapêuticos representa uma área de intensa pesquisa, especialmente no contexto de terapias para doenças infecciosas, câncer e condições crônicas.

No cenário farmacêutico, a eficiência de encapsulação de princípios ativos em nanopartículas desempenha um papel crucial na determinação da eficácia terapêutica, pois está diretamente relacionada à farmacocinética, aumentando a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade do medicamento, além de minimizar os efeitos colaterais (MALIK. MUHAMMAD; WAHEED, 2023).

O antimoniato de meglumina, uma substância essencial no tratamento de doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose, possui propriedades terapêuticas notáveis, mas sua eficácia é intrinsecamente vinculada à sua forma de administração (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

As nanopartículas lipídicas têm sido investigadas extensivamente como veículos de entrega de fármacos devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodisponibilidade e capacidade de encapsulação eficiente. No entanto, a busca pela otimização dessas nanopartículas levou ao desenvolvimento de formulações híbridas, combinando componentes lipídicos e poliméricos para explorar sinergias que podem melhorar a eficácia do encapsulamento e, por conseguinte, a eficácia terapêutica (PURI *et al.*, 2009; SIVADASAN *et al.*, 2021).

A necessidade de avançar não apenas na eficiência de encapsulação, mas também na sustentabilidade desses sistemas, levou a um interesse crescente na química verde e em métodos de produção de polímeros a partir de fontes renováveis. O uso de polímeros derivados de óleos vegetais é uma abordagem inovadora que não apenas reduz nossa dependência de recursos não-

renováveis, como o petróleo, mas também aborda o problema da degradabilidade dos materiais poliméricos (SANTIN, 2023).

Diante desse contexto, este estudo propõe aprimorar a eficácia de encapsulação do antimoniato de meglumina em nanopartículas lipídicas/poliméricas em comparação com as nanopartículas lipídicas estudadas no capítulo anterior. Além disso, a ideia é adotar uma abordagem sustentável ao utilizar polímeros derivados de fontes renováveis. A análise comparativa entre essas formulações não apenas poderá fornecer informações importantes sobre a eficácia do encapsulamento, mas também poderá revelar informações sobre as características das nanopartículas.

Ao combinar a utilização de lipídios e a polimerização de monômeros de fontes renováveis na produção de nanopartículas, este estudo não apenas contribui na ciência da entrega de fármacos, mas também representa o caminho em direção a práticas mais ecologicamente responsáveis na nanomedicina.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

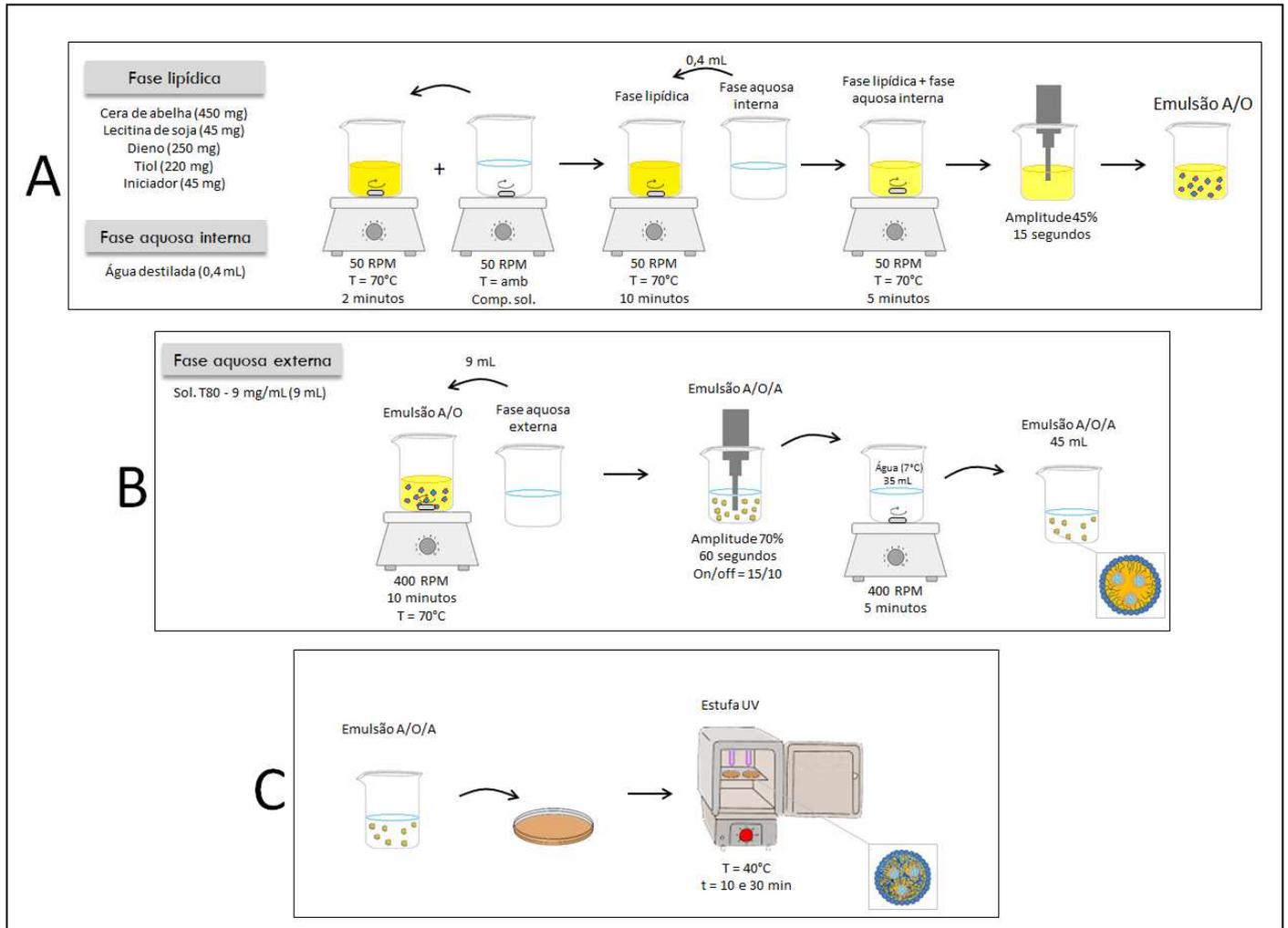
A cera de abelha branca (GM Ceras, Brasil) foi obtida da Chemical Alpha. Os monômeros utilizados foram o tetraquis (3-mercaptopropionato de pentaeritritol) adquiridos da Sigma-Aldrich e o monômero diênico 2-(acrilóiloxi)etil undec-10-enoato sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa (SANTIN, 2023). Como iniciador foi utilizado 2,2- dimetóxi-2-fenilacetofenona da Sigma-Aldrich. Lecitina de soja (Alfa Aesar, Alemanha) e monooleato de polioxietileno-20-sorbitano (Tween 80, Vetec, Brasil) foram utilizados como surfactante. Antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda) foi utilizado como fármaco hidrofílico.

4.2.2 Encapsulamento do antimoniato de meglumina

Duas formulações de nanopartículas foram preparadas seguindo as metodologias estabelecidas em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa. O processo de preparação das nanopartículas foi dividido em duas etapas: a emulsão dupla A/O/A e a fotopolimerização (MAZUR *et al.*, 2019; PEREIRA, 2019; CORDEIRO *et al.*, 2020). A primeira formulação

consistiu em nanopartículas brancas, sem a adição de antimoniato de meglumina. A preparação das nanopartículas está ilustrada na Figura 26 e descrita logo em seguida.

Figura 26 – Etapas da preparação das nanopartículas lipídicas sólidas branco



A – Primeira emulsão (A/O); B – Segunda emulsão (A/O/A); C – Fotopolimerização.

Fonte: Autor (2024)

A etapa inicial da emulsão A/O/A começou com a formação da emulsão A/O. Inicialmente, a fase lipídica foi preparada em um béquer, onde 450 mg de cera de abelha foram fundidos a 70°C, juntamente com 45 mg de lecitina de soja, sob agitação magnética por 2 minutos. Em outro béquer, uma mistura contendo 250 mg do dieno 2-(acrilóiloxi)etil undec-10-enoato, 220 mg do tiol tetraquis (3-mercaptopropionato de pentaeritritol) e 45 mg do iniciador 2,2-dimetóxi-2-fenilacetofenona foi preparada e mantida sob agitação até completa

solubilização. Em seguida, a mistura de monômeros e iniciador foi transferida para o primeiro béquer e agitada magneticamente a 50 rpm por 10 minutos a 70°C.

Para a fase aquosa foi utilizada 0,4mL de água destilada, que foi adicionada a fase lipídica sob agitação magnética a 50 rpm, sendo mantida a agitação por mais 5 minutos. A mistura resultante foi então submetida à sonicação em um ultrassom (Fisher Scientific Model 500 Sonic Dismembrator) por 15 segundos a 45% de amplitude, formando assim a primeira emulsão A/O.

Posteriormente, 9 mL da fase aquosa externa, solução de Tween 80 (9 mg/mL), foram adicionados a emulsão A/O, sendo a mistura agitada a 400 rpm por 10 minutos a 70°C. A emulsão previamente preparada foi sonicada por 1 minuto (15 s on, 10 s off) a 70% de amplitude, resultando na formação da emulsão dupla A/O/A. Finalmente, a emulsão dupla A/O/A foi adicionada à 35 mL de água destilada a 7°C sob agitação magnética a 400 rpm por 5 minutos para promover o rápido resfriamento das nanopartículas lipídicas/poliméricas, obtendo-se, ao final, aproximadamente 45 mL da emulsão diluída.

Posteriormente, a emulsão final foi transferida para placas de petri de 75 mm e colocada em uma estufa equipada com lâmpadas UV para iniciar o processo de fotopolimerização. As bases das placas de petri foram posicionadas a uma distância de 4 cm das lâmpadas. A estufa foi fechada e uma temperatura de 40°C foi mantida internamente pelas lâmpadas durante todo o tempo de reação. Foram utilizados dois tempos de reação, 10 e 30 minutos, para verificar a influência no teor de gel.

Realizando pequenas adaptações e seguindo o mesmo procedimento utilizado na preparação das nanopartículas brancas, foram preparadas nanopartículas com a adição de antimoniato de meglumina. Nas formulações com antimoniato de meglumina, uma solução aquosa dessa substância (300 mg/mL) foi utilizada em vez de água destilada na fase aquosa interna. A Tabela 8 apresenta as formulações preparadas para referência.

Tabela 8 - Formulações preparadas pelo método de dupla emulsão A/O/A seguida da fotopolimerização

Formulação	Fase lipídica					Fase aquosa interna		Fase aquosa externa
	CA	LS	AEU	PETMP	DMPA	Sol. AM (300 mg/mL)	AD	Sol. T80 (9mg/mL)
BRANCO	4,3	0,4	2,4	2,1	0,4	-	3,9	86,5
AM	4,3	0,4	2,4	2,1	0,4	3,9	-	86,5

Valores expresso em porcentagem da emulsão A/O/A m/m (%); CA: Cera de abelha; LS: Lecitina de soja; AEU: 2-(acrilóiloxi)etil undec-10-enoato; PETMP: tetraquis (3-mercaptopropionato de

pentaeritritol); DMPA: 2,2- dimetóxi-2-fenilacetofenona; Sol.: Solução; T80: Tween 80; AD: Água destilada; AM: Antimoniato de meglumina. Fonte: Autor (2024)

4.2.3 Diâmetro médio

A metodologia está descrita no item 3.2.3 do capítulo 3.

4.2.4 Potencial zeta

A metodologia está descrita no item 3.2.4 do capítulo 3.

4.2.5 Eficiência de encapsulação

A metodologia está descrita no item 3.2.6 do capítulo 3.

4.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A metodologia está descrita no item 3.2.8 do capítulo 3.

4.2.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A metodologia está descrita no item 3.2.9 do capítulo 3.

4.2.8 Análise termogravimétrica (TGA)

A metodologia está descrita no item 3.2.10 do capítulo 3.

4.2.9 Teor de gel

Os teores de gel foram determinados no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) a partir de uma solução com concentração conhecida das nanopartículas lipídica/polimérica em tetraidrofurano

(THF), deixando-o solubilizar por 48 h. Posteriormente, a fase solúvel foi filtrada com o auxílio de uma seringa de vidro e um filtro de nylon, com poros de 0,45 μm . Os frascos e os filtros utilizados foram colocados para secar em uma estufa de convecção forçada a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

O teor de gel foi então calculado com base na Equação 4 e 5, onde primeiramente se realizou o cálculo da quantidade de polímero retido (considerando o polímero retido no frasco e no filtro, Equação 4) e depois, o cálculo da porcentagem de polímero reticulado (Equação 5).

$$m_{\text{PR}} = (m_{\text{VS}} + m_{\text{FS}}) - (m_{\text{V}} - m_{\text{F}}) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$P_{\text{R}} = \frac{m_{\text{PR}}}{m_{\text{P}}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde m_{PR} é a massa do polímero retido após a evaporação dos voláteis, m_{VS} é a massa do frasco seco, m_{FS} é a massa do filtro seco, m_{V} é a massa do frasco utilizado, m_{F} é a massa do filtro, m_{P} é a massa do polímero utilizado para preparar a solução e P_{R} a porcentagem do polímero reticulado.

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.3.1 Tamanho das nanopartículas e potencial zeta

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados do diâmetro médio, PDI e o potencial zeta das nanopartículas produzidas, os quais fornecem as características físicas e coloidais desses sistemas.

Tabela 9 - Caracterização das nanopartículas em relação ao tamanho médio ($D_p \pm S$), índice de polidispersão ($PdI \pm S$) e potencial zeta ($\xi \pm S$)

Nanopartícula lipídica/polimérica	$D_p \pm S$ (nm)	$PdI \pm S$	$\xi \pm S$ (mV)
Branco	229,23 \pm 2,79	0,230 \pm 0,0082	-34,78 \pm 1,17
AM	233,16 \pm 2,23	0,212 \pm 0,012	-35,22 \pm 0,92

Fonte: Autor (2024)

Observa-se que o diâmetro médio das nanopartículas com antimoniato de meglumina (233,16 nm) é apenas ligeiramente maior do que o das nanopartículas brancas (229,3 nm), indicando que o tamanho é pouco afetado. Este pequeno aumento dentro do erro de medida

pode ser devido à presença do antimoniato de meglumina, que ocupou espaço dentro das nanopartículas, resultando em um aumento no tamanho. A diferença no tamanho é muito pequena, indicando que o antimoniato de meglumina não afetou a estabilidade das partículas.

Os dados do diâmetro médio sugerem que as nanopartículas estão na faixa desejada para facilitar a absorção celular eficaz. Este tamanho adequado não apenas aumenta a probabilidade de penetração em tecidos e células-alvo, mas também minimiza o risco de acúmulo em órgãos como o fígado, diminuindo potenciais efeitos adversos (LINCE *et al.*, 2011; STEINHAUSER *et al.*, 2006).

O PDI é uma medida da distribuição do tamanho das partículas. Valores baixos de PDI (como 0,212 na amostra com antimoniato de meglumina) indicam uma distribuição mais uniforme de tamanhos de partículas. Comparativamente, a nanopartícula branca também possui um PDI similar (0,230), sugerindo uma distribuição relativamente homogênea das nanopartículas. Essa consistência nos valores de PDI em ambas as amostras sugere uma uniformidade no tamanho das partículas, indicando uma síntese bem controladas.

O potencial zeta reflete a estabilidade e carga superficial das partículas. Valores negativos (como -34,78 mV na nanopartícula branco e -35,22 mV na nanopartícula com antimoniato de meglumina) indicam uma boa estabilidade coloidal, onde as cargas repulsivas entre as partículas impedem a agregação, preservando a integridade das nanopartículas. A proximidade dos valores de potencial zeta em ambas as amostras sugere que o processo de encapsulação não comprometeu significativamente a estabilidade coloidal das nanopartículas.

4.3.2 Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina nas nanopartículas lipídicas/poliméricas foi em média 25,3%. Por outro lado, as nanopartículas lipídicas referente ao capítulo 3 apresentaram eficiência de encapsulação de 20,1% (Tabela 10).

Tabela 10 - Eficiência de encapsulação do antimoniato de meglumina

Nanopartícula	Eficiência de encapsulação \pm S (%)
Lipídica	20,1 \pm 0,25
Lipídica/polimérica	25,3 \pm 0,22

Fonte: Autor (2024)

A diferença de 5,2% na eficiência de encapsulação entre as duas formulações pode parecer não tão importante à primeira vista. No entanto, é crucial ressaltar que a concentração do antimoniato de meglumina encapsulado evidenciado no estudo anterior, pode ser uma variável determinante nesse contexto. Conforme descrito anteriormente a concentração de antimoniato de meglumina utilizada foi de 300 mg/mL, concentração mínima utilizada nos tratamentos convencionais.

A inclusão do polímero na formulação provavelmente desempenhou um papel crucial na melhoria das propriedades estruturais das nanopartículas, contribuindo para a formação de uma estrutura mais compacta e organizada. Esse aprimoramento estrutural pode ter permitido que as nanopartículas acomodassem uma quantidade maior do fármaco, sugerindo uma possível explicação para o aumento observado na eficiência de encapsulação. Além disso, a alta taxa de reticulação das nanopartículas pode ter criado barreiras físicas e químicas que pode ter efeitos adicionais na liberação controlada do fármaco, contribuindo para uma eficiência de encapsulamento um pouco mais elevada.

Entretanto, mesmo com essas melhorias, a eficiência de encapsulação ainda se manteve em níveis relativamente baixos. Esse resultado suscita a reflexão sobre a alta concentração de antimoniato de meglumina utilizada, levantando a possibilidade de que tenha saturado o processo de encapsulamento. Parte do fármaco pode ter excedido a capacidade de encapsulamento das nanopartículas, resultando em uma fração do antimoniato de meglumina sendo exposta à fase externa das partículas (JYOTHI *et al.*, 2010).

Portanto, enquanto a introdução do polímero trouxe melhorias estruturais e potenciais benefícios, a questão da concentração do antimoniato de meglumina permanece como um ponto crucial a ser considerado e investigado mais detalhadamente.

4.3.3 Morfologia

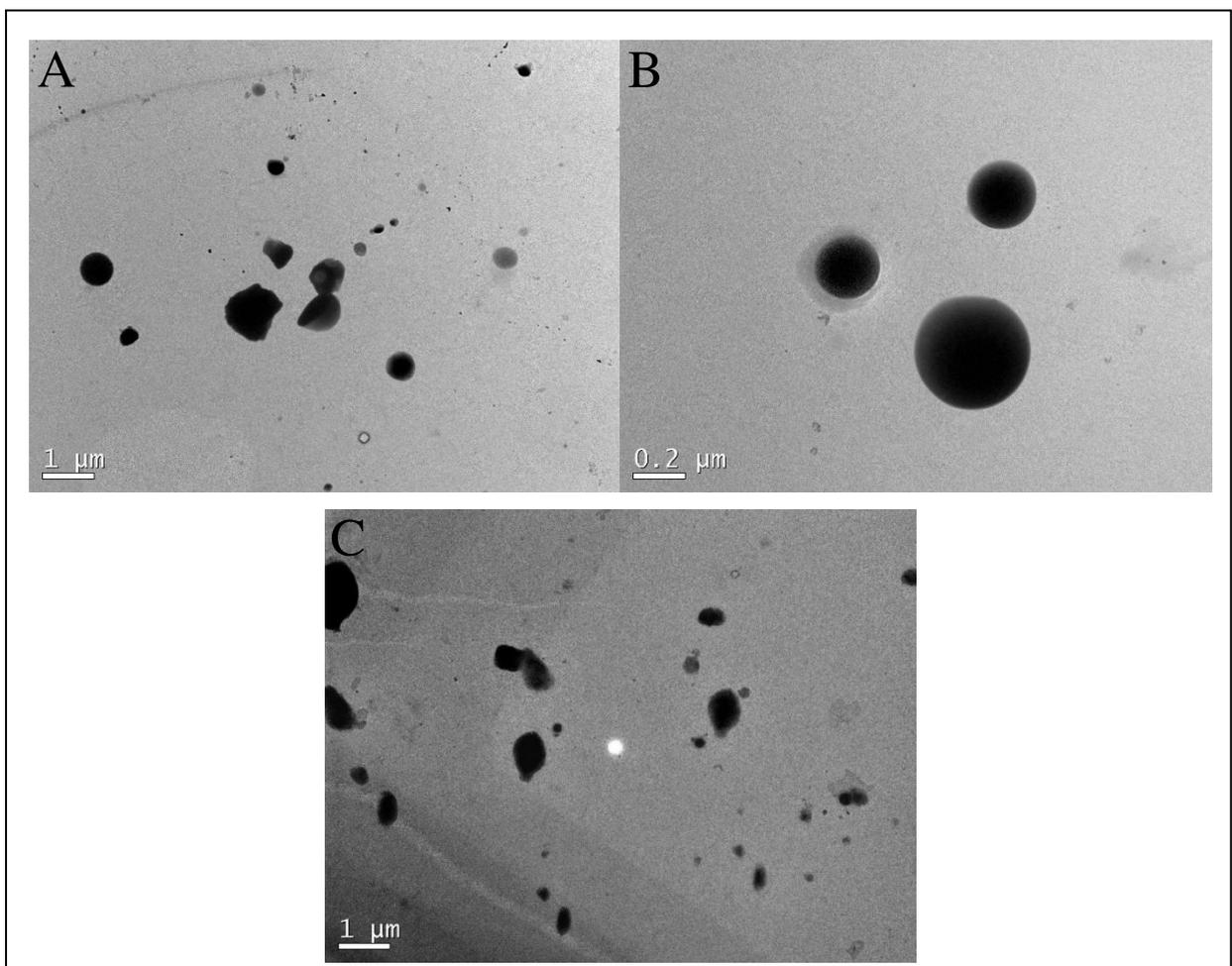
A análise comparativa entre as nanopartículas lipídicas/poliméricas e as lipídicas revelou informações sobre suas características morfológicas e estabilidade estrutural.

Ao examinar a morfologia das nanopartículas lipídicas/poliméricas, observou-se que apresentavam uma forma semiesférica, assim como as nanopartículas lipídicas. A esfericidade das nanopartículas é um atributo de grande importância para a absorção celular. A baixa relação de aspecto das partículas, indicando uma maior proximidade entre o diâmetro maior e o menor, é altamente vantajosa em aplicações de entrega de substâncias terapêuticas. Esse fenômeno promove uma interação mais eficaz com as células, aumentando a eficiência na penetração das

nanopartículas nas células-alvo (DASGUPTA; THORSTEN; GOMPPER, 2014). Como resultado, ocorre uma maior absorção dos medicamentos, levando a um melhor resultado terapêutico.

Além disso, observou-se que as nanopartículas lipídicas/poliméricas mantiveram uma forma mais esférica em comparação com as nanopartículas lipídicas, mesmo sendo submetidas às mesmas condições de análise no TEM. A presença do polímero na matriz das nanopartículas conferiu-lhes uma maior estabilidade estrutural, resultando em uma menor propensão à fusão e como consequência disso manteve-se uma forma mais esférica. Isso é vantajoso para garantir a integridade da estrutura durante o processo de formulação e armazenamento, contribuindo para a eficácia e segurança dos sistemas de entrega de medicamentos.

Figura 27 - Análises do TEM das (a, b) nanopartículas lipídica/polimérica e (c) nanopartículas lipídicas



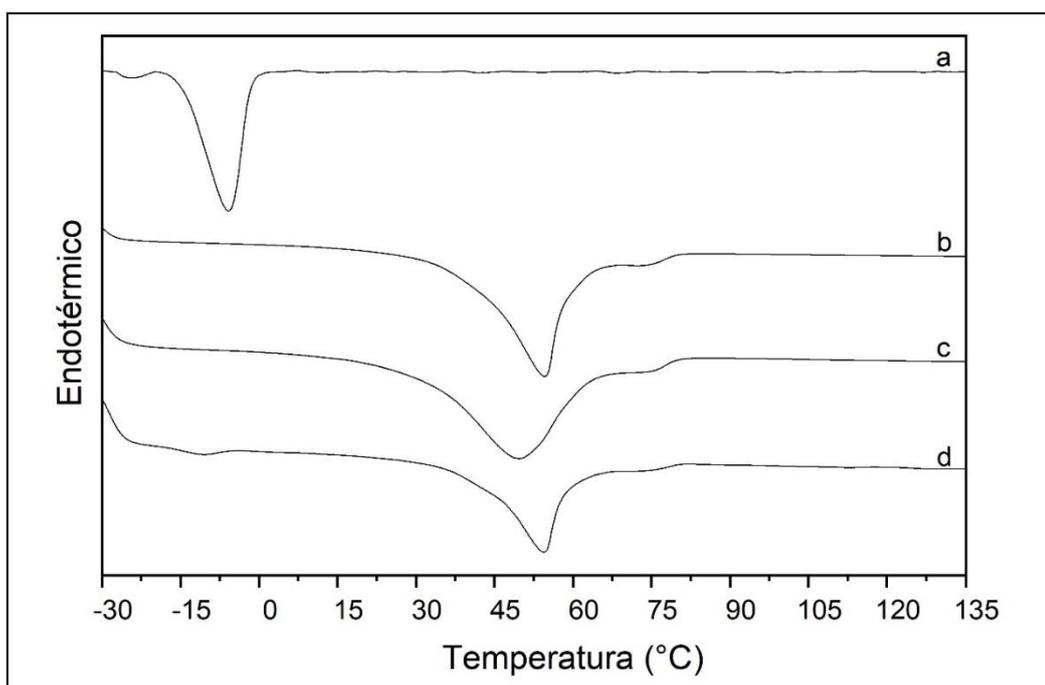
Fonte: Autor (2024)

4.3.4 Estudo térmico

A análise das propriedades térmicas de diferentes materiais oferece informações fundamentais sobre seus comportamentos em diversas condições de temperatura. Abaixo estão o resultado de quatro materiais analisados: polímero puro, cera de abelha pura, nanopartícula lipídica (referente ao capítulo 3) e a nanopartícula lipídica/polimérica. Foram realizados análises de DSC e TGA as quais revelaram informações importantes para o estudo.

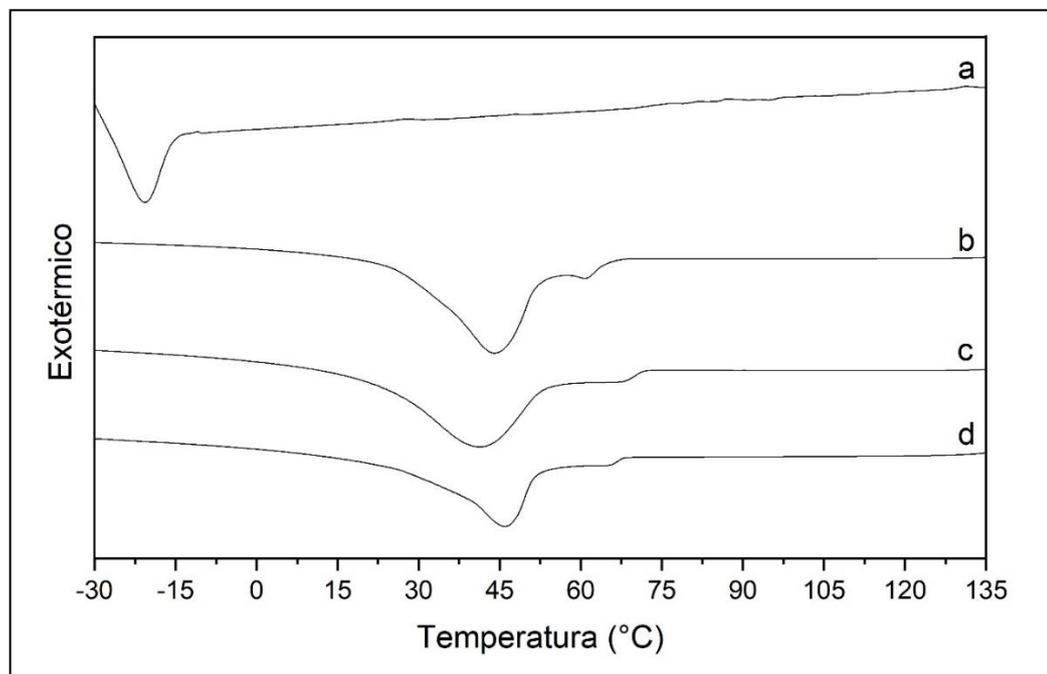
Nas Figuras 28 e 29 estão apresentados os gráficos de endotérmico e exotérmico das análises de DSC, e Tabela 11 os dados extraídos dos gráficos.

Figura 28 - Termograma endotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para o polímero puro (a), cera de abelha pura (b), nanopartícula lipídica (c) e nanopartícula lipídica/polimérica (d)



Fonte: Autor (2024)

Figura 29 - Termograma exotérmico de calorimetria diferencial de varredura (DSC) para o polímero puro (a), cera de abelha pura (b), nanopartícula lipídica (c) e nanopartícula lipídica/polimérica (d)



Fonte: Autor (2024)

Tabela 11 - Dados obtidos a partir das curvas de DSC

Amostra	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_g (°C)	Δc_p (J/g°C)
Polímero puro	-6,63	10,94	-20,36	-10,62	-24,82	0,674
Cera de abelha pura	54,72	173,44	44,48	-180,62	-	-
NP lipídica	49,04	74,85	41,94	-86,07	-	-
NP lipídica/polimérica	54,59	50,92	46,48	-69,55	-10,72	0,151

Fonte: Autor (2024)

A partir dos resultados, observamos primeiramente que o polímero puro possui uma temperatura de fusão (T_m) de $-6,63^\circ\text{C}$. Esta temperatura de fusão relativamente baixa indica que o polímero passa do estado sólido para o estado líquido a temperaturas relativamente amenas. Por outro lado, a temperatura de cristalização (T_c) é registrada a $-20,36^\circ\text{C}$ representando a transição para uma forma cristalina. Além disso, o polímero apresenta uma temperatura de transição vítrea (T_g) a $-25,29^\circ\text{C}$ que está associado a fase amorfa do polímero (SOROLLA-ROSARIO et. al, 2022).

É importante observar que a fusão do polímero puro ocorre em torno de $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. O material deveria estar líquido à temperatura ambiente, mas não foi o caso, pois o polímero se apresentava no estado sólido durante alguns meses de armazenamento, possivelmente isso ocorre pelo fato do polímero está 100% reticulado o que impede a mobilidade mantendo a sua estrutura na temperatura ambiente por um determinado tempo. Porém, ao longo de quatro meses uma amostra acabou fundindo a temperatura ambiente quando feita em escala maior conforme descrito por Santin (2023), também é importante ressaltar que o polímero foi classificado como semicristalino.

A cera de abelha pura possui uma temperatura de fusão (T_m) mais elevada, $54,72^{\circ}\text{C}$, indicando sua natureza sólida à temperatura ambiente. A temperatura de fusão sugere uma estrutura molecular complexa e uma ligação forte entre suas moléculas, exigindo uma quantidade significativa de energia para quebrar essas ligações e fundir a substância.

Além disso, é interessante observar que a cera de abelha possui uma temperatura de cristalização (T_c) de $44,48^{\circ}\text{C}$, momento em que ela passa do estado líquido para o sólido. É interessante observar também que essa substância possui uma estrutura altamente ordenada quando se encontra no estado sólido, o que é comum em materiais cerosos (GALVÃO *et al.*, 2020). A cera também não apresenta uma temperatura de transição vítrea, indicando uma transição mais gradual entre o estado vítreo e o estado sólido.

O polímero e a cera de abelha, foram utilizados como componentes fundamentais na preparação de nanopartículas. O objetivo principal foi comparar as propriedades das nanopartículas resultantes, tanto aquelas compostas apenas por cera de abelha quanto aquelas preparadas com o polímero e a cera de abelha.

Com base nos resultados das nanopartículas lipídicas descritos no Capítulo 3, ao comparar com os resultados em relação às nanopartículas lipídicas/poliméricas, observamos algumas diferenças nas propriedades térmicas. Primeiramente, nas nanopartículas lipídicas, a temperatura de fusão (T_m) foi registrada a $49,04^{\circ}\text{C}$. Por outro lado, quando o polímero foi adicionado às nanopartículas lipídicas, o T_m aumentou para $54,59^{\circ}\text{C}$. Esse aumento no T_m indica uma maior estabilidade térmica das nanopartículas quando o polímero foi incorporado, o que sugere uma maior resistência ao calor e uma menor propensão à fusão prematura. Embora o aumento na T_m não seja substancial, esse resultado é plausível, considerando a baixa T_m do polímero puro ($-6,63\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Em relação à temperatura de cristalização (T_c), observamos uma diferença similar. Nas nanopartículas lipídicas, a T_c foi $41,94^{\circ}\text{C}$. Quando o polímero foi adicionado, a T_c aumentou

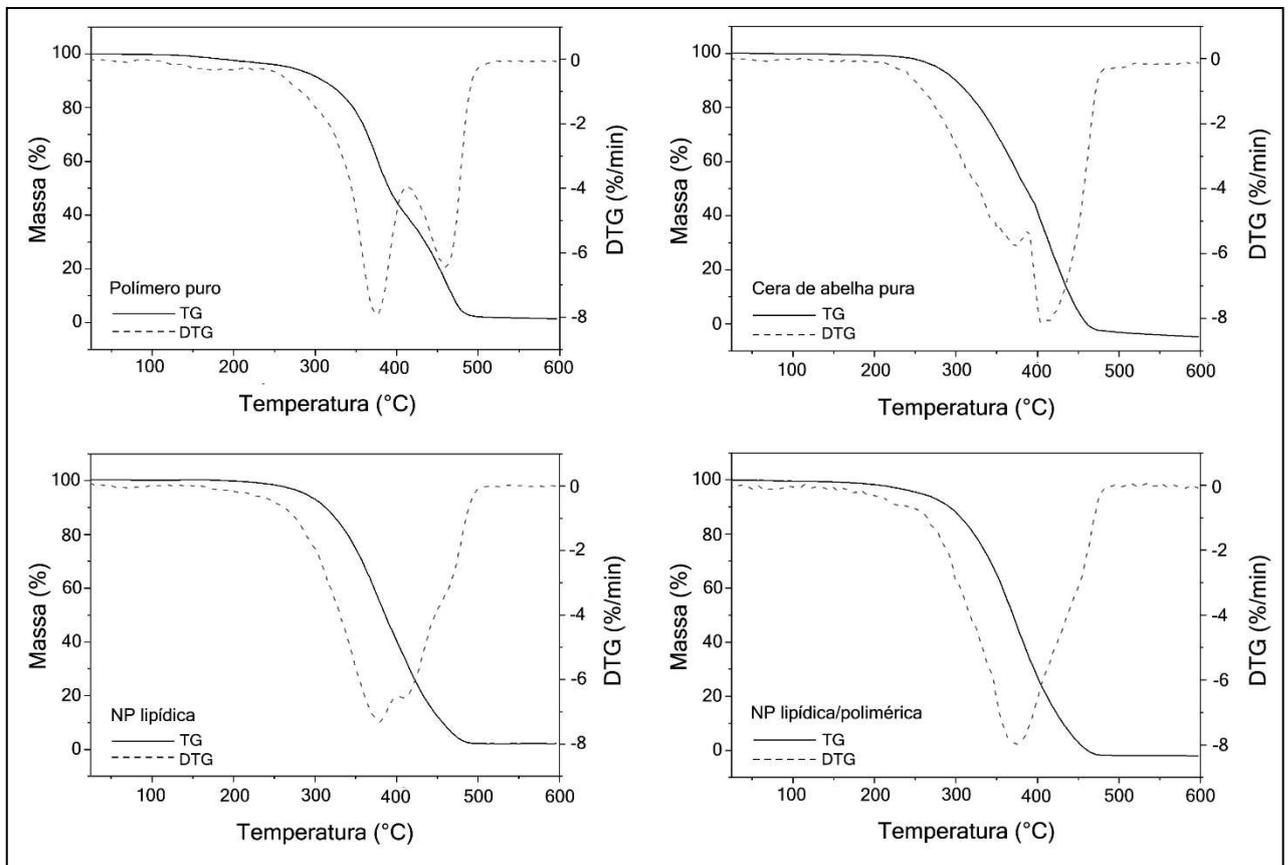
para 46,48°C. Esse aumento na Tc indica uma maior ordenação molecular nas nanopartículas quando o polímero é adicionado.

Além disso, a adição do polímero também introduziu uma nova propriedade térmica nas nanopartículas lipídica/polimérica, a temperatura de transição vítrea (Tg), que foi registrada a -10,72°C. A presença da Tg sugere uma transição mais gradual entre o estado vítreo e o estado sólido nas nanopartículas lipídicas/poliméricas.

A transição mais gradual entre os estados vítreo e sólido, juntamente com uma maior ordenação molecular, pode ser altamente benéfica em várias aplicações, especialmente em sistemas de liberação controlada de fármacos. Essa combinação permite uma liberação mais previsível e estável dos princípios ativos encapsulados nas nanopartículas, o que é fundamental para garantir uma terapia eficaz e segura no tratamento (KAMALY *et al.*, 2016).

Na Figura 30 estão apresentados os gráficos de TGA e DTG dos materiais estudados, os quais foram investigados a estabilidade térmica.

Figura 30 - Termogramas da análise termogravimétrica (TGA) do polímero puro, cera de abelha pura, nanopartícula lipídica e nanopartícula lipídica/polimérica



Fonte: Autor (2024)

Tabela 12 - Dados obtidos a partir das curvas de TGA e DTG

Amostra	TGA			DTG	
	T _i (°C)	T _f (°C)	Perda de massa (%)	Étapas da degradação	T _{max} (°C)
Polímero puro	180	490	100	Etapa 1	375
				Etapa 2	460
Cera de abelha pura	240	480	100	Etapa 1	370
				Etapa 2	410
NP lipídica	220	490	100	Etapa 1	380
				Etapa 2	410
NP lipídica/polimérica	150	490	100	Etapa 1	375

Fonte: Autor (2024)

Com uma temperatura inicial de decomposição (Ti) de 240 °C e uma temperatura final (Tf) de 480 °C, a cera de abelha pura resistiu a esta faixa de temperatura antes de entrar em processo de decomposição. Semelhante a cera de abelha pura, o polímero puro apresentou uma Ti de 180 °C e uma Tf de 490 °C, também exibindo uma ótima resistência ao calor.

Comparando as duas substâncias, a cera de abelha pura possui uma temperatura inicial de decomposição mais alta (240 °C) em comparação com o polímero puro (180 °C). Isso sugere que a cera de abelha é mais resistente a temperaturas iniciais elevadas. No entanto, ambas as substâncias apresentam temperaturas finais de decomposição semelhantes (480 °C para a cera de abelha e 490 °C para o polímero), indicando que ambas mantêm sua estabilidade estrutural em temperaturas mais altas.

Ao analisar a temperatura inicial (220 °C) e final (490°C) de decomposição da nanopartícula lipídica é notável que a substância possui uma estabilidade térmica semelhante à cera de abelha pura.

Ao adicionar o polímero à cera de abelha, observa-se que a temperatura inicial (150 °C) das nanopartículas lipídicas/poliméricas é menor do que a das outras amostras reduzindo a temperatura de início da decomposição. Apesar da redução na temperatura inicial, a temperatura final (490 °C) permanece relativamente constante, indicando que, independentemente da composição, todas as amostras se decompõem completamente em temperaturas semelhantes, indicando uma estabilidade térmica consistente nesse estágio.

A presença do polímero na amostra de nanopartículas lipídicas/poliméricas parece não ter afetado a temperatura final da decomposição, mas pode ter influenciado a cinética da

decomposição, como sugerido pelas diferenças nas taxas de decomposição (refletidas nos picos DTG). Em resumo, os resultados indicam que a adição do polímero puro às nanopartículas lipídicas pode ter alterado as propriedades térmicas da amostra, levando a uma decomposição mais gradual em temperaturas mais baixas, ou seja, a estrutura do material está se desintegrando de maneira mais uniforme e distribuída ao longo de uma gama mais extensa de temperatura em comparação com materiais que têm picos de decomposição mais agudos e concentrados em uma temperatura específica. Esse fato pode ser atribuído as interações entre o polímero e o lipídio que como resultado modificou o comportamento de fusão dos componentes, levando a um único evento de decomposição durante o aquecimento.

4.3.5 Teor de gel

O teor de gel do polímero nas nanopartículas desempenha um papel crucial na determinação de suas propriedades e aplicações. Os resultados do teor de gel obtidos para as formulações de nanopartículas lipídicas/poliméricas são bastante próximos, com uma diferença de apenas 1,79% entre o tempo de reação de 10 minutos (66,98%) e o tempo de reação de 30 minutos (65,19%) conforme a Tabela 13. Essa pequena diferença indica que o tempo de reação não teve um impacto significativo no teor de gel das nanopartículas.

Parece que o sistema atingiu uma taxa de gel máxima já no tempo de reação de 10 minutos, e prolongar o tempo de reação para 30 minutos não resultou em um aumento. Isso sugere que o processo de fotopolimerização alcançou uma estabilidade, onde a maioria dos grupos reativos foi incorporada à rede polimérica, indicando a formação completa da estrutura desejada.

O teor de gel em torno de 65-67% é relativamente alto e sugere uma rede polimérica bem formada nas nanopartículas. Este teor de gel confere às nanopartículas uma estabilidade estrutural significativa. Em ambientes desafiadores, como variações de temperatura ou presença de solventes, a estrutura reticulada proporciona resistência à desintegração, garantindo a integridade das nanopartículas ao longo do tempo (PONZIO *et al.*, 2017). Isso é fundamental para aplicações biomédicas e farmacêuticas, onde a estabilidade das formulações é essencial para a eficácia e segurança dos medicamentos.

Além disso, o teor de gel tem um impacto direto na eficiência de encapsulamento do antimoniato de meglumina. Com uma estrutura mais estável e compartimentos bem definidos

formados pela reticulação, as nanopartículas podem proteger efetivamente o conteúdo encapsulado (MACHTAKOVA; THÉRIEN-AUBIN; LANDFESTER, 2022). Isso é especialmente importante para fármacos sensíveis que requerem proteção contra condições adversas até o momento da liberação controlada no local desejado no corpo.

Tabela 13 - Resultados dos testes do teor de gel do polímero nas nanopartículas lipídica/polimérica

Nanopartícula lipídica/polimérica	Teor de gel	Média ± S
NP 1 _(10 min)	64,38	
NP 2 _(10 min)	69,13	66,98 ± 1,96
NP 3 _(10 min)	67,43	
NP 1 _(30 min)	64,48	
NP 2 _(30 min)	65,26	65,19 ± 0,56
NP 3 _(30 min)	65,84	

Fonte: Autor (2024)

Outro aspecto crucial a considerar é o controle da liberação do antimoniato de meglumina. Com o teor de gel obtido, é provável que a liberação do fármaco seja mais lenta e controlada. A reticulação cria barreiras físicas e químicas que regem a liberação do fármaco, o que é particularmente valioso em terapias de liberação prolongada, onde doses constantes e controladas são essenciais para a eficácia do tratamento (SAFDAR *et al.*, 2019; MIKUSOVÁ; MIKUS, 2021).

4.4 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi desenvolvida uma formulação de nanopartículas lipídicas/poliméricas para o encapsulamento do antimoniato de meglumina, um fármaco essencial no tratamento da leishmaniose. A combinação de cera de abelha e um polímero derivado de fontes renováveis resultou em nanopartículas com características físicas, coloidais e térmicas promissoras para aplicações biomédicas.

As nanopartículas lipídicas/poliméricas apresentaram um diâmetro médio na faixa desejada para facilitar a absorção celular eficaz, além de uma distribuição de tamanho homogênea indicada pelo baixo índice de polidispersão. A eficiência de encapsulação do

antimoniato de meglumina foi um pouco melhorada em comparação com as nanopartículas lipídicas estudadas anteriormente, indicando uma encapsulação eficaz do fármaco na matriz lipídica/polimérica. A análise térmica revelou uma estabilidade térmica satisfatória das nanopartículas, com uma transição mais gradual entre os estados vítreo e sólido, indicando uma liberação controlada e previsível do fármaco ao longo do tempo.

Além disso, o teor de gel das nanopartículas foi otimizado, resultando em uma estrutura polimérica bem formada que proporciona resistência à desintegração e proteção eficaz do conteúdo encapsulado.

Por meio do estudo podemos concluir um avanço no campo da entrega de fármacos, combinando eficiência de encapsulação aprimorada com práticas sustentáveis. A utilização de polímeros derivados de fontes renováveis não apenas reduz a dependência de recursos não-renováveis, mas também contribui para a resolução do problema da degradabilidade dos materiais poliméricos. Além disso, a liberação controlada e previsível do antimoniato de meglumina oferece uma abordagem terapêutica mais eficaz e segura para o tratamento da leishmaniose.

O estudo dá um passo importante em direção a práticas mais ecologicamente responsáveis na nanomedicina, ao mesmo tempo em que oferece soluções inovadoras para desafios terapêuticos em doenças infecciosas e condições crônicas.

Espera-se que este estudo ajude a continuar explorando abordagens sustentáveis e eficazes para a entrega de fármacos, contribuindo para avanços significativos na saúde global. Além disso, o estudo fornece uma base sólida para investigações futuras, incluindo testes *in vitro* e *in vivo* para avaliar a eficácia terapêutica e a segurança biológica dessas nanopartículas.

REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Secretaria de Vigilância em Saúde: Brasília, 2014.

CORDEIRO, A. P. *et al.* ***In vitro* synergic activity of diethyldithiocarbamate and 4-nitrochalcone loaded in beeswax nanoparticles against melanoma (B16F10) cells.** Materials Science and Engineering: C. Vol. 120, 2021.

DASGUPTA, S; AUTH, T.; GOMPPER, G. **Shape and Orientation Matter for the Cellular Uptake of Nonspherical Particles.** American Chemical Society. Vol. 14 (2), p. 687-693, 2014.

FRÉZARD *et al.* **Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol. 33 (7), p. 841-846, 2000.

GALVÃO, J. G. *et al.* **Stearic Acid, Beeswax and Carnauba Wax as Green Raw Materials for the Loading of Carvacrol into Nanostructured Lipid Carriers.** Applied Sciences. Vol. 10 (18), p. 6267, 2020.

JYOTHI, N. V. N. *et al.* **Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency.** Journal of Microencapsulation. Vol. 27 (3), p. 187-197, 2010.

KAMALY, N. *et al.* **Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release.** Chemical Reviews. Vol. 116 (4), p. 2602-2663, 2016.

LINCE, F. *et al.* **Preparation of polymer nanoparticles loaded with doxorubicin for controlled drug delivery.** Chemical Engineering Research and Design. Vol. 89 (11), p. 2410-2419, 2011.

MACHTAKOVA, M.; THÉRIEN-AUBIN, H.; LANDFESTER, K. **Polymer nano-systems for the encapsulation and delivery of active biomacromolecular therapeutic agents.** Chemical Society Reviews. Vol. 51, p. 128-152, 2022.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. **Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine.** Molecules. Vol. 28 (18), p. 6624, 2023.

MAZUR, K. L. *et al.* **Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death *in vitro*.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol. 176 (1), p. 507-512, 2019.

MIKUSOVA, V.; MIKUS, P. **Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery.** International Journal of Molecular Sciences. Vol. 22 (17), p. 9652, 2021.

PEREIRA, L. P. S. **Polimerização Tiol-eno do Limoneno Usando Diferentes Tipos de Iniciadores.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2019.

PONZIO, R. A. *et al.* **Crosslinked polymer nanoparticles containing single conjugated polymer chains.** Methods and Application in Fluorescence Vol. 5 (2), 2017.

PURI, A. *et al.* **Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic.** Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems. Vol. 26 (6), p. 523-580, 2009.

SAFDAR, R. *et al.* **Potential of Chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – A review.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. Vol. 49, p. 642-659, 2019.

SANTIN, J. V. C. **Enzymatic Synthesis of Allyl-(meth)acrylate Monomers for Thiol-ene Biodegradable Polymers.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2023.

SIVADASAN, D. *et al.* **Polymeric Lipid Hybrid Nanoparticles (PLNs) as Emerging Drug Delivery Platform—A Comprehensive Review of Their Properties, Preparation Methods, and Therapeutic Applications.** Pharmaceutics. Vol. 13 (8), p. 1291, 2021.

SOROLLA-ROSARIO, D. *et al.* **Study of microplastics with semicrystalline and amorphous structure identification by TGA and DSC.** Journal of Environmental Chemical Engineering. Vol. 10 (1), 2022.

STEINHAUSER, I. *et al.* **Trastuzumab-modified nanoparticles: Optimisation of preparation and uptake in cancer cells.** Biomaterials. Vol. 27 (28), p. 4975-4983, 2006.

5 CONCLUSÃO GERAL

A pesquisa realizada revela um potencial promissor no uso de nanopartículas como veículos de entrega de compostos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose. Através de testes com as nanopartículas lipídicas, foi observado que não houve efeitos citotóxicos, evidenciando sua segurança para aplicação biomedicina. Além disso, o uso de substâncias sustentáveis na sua produção fortalece a viabilidade ambiental desse método terapêutico.

A técnica de dupla emulsão destacou-se como uma abordagem eficaz na produção das nanopartículas, permitindo a obtenção de partículas com tamanho e estabilidade adequados para aplicações biomédicas. Através de estudos moleculares, confirmou-se a ausência de interações indesejadas entre os fármacos e os constituintes das nanopartículas lipídicas, preservando assim a eficiência terapêutica dos compostos.

Embora não tenha sido observado efeito direto sobre as formas promastigotas, as nanopartículas demonstraram potencial como veículos de entrega intracelular de fármacos. A adição de polímeros nas nanopartículas lipídicas melhorou a eficiência de encapsulação, especialmente para substâncias hidrofílicas, podendo ampliar assim suas capacidades terapêuticas.

Análises térmicas revelaram uma transição mais gradual entre os estados vítreo e sólido das nanopartículas, sugerindo uma liberação controlada e previsível dos fármacos. O teor de gel obtido demonstrou a formação de uma rede polimérica estável, o que contribui para a estabilidade das nanopartículas durante sua aplicação terapêutica.

No entanto, para consolidar o potencial terapêutico das nanopartículas no tratamento da leishmaniose, são necessários estudos adicionais. Testes em fases posteriores do parasita, como amastigotas, e estudos *in vivo* são essenciais para avaliar a eficácia terapêutica das nanopartículas em condições mais próximas da realidade clínica. Além disso, a compreensão aprofundada da absorção, distribuição e metabolismo das nanopartículas é fundamental para estabelecer uma base sólida para sua aplicação clínica. Esses esforços adicionais fornecerão

uma compreensão mais abrangente do potencial terapêutico das nanopartículas no tratamento da leishmaniose, contribuindo significativamente para o avanço da medicina no combate a essa doença negligenciada.

5.1 SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

Como sugestões para futuras pesquisas, proponho uma série de experimentos que visam aprofundar nosso entendimento sobre o potencial das nanopartículas no tratamento da leishmaniose. Esses estudos adicionais são cruciais para fornecer uma base sólida para a aplicação clínica desses sistemas de entrega de fármacos inovadores.

Primeiramente, seria altamente benéfico realizar testes anti-amastigotas para avaliar diretamente a capacidade das nanopartículas de combater a fase intracelular do parasita *Leishmania*. Isso nos permitirá determinar se essas nanopartículas podem ser eficazes no tratamento da doença em um estágio crucial de sua progressão.

Além disso, é essencial realizar testes *in vivo* para avaliar a eficácia terapêutica, a biodistribuição e a segurança das nanopartículas em um organismo vivo. Esses experimentos nos ajudarão a entender melhor como as nanopartículas interagem com o sistema biológico, bem como sua capacidade de atingir o alvo desejado e sua toxicidade potencial.

Investigar a farmacocinética e a farmacodinâmica das nanopartículas também é fundamental. Isso inclui estudar detalhadamente processos como absorção, distribuição e metabolismo das nanopartículas no corpo. Essas informações são essenciais para otimizar as formulações e garantir uma entrega eficaz do fármaco ao local de ação.

Por fim, é importante explorar maneiras de otimizar as formulações das nanopartículas, especialmente em relação à eficiência de encapsulação do antimonio de meglumina. Isso envolveria a investigação de diferentes parâmetros de formulação para maximizar a carga de fármaco nas nanopartículas, garantindo assim uma terapia mais eficaz contra a leishmaniose.

Esses experimentos propostos representam uma extensão lógica do trabalho atual e fornecerão uma base sólida para o desenvolvimento futuro de terapias inovadoras para o tratamento da leishmaniose. Ao abordar essas questões, podemos avançar significativamente no campo da nanomedicina e contribuir para a melhoria da saúde pública.