



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

PAULA ELIZE MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE  
FORMAS FARMACÊUTICAS DE ANFOTERICINA B E  
INCORPORADA EM NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA**

Florianópolis

2019

Paula Elize Monteiro

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE FORMAS  
FARMACÊUTICAS DE ANFOTERICINA B E INCORPORADA EM  
NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karin Silva Caumo  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Fabíola Branco Filippin Monteiro

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Monteiro, Paula Elize  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA IN VITRO DE FORMAS  
FARMACÊUTICAS DE ANFOTERICINA B E INCORPORADA EM  
NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA / Paula Elize Monteiro ;  
orientador, Karin Silva Caumo, coorientador, Fabíola  
Branco Filippin Monteiro, 2019.  
88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. nanopartículas lipídicas sólidas. 3.  
Anfotericina B. 4. atividade leishmanicida. 5. Leishmania  
(Leishmania) amazonensis. I. Silva Caumo, Karin. II.  
Branco Filippin Monteiro, Fabíola . III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia. IV. Título.

Paula Elize Monteiro

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE FORMAS  
FARMACÊUTICAS DE ANFOTERICINA B E INCORPORADA EM  
NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliane Araújo Greinert Goulart  
Universidade Regional de Blumenau - FURB

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karin Silva Caumo  
Orientadora

Florianópolis, 05 de junho de 2019

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Amarildo e Mara, por terem sido tão presentes apesar da distância física que nos separa. Obrigada pelas palavras de carinho e de apoio nos momentos mais difíceis. Vocês me dão forças para buscar meus objetivos, são meus exemplos de força e determinação. Toda conquista minha também é uma vitória de vocês.

Ao meu grande amor, Diego. Você é o melhor companheiro desse mundo. Obrigada por me ajudar, por me entender, por ter a maior paciência do universo, e por sempre alegrar o meu dia. Você me faz acreditar no meu potencial, e no que podemos conquistar juntos.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Karin Silva Caumo, por ter me acolhido, me orientado, ter tido tanta paciência com as minhas limitações e me permitir conquistar algo tão importante na minha vida.

À minha coorientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabíola Filippin Monteiro, obrigada por todo o conhecimento compartilhado, pela dedicação em me explicar tantas coisas, e por ter sido parte fundamental desse trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por abrir as portas do seu laboratório e permitir a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos José Machado, pelo auxílio nas análises estatísticas e pelas palavras de incentivo.

Às minhas colegas de LAPEO, por toda a alegria que vocês trouxeram aos meus dias! Malu, Carol, Débora, Thaís, Jaque, Bárbara, Ale, obrigada pela companhia de vocês nas tardes de laboratório. Fabi, minha companheira de mestrado do início até o fim, tua amizade foi uma das melhores coisas que vieram junto com a pós. Obrigada!

Aos colegas de GEIMM e LAITA, especialmente ao Alex, por me ensinar o cultivo e me ajudar tanto na padronização do trabalho. Obrigada pela paciência e dedicação!

Às minhas amigas que estão ao meu lado há tantos anos, nos estudos e na vida: Ellen, Priscila, Camila, Bárbara, Tatiane, Maisa, Daniele, obrigada pelo carinho sempre!

Aos colegas de trabalho do Hospital Universitário pela compreensão e apoio.

A todos que indireta ou diretamente contribuíram para este trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

Espécies de *Leishmania* são agentes causadores das leishmanioses, classificadas como doenças tropicais negligenciadas. O Brasil é um dos países de maior prevalência nas Américas, onde estão concentrados 90% dos novos casos de leishmanioses, configurando mais de 16 mil novos casos/ ano de Leishmaniose tegumentar. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) caracteriza-se por lesões cutâneas, com uma depressão central com bordas endurecidas e elevadas. Estas lesões podem desaparecer um tempo após a picada do mosquito, ou podem evoluir para um quadro mucocutâneo ou cutâneo-difuso. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pode incapacitar a resposta imune do hospedeiro, agravando o quadro clínico e por isso representa uma das espécies mais importantes, pelo alto índice de morbidade. No Brasil, os medicamentos usados no tratamento de LTA são de uso sistêmico, e destaca-se a Anfotericina B associada ao desoxicolato de sódio (AB-DOC) por ser a mais eficiente no tratamento da forma cutâneo-difusa. A AB-DOC é um medicamento antibiótico, associado à cura de lesões cutâneas e de mucosas. Apresenta-se como um desafio do ponto de vista clínico, porque requer altas doses durante um longo período, tornando-se bastante tóxico, especialmente aos rins e fígado. Para solucionar este problema, no mercado farmacêutico encontram-se disponíveis alternativas baseadas em sistemas nanocarreadores, como a Anfotericina B Lipossomal (AmBisome®). Esta formulação lipossomal comparativamente é a mais segura e eficaz, pois apresenta menor toxicidade e melhor biodisponibilidade, porém possui um alto custo e a necessidade de resfriamento. Estes fatores dificultam o amplo acesso da população ao tratamento, o que leva à necessidade de estudos na busca de novas formulações como alternativas. Já foi relatado que o aquecimento de AB-DOC permite a formação de superagregados, que possuem toxicidade reduzida comparada à AB-DOC, sem interferir na atividade biológica do fármaco. Neste estudo, preparou-se uma nanopartícula lipídica sólida associada à AB-DOC (AB-NLS), que apresentou tamanho de partícula (TP) de  $77,7 \pm 4,1$  nm, compatível com o sistema nanoparticulado, índice de polidispersão (PdI) de  $0,192 \pm 0,040$ , e potencial zeta (PZ) de  $-39,2 \pm 1,81$  mV, mantendo-se estável por 90 dias a 4 °C e protegida da luz. O resultado de TP foi confirmado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), mostrando uma população de distribuição homogênea. Os ensaios de atividade biológica com AB-NLS frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostraram potencial leishmanicida, com valores de  $CI_{50}$  de 353 nM, 458 nM e 1719 nM, e IS de 30, 23 e 6, para tratamentos de 24h, 48h e 72h, respectivamente. Não houve atividade citotóxica frente a macrófagos, nem com altas concentrações-teste (10822nM). O ensaio de hemólise apresentou dados promissores quanto ao potencial uso da formulação via sistêmica, visto que não houve atividade hemolítica frente aos eritrócitos humanos. A produção de TNF- $\alpha$  de  $602 \pm 48$  pg/mL indicou que em testes futuros, a AB-NLS frente a amastigotas intracelulares poderá apresentar atividade. Os resultados demonstraram que AB-NLS apresenta-se eficaz frente as formas promastigotas, mas sem afetar a viabilidade celular de macrófagos.

**Palavras-chave:** nanopartículas lipídicas sólidas; Anfotericina B; atividade leishmanicida; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

## ABSTRACT

*Leishmania* species are agents that cause leishmaniasis, classified as neglected tropical diseases. Brazil is one of the countries with the most prevalence on the American continent, a continent that concentrates 90% of the leishmaniasis new cases, concentrating over 16 thousand of new cases per year of tegumentary leishmaniasis. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is characterized by cutaneous lesions, with a central depression and hardened elevated edges. These lesions may disappear after the mosquito bite or may evolve to a mucocutaneous or cutaneous-diffuse condition. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* may incapacitate the immune response of the host, aggravating the clinical condition and representing one of the most important species, for the high morbidity rate. In Brazil, the drugs used in ATL treatment are of systemic use, and Amphotericin B deoxycholate (AB-DOC) features as the most efficient for cutaneous-diffuse treatment. AB-DOC is an antibiotic, related to the cure of cutaneous and mucocutaneous lesions. It is a challenge from the clinical aspect, because the drug requires high doses during a long period, becoming very toxic, especially to kidneys and liver. To circumvent this problem, the pharmaceutical market provides alternatives based on nanocarriers systems, as liposomal Amphotericin B (AmBisome®). Comparatively, this liposomal formulation is more secure and efficient, presents lower toxicity and better bioavailability, however, has a high cost and the necessity for cooling. These factors impair the wide access to the treatment by the population, leading to the search for new formulations as alternatives. It has been reported that AB-DOC heating allows the formation of super-aggregates, which have lower toxicity compared to AB-DOC, without interfering in its biological activity. In this study, it was developed a solid lipid nanoparticle associated with AB-DOC (AB-SLN), which presented a particle size of  $77,7 \pm 4,1$  nm, compatible with a nanoparticle delivery system, polydispersion index of  $0,192 \pm 0,040$ , and a zeta potential of  $-39,2 \pm 1,81$  mV, remaining stable for 90 days at 4 °C protected from light. The result of particle size was confirmed by transmission electron microscopy (TEM), demonstrating a homogeneous distribution of the population. The biological activity assays with AB-SLN against *L. (L.) amazonensis* promastigotes demonstrated a leishmanicidal potential, with IC<sub>50</sub> values of 353 nM, 458 nM and 1719 nM, and SI of 30, 23 e 6, for treatments of 24 h, 48 h, and 72 h, respectively. There was no cytotoxic activity against macrophages, not even with the highest test concentration (10822nM). Hemolysis assay showed promising data as for potential systemic use of the AB-SLN formulation, since the formulation presented no hemolytic activity against human erythrocytes. TNF- $\alpha$  production of  $602 \pm 48$  pg/mL was an indicative that it might have activity against intracellular amastigotes. The results inferred that AB-SLN shows efficacy against promastigotes, without affecting macrophages viability.

**Key-words:** solid lipid nanoparticles; Amphotericin B; leishmanicidal activity; *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas morfológicas de <i>Leishmania</i> spp.....	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. ....	19
Figura 3. Estrutura química da Anfotericina B.....	30
Figura 4. Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	44
Figura 5. Padronização do tempo de incubação para avaliação da viabilidade celular de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> pelo método da resazurina .....	45
Figura 6. Padronização da leitura por fluorescência para avaliação da viabilidade celular de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> pelo método da resazurina .....	48
Figura 7. Aspecto macroscópico das formulações contendo AB-DOC e distribuição de partículas de acordo com o tamanho .....	50
Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de formulações farmacêuticas de AB-DOC.....	52
Figura 9. Atividade leishmanicida das formulações de AB frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 24 h de tratamento .....	53
Figura 10. Determinação da CI <sub>50</sub> das formulações de AB frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 24 h de tratamento .....	53
Figura 11. Determinação da CI <sub>50</sub> das formulações de AB frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 48 h de tratamento .....	54
Figura 12. Determinação da CI <sub>50</sub> das formulações de AB frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após 72h de tratamento .....	54
Figura 13. Citotoxicidade das formulações de AB frente a células de macrófagos Raw 264.7 após 24h de tratamento .....	55
Figura 14. Determinação da CC <sub>50</sub> das formulações de AB frente a macrófagos após 24h de tratamento .....	56
Figura 15. Determinação da CC <sub>50</sub> das formulações de AB frente a macrófagos após 48h de tratamento .....	56
Figura 16. Determinação da CC <sub>50</sub> das formulações de AB frente a macrófagos após 72 h de tratamento .....	57
Figura 17. Produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos Raw 264.7 após tratamento com formulações de AB.....	59
Figura 18. Efeito sobre eritrócitos de sangue periférico das formulações de AB .....	60



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Tempo de uso e custo dos medicamentos disponíveis no SUS.....	27
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações-teste utilizadas no teste de hemólise .....	42
Tabela 2. Tamanho médio de Partículas, PDI e Potencial Zeta de nanopartículas lipídicas sólidas .....	51
Tabela 3. Valores de $CI_{50}$ frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> das formulações de AB-DOC .....	55
Tabela 4. Valores de $CC_{50}$ , $CI_{50}$ e IS das formas farmacêuticas de AB-DOC .....	57
Tabela 5. Concentrações-teste das formulações de AB.....	60

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo da taxa de hemólise .....	43
Equação 2. Equação da reta referente a curva de calibração do teste de ELISA .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Anfotericina B
AB-DOC	Anfotericina B associada a desoxicolato de sódio
AB-HT	Anfotericina B aquecida
AB-NLS	Anfotericina B associada a nanopartículas lipídicas sólidas
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento celular
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória que inibe 50% do crescimento parasitário
C-NLS	Controle nanopartículas lipídicas sólidas
DLS	Dispersão Dinâmica de Luz
DOC	Desoxicolato de sódio
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HEPES	(N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
PdI	Índice de Polidispersão
PZ	Potencial zeta
RPMI	Meio de cultura completo Roswell Park Memorial Institute
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TP	Tamanho de partícula

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1. <i>Leishmania</i> spp.....	17
2.1.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. ....	18
2.1.2. Imunopatogênese de <i>Leishmania</i> spp. ....	20
2.2. Leishmanioses .....	22
2.2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana .....	24
2.2.2. Leishmaniose Cutâneo-Difusa .....	25
2.2.3. Tratamento para leishmaniose tegumentar americana.....	26
2.3. Anfotericina B .....	29
2.3.1. Estrutura química.....	29
2.3.2. Mecanismo de ação.....	30
2.3.3. Toxicidade associada à Anfotericina B .....	31
2.3.4. Formas farmacêuticas de Anfotericina B.....	32
2.4. Nanoterapia para leishmaniose.....	33
3. OBJETIVOS .....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1. Cultivo e manutenção de parasitos e linhagem celular .....	37
4.2. Curva de crescimento de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	37
4.3. Padronização do teste de viabilidade celular pela resazurina .....	37
4.4. Formas farmacêuticas de Anfotericina B .....	38
4.4.1. Preparação de AB-DOC.....	38
4.4.2. Obtenção de superagregados de AB-DOC .....	38
4.4.3. Obtenção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	38

4.5. Caracterização de NLS.....	39
4.5.1. Caracterização físico-química.....	39
4.5.2. Estudo da estabilidade .....	39
4.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	40
4.6. Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	40
4.7. Avaliação da citotoxicidade das formas farmacêuticas de Anfotericina B.....	40
4.8. Quantificação de TNF- $\alpha$ .....	41
4.9. Teste de Hemólise .....	42
4.10. Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS .....	44
5.1. Curva de crescimento de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	44
5.2. Padronização do ensaio de resazurina para avaliação da viabilidade celular de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	44
5.3. Caracterização de formas farmacêuticas contendo AB-DOC .....	48
5.3.1. Características físico-químicas .....	49
5.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	51
5.4. Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B frente a promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	52
5.5. Avaliação da citotoxicidade das formulações de Anfotericina B frente a células de macrófagos Raw 264.7.....	55
5.7. Quantificação de TNF- $\alpha$ .....	58
5.8. Teste de Hemólise .....	59
6. DISCUSSÃO .....	61
7. CONCLUSÃO .....	68
8. PERSPECTIVAS.....	69
9. REFERÊNCIAS.....	70
10. APÊNDICES .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

Um conjunto de doenças conhecido como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) está presente em mais de 149 países, atingindo aproximadamente 1 bilhão de pessoas (OMS, 2018), entre as quais a leishmaniose é uma das mais prevalentes (LINDOSO; LINDOSO, 2009). A leishmaniose é uma doença causada por várias espécies de protozoário do gênero *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK, 1999; PACE, 2014). Foram descritas mais de 50 espécies, e 20 delas são conhecidas como patogênicas para o ser humano (AKHOUNDI et al., 2016).

Existem quatro quadros clínicos principais de leishmaniose, mas a forma mais comum da doença é a leishmaniose tegumentar americana (LTA). Anualmente, são estimados 1 milhão de novos casos, e o Brasil é o país de maior prevalência nas Américas, com notificação de 16.537 novos casos entre os anos de 2015 a 2017 (ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2018, OMS 2019).

A LTA caracteriza-se por lesões cutâneas, com uma depressão central e bordas endurecidas e elevadas (HERWALDT, 1999). Estas lesões podem desaparecer após a picada do mosquito ou podem evoluir para cicatrizes desfigurantes, com o desenvolvimento de um quadro mucocutâneo (LMC) ou cutâneo-difuso (LCD) (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016; REITHINGER et al., 2007).

No Brasil, a LTA pode ser causada por várias espécies de *Leishmania*, mas a que apresenta quadro clínico mais relevante é *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, que tem a capacidade de tornar ineficiente a resposta imune do hospedeiro, agravando o seu quadro clínico (BARRAL et al., 1991; BRASIL, 2017; MENDONÇA et al., 2016).

No estado de Santa Catarina, casos autóctones de LTA são relatados desde 1987 em municípios de área rural e destacaram-se *L. (L.) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis* como os principais agentes etiológicos no estado (GRISARD et al., 2000).

Desde 2001, o número de casos da doença tem aumentado no estado. Entre os anos de 2001 a 2009, foram relatados 401 casos autóctones em Santa Catarina (MARLOW et al., 2013). Na cidade de Blumenau, o primeiro caso registrado foi em 2005, chegando a 259 casos em 2008 (GROTT et al., 2014).

Apesar de se tratar de uma doença de maior predominância em área rural, os casos de leishmaniose demonstram um perfil de expansão para as áreas urbanas (MARLOW et al., 2013). Desde 2010, o estado de Santa Catarina é considerado região endêmica para leishmaniose visceral canina (SANTA CATARINA, 2018), com o primeiro caso autóctone em humanos relatado em Florianópolis em 2017 (BUENO et al., 2019).

Os medicamentos disponibilizados pelo Ministério da Saúde para o tratamento de LTA são de uso sistêmico (BRASIL, 2018). São eles: antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metilglucamina (NMG) (Glucantime®); anfotericina B em desoxicolato de sódio (AB-DOC) e formulação lipossomal; e isotionato de pentamidina (BRASIL, 2017).

A anfotericina B (AB) é um medicamento antibiótico, associado à cura de lesões cutâneas e da mucosa no tratamento de LTA (CANNELLA et al., 2011). Porém, apresenta-se como um desafio do ponto de vista clínico, porque requer altas doses durante um longo período de tempo, tornando-se bastante tóxico, especialmente frente a órgãos vitais, como rins e fígado (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; CORWARE et al., 2011).

Para melhorar a toxicidade associada à AB foram desenvolvidas alternativas baseadas em sistemas nanocarreadores, como a AB lipossomal (Ambisome®). Esta formulação é menos tóxica e apresenta melhor biodisponibilidade (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001), porém com um alto custo. Em média, o custo de tratamento com AB-DOC é de aproximadamente R\$1.036,00, enquanto o tratamento com AmBisome® é de R\$60.000,00 (ANVISA, 2019).

Yardley e Croft (1997) demonstraram que AmBisome® apresenta citotoxicidade 10 vezes menor quando comparado com AB-DOC. De Carvalho et al. (2013) demonstrou que AB nanoencapsulada diminui significativamente a carga parasitária em lesão cutânea de modelos *in vivo*. Estes estudos favorecem a busca pela nanoterapia como alternativa importante ao tratamento convencional com AB-DOC, demonstrando eficácia e segurança.

Outra alternativa encontrada em substituição à AB lipossomal foi o aquecimento de AB-DOC (HARTSEL et al., 2001), durante 20 minutos a 70 °C, o que leva à formação de superagregados, sem prejuízo da atividade antimicrobiana (VAN ETTEN et al., 2000).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial leishmanicida *in vitro* de formulações de AB (coloidal, aquecida, e associada a nanopartículas lipídicas sólidas) frente ao parasito *L. (L.) amazonensis* causador da leishmaniose tegumentar americana.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Leishmania* spp.

Os parasitos do gênero *Leishmania* spp. são flagelados, da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esta ordem caracteriza-se por apresentar uma mitocôndria única (chamada cinetoplasto), rica em DNA mitocondrial (kDNA) (LAINSON; SHAW, 1978; SHAW et al., 1994).

O kDNA está localizado dentro da matriz mitocondrial, perpendicular ao flagelo. Diferente de qualquer outra estrutura de DNA na natureza, o kDNA de tripanossomatídeos é composto de moléculas circulares que se entrelaçam formando uma rede singular (SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009).

Tripanossomatídeos representam a família mais diversa e adaptável de parasitos flagelados, com um amplo espectro de hospedeiros, incluindo humanos e animais, sendo geralmente transmitidos via inseto vetor. Além das espécies de *Leishmania*, também faz parte deste grupo as espécies do gênero *Trypanosoma* (JACKSON, 2015). *Leishmania* spp. são transmitidos vetorialmente por mosquitos pertencentes aos gêneros, *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) e *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) (KILLICK-KENDRICK, 1999).

Os parasitos de *Leishmania* spp. são dixênicos, ou seja, alternam suas formas de vida entre promastigotas, que são a forma livre existente no mosquito vetor; e a forma amastigota, parasito obrigatório de macrófagos e que existe dentro de vacúolos parasitóforos nas células (ALEXANDER; RUSSELL, 1992; PROUDFOOT et al., 1996).

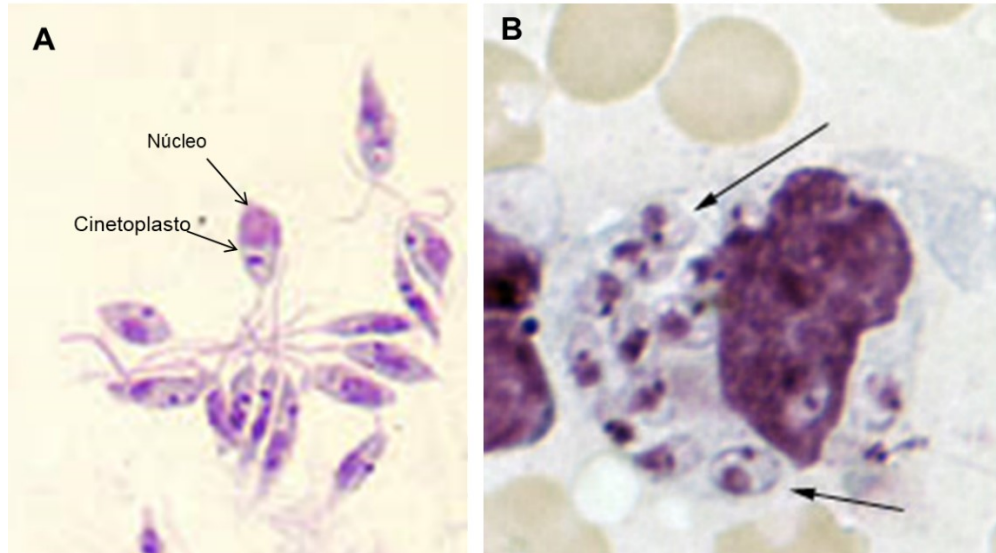
A forma promastigota habita o trato digestivo da fêmea do mosquito vetor (que é hematófaga), e caracteriza-se por ser alongada, flagelada e móvel, medindo entre 16 e 40  $\mu\text{m}$  (Figura 1A) (LAINSON; SHAW, 1978).

A mobilidade flagelar é uma vantagem que o parasito adquire para sobreviver em ambientes hostis. Quando parasitam um hospedeiro, eles precisam lidar com barreiras e obstáculos físicos; faz-se necessário o uso do flagelo para adaptação nesses ambientes, como contra respostas imunológica e bioquímica (KRÜGER; ENGSTLER, 2015).

O segundo estágio morfológico, chamado amastigota, é obrigatoriamente intracelular do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos e que se multiplica por divisão binária dentro de macrófagos humanos. É uma forma arredondada, com flagelo interno e imóvel e que mede entre 1,5 e 6,5  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie (LAINSON; SHAW, 1978). Nos macrófagos, as amastigotas ficam dentro de um vacúolo parasitóforo, chamado

fagolisossoma, que as separa do citoplasma celular. Esta é a forma encontrada nos hospedeiros vertebrados, como roedores, cães e humanos, responsável pela doença (Figura 1B) (REAL et al., 2014).

**Figura 1. Formas morfológicas de *Leishmania* spp.**



(A) Forma promastigota de *Leishmania* spp. (B) Formas amastigotas intracelulares indicadas pela seta.

Fonte: adaptado de CDC (2017)

Foram descritas mais de 50 espécies de *Leishmania*, entre as quais 31 espécies são conhecidas por infectar mamíferos, e 20 delas são patogênicas para o ser humano, resultando em doença classificada de acordo com o estabelecimento da lesão: leishmanioses visceral ou calazar (LV); cutânea (LC); cutâneo-difusa (LCD) e mucocutânea (LMC) (AKHOUNDI et al., 2016).

### 2.1.1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

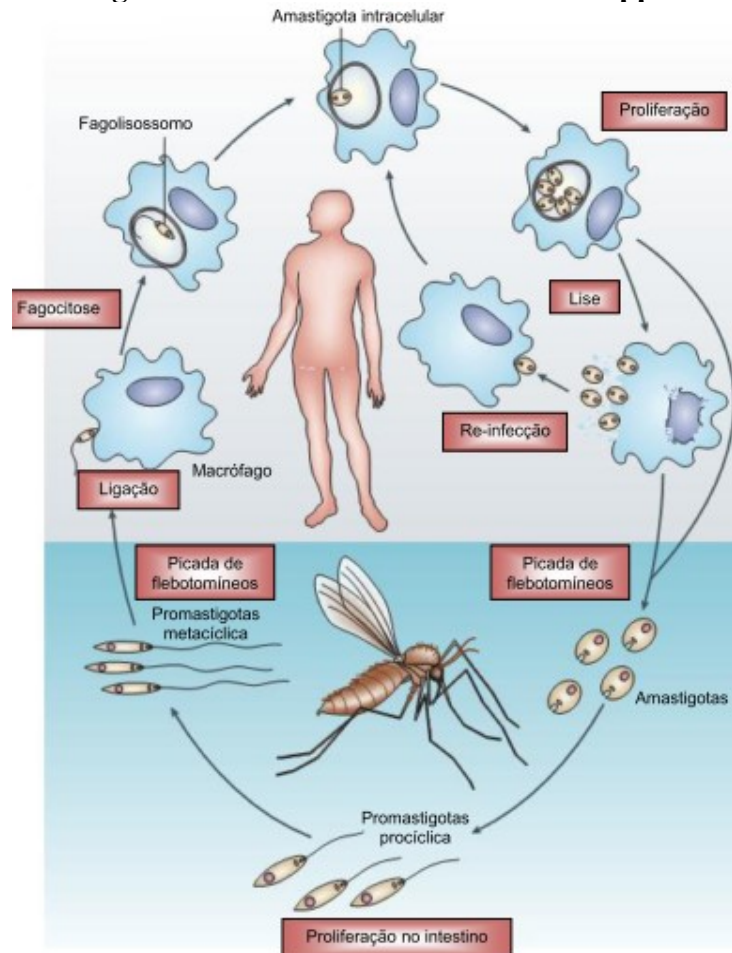
De maneira geral, a leishmaniose é uma doença transmitida por fêmeas de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos, e classificados como pertencente a ordem Diptera, família Psychodidae, e subfamília Phlebotominae (AKHOUNDI et al., 2016).

No ciclo de vida de *Leishmania* spp., as promastigotas migram em grande número para a parte anterior do intestino do vetor e se fixam pelo flagelo. A posterior migração destas formas para a faringe e probóscide leva à inoculação das mesmas na pele de hospedeiros vertebrados quando o vetor faz o repasto sanguíneo (ANTONELLI et al., 2005; LAINSON; SHAW, 1978).

Da mesma forma, quando o vetor se alimentar de um hospedeiro já acometido pela doença, ele irá ingerir macrófagos contendo amastigotas de *Leishmania* spp. presentes na pele

e no sangue periférico, que se transformarão em promastigotas no seu trato digestivo, permitindo que a doença seja transmitida para outros hospedeiros saudáveis (Figura 2) (KRÜGER; ENGSTLER, 2015; LAINSON; SHAW, 1978)

**Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.**



Fonte: Adaptado de AMARAL, 2011; CHAPPUIS et al., 2007

Nos macrófagos, as amastigotas ficam dentro de um vacúolo parasitóforo, chamado fagolisossoma. Esta organela é derivada da fusão de outras duas organelas celulares dos macrófagos: o fagossoma, que é responsável pela fagocitose e o lisossoma, responsável pela lise de microrganismos. (REAL et al., 2014).

O parasito de *Leishmania* spp. habita também a pele do hospedeiro, permitindo que o vetor faça a ingestão ao se alimentar. O vetor tem comportamento telmófago, ou seja, ao picar o hospedeiro produz uma lesão e se alimenta do sangue extravasado, permitindo a ingestão de parasitos presentes na pele do hospedeiro previamente infectado (CAPEWELL et al., 2016).

### 2.1.2. Imunopatogênese de *Leishmania* spp.

O estabelecimento da infecção primária e o desenvolvimento de sintomas clínicos dependem de fatores relacionados ao parasita, ao hospedeiro, ao mosquito transmissor, como a quantidade e rota de inoculação e da manutenção de macrófagos em um estado inerte e inativo. Sabe-se que o mosquito tem papel fundamental no estabelecimento da infecção, tendo em vista que a sua saliva possui substâncias vasodilatadoras, aumentando o eritema, a quantidade de parasitos inoculados, persistência e tamanho da lesão (REITHINGER et al., 2007).

A patogênese segue um sistema complexo de interações entre vários fatores desencadeados pela resposta imune do hospedeiro, sendo ela inata ou adquirida (por exemplo: macrófagos, células *natural killer* (NK), neutrófilos). Essas respostas inflamatórias são mediadoras da expressão da doença e podem resultar em leishmaniose assintomática, auto cura em casos de LC ou ainda na cronicidade da leishmaniose, como nos casos que evoluem para LMC ou LCD (PHILLIP, 2005; REITHINGER et al., 2007).

O sistema imune humano possui várias células apresentadoras de antígenos, mas uma das principais são os linfócitos T *helper* CD4+ (REITHINGER et al., 2007). A sub-população conhecida como linfócitos Th2 é responsável pela produção de interleucinas como IL-4, IL-5, e IL-10, que estão associados a processos alérgicos e proteção contra agentes extracelulares. Essas células, quando ativadas, levam ao agravamento da doença, quando esta envolve parasitos intracelulares (CHRISTENSEN et al., 2018; REITHINGER et al., 2007).

Por outro lado, a sub-população conhecida como linfócitos Th1, é responsável por produzir citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), responsáveis pela proteção contra patógenos intracelulares. Essas células estão relacionadas ao controle da infecção, pois ajudam na ativação dos macrófagos, tornando-os capazes de eliminar o parasito (ANTONELLI et al., 2005; CHRISTENSEN et al., 2018).

Na pele do hospedeiro, encontram-se células do sistema imune, como macrófagos, linfócitos T e B e mastócitos. Por um mecanismo que envolve receptores e ligantes de superfície, o parasito adere-se à superfície dos macrófagos, passando para o meio intracelular por fagocitose (ANTONELLI et al., 2005). A protease Gp63, principal glicoproteína de superfície das espécies de *Leishmania*, é um fator de virulência que facilita o primeiro contato entre o parasito e o macrófago, favorecendo a ligação entre eles, e consequente sobrevivência do parasito dentro dos fagolisossomos da célula (AKHOUNDI et al., 2017).

Células NK são capazes de produzir IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , duas citocinas necessárias para potencializar a atividade leishmanicida de células fagocíticas. Essas citocinas também

contribuem na formação de granulomas nos tecidos infectados para conter a propagação do parasito. As células NK são ativadas pelo lipofosfoglicano (LPG) presente nas espécies de *Leishmania* por meio de receptores TLR2 (do inglês *Toll-like receptor*) que induzem a produção das citocinas (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016).

Promastigotas de *Leishmania* spp. sintetizam LPG, sendo o principal glicoconjugado presente na superfície do parasito, incluindo o flagelo. Este complexo é composto por um núcleo fosfossacarídico, ligado a uma molécula de fosfatidilinositol lipídico, a mais uma região fosfossacarídica e a uma pequena estrutura oligossacarídica (TURCO; DESCOTEAUX, 1992).

O LPG interage diretamente com sítios de ligação presentes nos macrófagos, ou indiretamente com os receptores do sistema complemento CR1 e CR3. A sinergia desta molécula com IFN- $\gamma$  pode induzir a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzida por citocina) em macrófagos. Esta expressão é diretamente relacionada à atividade leishmanicida (PROUDFOOT et al., 1996).

O efeito protetor de IFN- $\gamma$  é alcançado por meio de diversos mecanismos, como pela indução da expressão do gene NO sintase 2 (NOS2); favorecendo a polarização de células T CD4+, garantindo assim a produção dessa citocina; e induzindo a maturação de células dendríticas e sua migração para os linfonodos (DE MARIA et al., 2011; FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016).

Portanto, o mecanismo de controle da progressão de LC pode ser sugerido pela ativação de macrófagos frente a promastigotas que expressam LPG, levando à produção de IL-12, a qual leva à diferenciação de células Th1 que produzem IFN- $\gamma$ , ativando macrófagos a produzir NO e levando assim à morte de parasitos intracelulares. O fosfoglicano presente na molécula de LPG pode inibir a síntese de NO pelos macrófagos, tendo papel modulador determinante na relação parasito-hospedeiro, pois pode resultar na sobrevivência do parasito (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016; PROUDFOOT et al., 1996).

Tendo em vista as condições para a instalação da doença, pacientes com uma comorbidade pré-existente, como por exemplo HIV/AIDS, geralmente apresentam uma manifestação clínica mais grave (REITHINGER et al., 2007). Apesar de LC ser uma doença benigna onde grande parte dos casos evoluem para cura, os pacientes com esse quadro clínico podem apresentar disseminação da infecção para outros sítios da pele, bem como anergia a resposta imune e má resposta ao tratamento com quimioterápicos, desenvolvendo LCD (LAINSON; SHAW, 2005).

A migração de neutrófilos para o local da picada do inseto é fator determinante para o estabelecimento da infecção (PETERS et al., 2008). Há evidências de que promastigotas de *L. donovani* mantêm-se em compartimentos não-líticos de neutrófilos e são transferidas para os macrófagos quando estes internalizam neutrófilos infectados ou apoptóticos, funcionando assim como um “Cavalo de Troia” (GETTI; CHEKE; HUMBER, 2008; GUEIRARD et al., 2008; REAL et al., 2014). Esta tática sugere que a transferência do parasito de célula para célula é essencial para o estabelecimento da infecção, especialmente nas primeiras horas após a picada do vetor, pois não há contato com o meio extracelular do hospedeiro (REAL et al., 2014).

A liberação de amastigotas é consequência do ambiente citolítico modulado pela resposta imune do hospedeiro e pode não ser promovida ativamente pelo parasito. As amastigotas são liberadas por um processo similar à exocitose, ou seja, não existe um processo lítico resultado da multiplicação de amastigotas intracelulares. A saída de *Leishmania* spp. das células hospedeiras é mediada por extrusão de vacúolos parasitóforos, que são englobados por macrófagos vizinhos, levando à propagação da doença (REAL et al., 2014).

## 2.2. Leishmanioses

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), um conjunto de 20 doenças conhecidas como DTNs está presente em 149 países do mundo. Atingem aproximadamente 1 bilhão de pessoas na faixa tropical do globo, com maior prevalência na população de baixa renda, que possui acesso limitado à água potável e saneamento básico. As leishmanioses fazem parte deste grupo de doenças, sendo o Brasil o país de maior prevalência nas Américas (ALVAR et al., 2012).

As leishmanioses são zoonoses, e os hospedeiros principais são animais de vida selvagem na floresta; ou de vida doméstica, como cães, no ambiente urbano. O ser humano é um hospedeiro acidental, pois quando os vetores fazem o repasto sanguíneo nestes hospedeiros, a doença é transmitida. Nas Américas, provavelmente a origem da doença em humanos surge junto com a colonização e desmatamento de áreas de floresta da região Amazônica, onde o flebotomíneo precisou adaptar-se a um habitat peridoméstico (LAINSON; SHAW, 2005).

A doença conhecida como LV ou calazar foi descrita pela primeira vez em 1901, quando Leishman e Donovan descreveram um protozoário em tecido de baço de pacientes indianos, o qual recebeu o nome de corpos Leishman-Donovan (AKHOUNDI et al., 2016;

HERWALDT, 1999). A LV tem o primeiro registro nas Américas em 1913, no Paraguai, e desde então foi encontrada em quase todos os países da América Latina. Em 1937 foi dado o nome de *L. chagasi* ao parasito, diferenciando de *L. donovani* encontrado em outros casos na Índia (LAINSON; SHAW, 1978). O quadro clínico da doença pode ser fatal se não tratado a tempo, e é causado por espécies do Complexo *Leishmania donovani*, sendo elas *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum* (OGUNGBE; ERWIN; SETZER, 2014).

Anualmente, a OMS estima 400 mil novos casos de LV. Um estudo mostrou que entre os anos de 1990 a 2016, o número de casos no Brasil foi de 84.922, atingindo um índice de mortalidade de 7,4% em 2016 (TRINDADE BEZERRA et al., 2018). Somente no ano de 2017, 94% dos novos casos aconteceram em sete países do mundo, sendo o Brasil o único representante das Américas (OMS, 2019).

A LV canina também é uma doença presente em diversos países, com índice superior a 20% de cães contaminados em regiões endêmicas (OMS, 2019), sendo o principal agente etiológico o parasito *L. infantum* (NAUCKE; LORENTZ, 2012).

No ano de 2010 quatro casos autóctones de LV canina foram notificados no município de Florianópolis, e desde então Santa Catarina passou a ser considerada região endêmica para a doença (SANTA CATARINA, 2018).

Entre os anos de 2015 e 2016, 6.489 novos casos foram notificados em 22 das 27 unidades federativas do país, sendo Santa Catarina um dos cinco estados sem nenhum caso autóctone registrado (BRASIL, 2016). O primeiro caso autóctone no estado foi registrado em 2017, no município de Florianópolis, onde o agente etiológico encontrado foi *L. infantum*. O paciente não viajou para nenhuma localidade endêmica, mas possuía vários cachorros doentes sem acompanhamento veterinário (BUENO et al., 2019).

A leishmaniose, de maneira geral, é uma doença transmitida vetorialmente. Mas existem relatos de transmissão vertical, ou seja, independente de mosquito vetor. Em 2011 na Alemanha, região não-endêmica para a doença, um filhote de cachorro foi diagnosticado com *L. infantum* adquirido da mãe, de maneira congênita (NAUCKE; LORENTZ, 2012).

Em seres humanos, transmissão não-vetorial também já foi relatada. Em 1960 no Reino Unido, região não-endêmica, o primeiro caso de transmissão sexual de LV foi relatado. A mulher apresentou lesões genitais contendo *Leishmania* spp. dois anos após o casamento com o marido, que já havia feito o tratamento oito anos antes para a doença (SYMMERS, 1960). Em 2003 na Índia, uma criança de 7 meses de idade adquiriu LV após transfusão sanguínea de um tio infectado (DEY; SINGH, 2006).

A LTA, popularmente conhecida como "Úlcera de Bauru", foi descrita pela primeira vez em 1909 por Paranhos e colaboradores (AKHOUNDI et al., 2016). É a forma mais comum da doença, com um número estimado de 1 milhão de novos casos anualmente, sendo Brasil o país de maior prevalência nas Américas (ALVAR et al., 2012; OMS, 2019). Entre os anos de 1990 a 2016 foram reportados 687.780 novos casos no Brasil, e entre 2015 a 2017 foram notificados em média 16.537 (TRINDADE BEZERRA et al., 2018; BRASIL, 2018).

### 2.2.1. Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA caracteriza-se pela formação de lesões cutâneas que surgem, em média, entre dois a seis meses após a picada do mosquito vetor e normalmente evoluem para a cura após o tratamento (LAINSON; SHAW, 2005; REITHINGER et al., 2007). Essas lesões iniciam como pápulas, evoluem para nódulos e posteriormente para úlceras, que apresentam uma depressão no centro e bordas endurecidas e elevadas (HERWALDT, 1999; LAINSON; SHAW, 2005; REITHINGER et al., 2007).

A doença está associada a 14 espécies de *Leishmania* conhecidas pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Após novos estudos de revisão taxonômica baseada em análise molecular, a etiologia de LTA agora inclui duas novas espécies: *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* e *Leishmania (Leishmania) waltoni* (SILVEIRA, 2019).

O primeiro caso de LTA no Brasil foi registrado por Lindenberg; e Carini e Paranhos, em paciente do estado de São Paulo em 1909. O nome *Leishmania braziliensis* foi dado a um caso que surgiu mais tarde em Minas Gerais em 1911, por Gaspar Vianna (LAINSON; SHAW, 1978, 2005).

Na América Latina, o maior agente etiológico de LTA é o parasito de *L. (Viannia) braziliensis* devido sua ampla distribuição, da América Central até à América do Sul, especialmente no Brasil. Este parasito possui amplos espectros clínico e patológico de LTA, principalmente LMC (SILVEIRA, 2019). O segundo agente com maior patogenicidade é *L. (Leishmania) amazonensis*, que também pode induzir as formas localizada e disseminada, mas principalmente induz a forma clínica mais severa e incurável, conhecida como LCD anérgica. Esta manifestação da doença é grave e acomete aproximadamente 1% dos casos de LTA por ano no Brasil (BRASIL, 2017; CHRISTENSEN et al., 2018; SILVEIRA, 2019).

Macrófagos infectados transportam os parasitos para outras partes do corpo produzindo lesões secundárias extremamente desfigurantes, como nas mucosas de nariz, faringe e laringe. Estas feridas aparecem dentro de alguns meses após a lesão inicial ter surgido, ou ainda anos após, quando o paciente já está supostamente curado. O primeiro surto



de LMC no Brasil foi relatado por Pessôa, em 1941, no estado de São Paulo. De 110 pessoas com lesões cutâneas que duraram mais de um ano, 80,9% delas apresentaram feridas mucocutâneas (LAINSON; SHAW, 2005).

No estado de Santa Catarina, casos de LTA são relatados desde 1987 em municípios de área rural e destacaram-se *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* como os principais agentes etiológicos no estado (GRISARD et al., 2000).

O diagnóstico para LTA é feito pela pesquisa do parasito em lâmina de esfregaço corada por Giemsa. O teste de reação de Montenegro pode ser feito, mas não é critério para diagnóstico da doença ativa porque pode ser positivo em pacientes que desenvolveram leishmaniose previamente (LAINSON; SHAW, 2005).

### 2.2.2. Leishmaniose Cutâneo-Difusa

O primeiro relato de uma forma incomum de LC ocorreu na Venezuela, em 1948, por Convit e Lapenta. As lesões eram nodulares e difusas por todo o corpo, contendo grande número de amastigotas, reação de Montenegro negativa e quase total resistência à quimioterapia (LAINSON; SHAW, 2005).

A LCD é uma forma grave da doença, altamente invasiva e destrutiva, resultado da falta de resposta imune mediada por célula por parte do hospedeiro. É caracterizada por macrófagos intensamente parasitados dentro de nódulos que se espalham descontroladamente pela pele. Essa forma agressiva também invade as mucosas nasal e orofaríngea de pacientes em estágios avançados da doença. Em alguns casos as lesões podem ser ulcerativas, similar ao que se encontra em doenças como lepra, levando à amputação de dedos dos pés e das mãos (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016; LAINSON; SHAW, 2005).

Nas Américas, essa condição é associada somente a infecções do complexo *L. mexicana*, como *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) amazonensis*. Estes agentes são encontrados principalmente no México, Venezuela e Brasil, respectivamente. Na América do Sul, *L. (L.) amazonensis* é transmitida pelo vetor *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata*, encontrada principalmente em regiões de floresta, em espécies de roedores e raposas como hospedeiro intermediário (LAINSON; SHAW, 2005).

A LCD anérgica é resultado da falta de proteção por parte das células T (CD4+/ativação de resposta imune do tipo Th1) em controlar a infecção, resultando em resposta CD4+/ativação imunológica de Th2 com alta produção de IL-10 e transformação de fator de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) culminando em uma resposta muito fraca a tratamentos tradicionais como antimoniais pentavalentes e anfotericina B (CAMPOS et al., 2018; SILVEIRA, 2019).

Em modelos murinos, macrófagos infectados sofrem mudanças transcricionais e morfológicas que permitem a sobrevivência do parasito. Tais mudanças incluem a inibição de iNOS, TNF- $\alpha$  e IL-12, com aumento de IL-10 e expressão de TGF- $\beta$  (CHRISTENSEN et al., 2018; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). A resposta de células B também está relacionada à progressão da doença, produzindo anticorpos locais que ajudam a ativar um fenótipo regulador de macrófagos que é permissivo com o crescimento parasitário. Altos níveis de imunoglobulinas são indicativos de agravamento da doença, e no caso de LCD, especialmente a IgG4 está presente nas lesões de pacientes. Este anticorpo é o isótipo mais raro de IgG, compreendendo somente 1% da população adulta (CHRISTENSEN et al., 2018).

Pacientes com LCD possuem resposta imune diminuída e menor número de células NK no sangue e nos tecidos lesionados, além de menor capacidade em produzir IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  quando estimuladas com LPG de *Leishmania* spp. A falta destas citocinas também pode ser responsável pela propagação descontrolada do parasito (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016).

### **2.2.3. Tratamento para leishmaniose tegumentar americana**

O tratamento para leishmaniose teve início em 1912, quando foi introduzido no Brasil o antimonial trivalente, também conhecido como tártaro emético. Os antimoniais pentavalentes são medicamentos de escolha desde 1945. Sua ação é bastante eficaz *in vitro*, mas em modelo animal depende de fatores como células T e citocinas (DE LIMA et al., 2007; MURRAY, 2001).

No Brasil, os medicamentos disponíveis para o tratamento para LTA são de uso sistêmico (BRASIL, 2018). O Ministério da Saúde preconiza o uso de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®); anfotericina B em desoxicolato de sódio (AB-DOC) e formulação lipossomal; e isotionato de pentamidina (BRASIL, 2017).

Nos últimos anos, a miltefosina (hexadecilfosfocolina), um alquilfosfolípido, demonstrou boa eficácia como o primeiro medicamento oral administrado para leishmaniose visceral (KEDZIERSKI et al., 2009). Em 2018, o Ministério da Saúde passou a incorporar a miltefosina para tratamento de LTA, mas ainda não é disponibilizado pelo SUS por não ter registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2018). Estudos demonstram que miltefosina possui potencial teratogênico e tempo de meia-vida alto, o que impede que mulheres em idade fértil engravidem em até quatro meses após o término do tratamento com miltefosina (MOSIMANN et al., 2018).

Existem vários fatores limitantes relacionados aos medicamentos usados no tratamento de LTA, como dores musculares e articulares, febre, dor de cabeça, náusea, vômitos, alterações de função hepática, cardíaca, e renal podendo evoluir para casos agudos de insuficiência renal, relatados para todos eles (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; MINODIER; PAROLA, 2007). A AB lipossomal apresenta menor citotoxicidade quando comparada aos demais tratamentos (MANZONI et al., 2012), porém devido seu alto custo, o acesso a este tratamento é limitado.

O Quadro 1 apresenta a comparação entre a posologia dos medicamentos disponibilizados pelo Ministério da Saúde (2017; 2019), bem como o custo para o tratamento e uso clínico.

**Quadro 1. Tempo de uso e custo dos medicamentos disponíveis no SUS**

Medicamento	Dose indicada	Custo	Uso indicado
Desoxicolato de Anfotericina B	0,7 a 1,0mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40mg/kg. Um paciente de 60kg pode usar 36 ampolas, durante o tratamento de 42 a 43 dias consecutivos.	Anforicin B® (Cristália) - R\$518,43 caixa com 25 ampolas	2ª escolha em casos de LC e LMC qualquer que seja o agente etiológico.  2ª escolha em casos de LCD.  2ª escolha em casos de LV.  1ª escolha nos casos de pacientes coinfectados com HIV ou outras imunossupressões.
Anfotericina B lipossomal	2 a 5mg/kg/dia, com dose total de 25 a 40mg/kg. Um paciente de 60kg	Ambisome® (United Medical) - R\$15.330,66 caixa com 10 ampolas	1ª escolha em casos de LC e LMC quando o agente etiológico

	pode usar 36 ampolas, durante o tratamento de 9 dias consecutivos (4 ampolas/dia).		for qualquer um, inclusive <i>L. guyanensis</i> .  2ª escolha em casos de LCD.  1ª escolha em casos de LV.  1ª escolha nos casos de pacientes coinfectados com HIV ou outras imunossupressões
Antimoniato de N-metilglucamina	10 a 20mg Sb <sup>+5</sup> /kg/dia Um paciente de 60kg pode usar de 1,5 ampola a 3 ampolas por dia de tratamento, durante 20 dias consecutivos.	Glucantime® (Sanofi-Aventis) - R\$456,70 caixa com 50 ampolas	1ª escolha em casos de LC e LMC quando o agente etiológico for qualquer um, exceto <i>L. guyanensis</i> .  Não responde ao tratamento de LCD.  2ª escolha em casos de LV.
Isotionato de pentamidina	3 a 4mg/kg/dia, em dias alternados. Um paciente de 60kg pode usar 4,2 ampolas	N/A	1ª escolha em casos de LC e LMC quando o agente etiológico

	durante o tratamento de 7 dias.		for qualquer um, inclusive <i>L. guyanensis</i> .
--	---------------------------------	--	---

Fonte: adaptado de BRASIL, 2017; ANVISA, 2019.

Apesar da variedade de medicamentos disponíveis para tratamento de LTA, ainda se enfrentam problemas como a alta toxicidade, necessidade de internação hospitalar para administração medicamentosa, longos períodos de tratamento, e resistência do parasito (CORWARE et al., 2011).

### 2.3. Anfotericina B

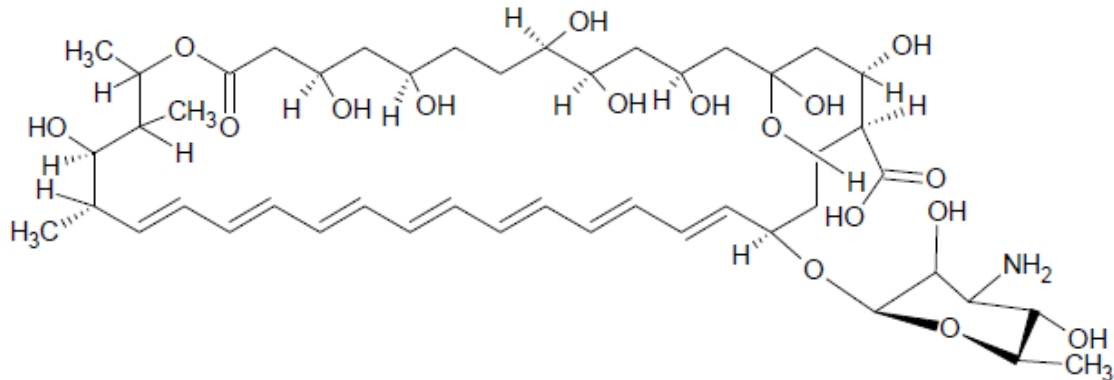
A AB é um antibiótico poliênico produzido pelo processo de fermentação o actinomiceto *Streptomyces nodosus* (CORWARE et al., 2011; FILIPPIN; SOUZA, 2006; HAMILL, 2013). Apresenta atividade frente a um amplo espectro de agentes causadores de micoses sistêmicas (PAPPAS et al., 2016), e de parasitos intracelulares obrigatórios, como *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016; YARDLEY; CROFT, 2000).

O primeiro relato de uso de AB para tratamento de leishmaniose foi no início de 1960, quando estudos demonstraram que *Leishmania* spp. apresentava o ergosterol abundante nas membranas celulares (CANNELLA et al., 2011; SAMPAIO et al., 1960).

#### 2.3.1. Estrutura química

A AB possui 37 átomos de carbono em sua estrutura, formando um anel macrocíclico fechado por lactonização (Figura 3). Possui uma cadeia hidrofóbica de duplas ligações conjugadas não-substituídas (heptaeno) e, na porção oposta, uma cadeia hidrofílica poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um aminogruppo livre, formando uma cadeia lateral (FILIPPIN; SOUZA, 2006; GANIS et al., 1971; KLEINBERG, 2006).

**Figura 3. Estrutura química da Anfotericina B**



**Fonte:** Ganis, et al. (1971)

A AB apresenta baixa solubilidade em solventes aquosos, e diversos solventes orgânicos (TORRADO et al., 2008). Apresenta solubilidade em dimetilsulfóxido (DMSO), com solubilidade aumentada a partir da adição de lauril sulfato de sódio ou desoxicolato de sódio (DOC), contudo não há a formação de um sistema homogêneo, podendo apresentar em sua constituição três formas diferentes: monomérica, oligomérica e agregados de AB-DOC (FILIPPIN; SOUZA, 2006; LEGRAND et al., 1992).

### 2.3.2. Mecanismo de ação

A membrana celular dos microrganismos possui ergosterol em sua composição, um esteroide semelhante ao colesterol presente nas células de mamíferos. O mecanismo de ação sugerido envolve a seletividade da AB para se ligar ao ergosterol, aumentando a permeabilidade da membrana celular (CORWARE et al., 2011; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). A alteração da permeabilidade celular permite o escape de pequenos íons e metabólitos, principalmente íons potássio, levando eventualmente à morte celular (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Na presença de ergosterol, a cadeia hidrofóbica contendo polienos promove a ligação e inserção do medicamento junto às camadas bilamelares lipídicas da membrana celular. Os monômeros de AB formam um poro devido a ligação dessa cadeia hidrofóbica junto aos lipídeos de membrana. A cadeia hidrofílica que contém poli-hidroxilas forma um poro na parede interna. Dessa maneira, a AB aumenta significativamente a permeabilidade da membrana, permitindo que cátions promovam a depleção de potássio intracelular e, conseqüentemente, a morte celular (KLEINBERG, 2006).

### 2.3.3. Toxicidade associada à Anfotericina B

Em um ambiente aquoso, a AB está presente como uma mistura equilibrada de monômeros e agregados solúveis e insolúveis (PETIT et al., 1997; TORRADO et al., 2008; ZIA et al., 2016). Suas propriedades anfipáticas levam à formação de agregados solúveis em água, que são tóxicos para o ser humano (CORWARE et al., 2011). Os agregados solúveis de AB demonstram mais eficiência ao induzir a permeabilidade das membranas que contém colesterol, enquanto que os agregados insolúveis e monômeros apresentam maior eficácia ao induzir danos a células que contém ergosterol (PETIT et al., 1997). Embora a AB possua maior afinidade por ergosterol, muitos dos efeitos tóxicos que lhe são atribuídos são resultados da sua capacidade em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (CORWARE et al., 2011; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Diferentes estratégias foram estudadas para diminuir a toxicidade da AB-DOC. Uma delas é aquecer o medicamento, para induzir a sua agregação, formando uma mistura de monômeros e superagregados de AB (ESPADA et al., 2008; PETIT et al., 1997; VAN ETTEN et al., 1998).

Van Etten e colaboradores (2000) reportaram um aumento no tamanho dos agregados de AB após aquecimento, a 70°C por 20 minutos, sem apresentar nenhum prejuízo a atividade antimicrobiana do fármaco. O tratamento térmico não induziu a dispersão molecular, mas sim aumentou o tamanho dos agregados até ocorrer floculação. Na temperatura de 70°C ocorre a formação de 'superagregados', resultantes da condensação das formas monoméricas com agregados de AB (PETIT et al., 1997).

Zia e colaboradores (2016) ao avaliar a diminuição da citotoxicidade de AB após o aquecimento, ressaltam que a elevada estabilidade química de AB aquecida aumenta a especificidade do fármaco em induzir a formação de poros em membranas contendo ergosterol.

Os efeitos adversos do uso de AB-DOC são relacionados à administração do tratamento em um ciclo completo (aproximadamente 40 dias), ou às altas doses utilizadas (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Reações relacionadas à infusão incluem: náusea, vômitos, febre, hipertensão ou hipotensão e hipóxia. Acredita-se que estes efeitos estão ligados ao fato de a AB estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016).

A nefrotoxicidade, principal efeito adverso relacionado ao tratamento com AB, é causado pela vasoconstrição e interação do medicamento com o túbulo distal das células renais. A ligação da AB com o colesterol das membranas celulares do túbulo distal resulta em

perda de eletrólitos, o que interfere na taxa de filtração glomerular, sobrecarregando o rim devido à constrição das arteríolas aferentes (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016).

#### **2.3.4. Formas farmacêuticas de Anfotericina B**

O uso de doses elevadas de AB-DOC (acima de 1,0 mg/kg/dia) torna o tratamento limitado, devidos aos efeitos tóxicos citados. Para solucionar estes problemas, desenvolveram-se formulações menos tóxicas e novos métodos para veiculação de AB (FILIPPIN; SOUZA, 2006). Contudo, o fator limitante ao tratamento é que as novas formulações de AB apresentam alto custo, o que inviabiliza sua utilização por grande parte da população afetada (KEDZIERSKI et al., 2009; YARDLEY; CROFT, 2000).

Atualmente são utilizadas formulações lipídicas de AB (AmBisome®, Amphocil® e Abelcet®), as quais tem sido eficazes no tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar (MOSIMANN et al., 2018). O DOC foi substituído por fosfolípideos (Abelcet®), por colesterol (Amphocil®), ou pelos dois (AmBisome®). Estas formulações demonstraram maior segurança como medicamentos, já que apresentam nefrotoxicidade inferior à gerada pela AB-DOC (KLEINBERG, 2006).

A baixa toxicidade de AmBisome® é relacionada ao pequeno tamanho dos lipossomas (<100 nm), o que resulta em circulação prolongada permitindo a distribuição em diferentes órgãos e a captação seletiva pelos macrófagos (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

O aquecimento de AB-DOC é um procedimento alternativo em relação às formulações lipídicas, que possuem alto custo. A indução de superagregação por aquecimento altera a interação de AB com colesterol e proteínas séricas, pois apresentam-se monômeros mais estáveis, o que explica a redução da toxicidade, sem comprometimento da atividade antibiótica (HARTSEL et al., 2001).

Os estudos de biodisponibilidade de AB demonstraram que a formação de superagregados permite o acúmulo em órgãos ricos em células que constituem o sistema fagocitário mononuclear, ou retículo endotelial, poupando assim o tecido renal, o que colabora para a diminuição da nefrotoxicidade (ZIA et al., 2016).



## 2.4. Nanoterapia para leishmaniose

No decorrer da última metade do século XXI, vários sistemas nanoparticulados como lipossomas, nanoesferas e nanocápsulas foram desenvolvidos como estratégia terapêutica. São utilizados como carreadores para entrega de medicamentos em sítio específico, em sua maioria administrados via intravenosa, e que agregam pequenas ou grandes moléculas (MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2011).

Esses sistemas conseguem proteger o medicamento da degradação ou inativação até atingir o local específico, aprimorando as propriedades farmacocinéticas, e também diminuir a toxicidade, aumentar o tempo de meia-vida de medicamentos, aumentando a eficácia do tratamento (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; MOGHIMI; HUNTER; ANDRESEN, 2011; VYAS; GUPTA, 2006).

O aumento da biodisponibilidade e proteção dos medicamentos nanocarreados da metabolização ocorre também pelo aumento do tempo de retenção destes nos órgãos, como fígado, rins e baço, resultando em um espaçamento maior entre administrações (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; GERSHKOVICH et al., 2009).

As nanopartículas, vesículas multilamelares ou niossomas, lipossomas e microsferas são novas estratégias para entrega medicamentosa no vacúolo parasitóforo onde as formas amastigotas de *Leishmania* spp. residem. Os macrófagos fagocitam como corpos estranhos os medicamentos nanoparticulados resultando em um alvo específico para o tratamento de amastigotas intracelulares (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; KUMARA et al., 2014; MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001).

Como representante desse sistema, existe o AmBisome®, que devido ao pequeno tamanho dos lipossomas (<100nm), resulta em circulação prolongada permitindo a distribuição em diferentes órgãos e a captação seletiva pelos macrófagos (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017)

Os lipossomas de AmBisome® são compostos por colesterol, que se ligam à AB. Outros estabilizantes, como fosfatidilglicerol e fosfatidilcolina de soja, possuem carga negativa que interagem com a carga positiva do grupo amina de AB formando um complexo no lipossoma bilamelar, permitindo a ligação específica ao ergosterol do parasito (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016).

Yardley e Croft (1997) compararam o tratamento de AmBisome® e AB-DOC frente a promastigotas de *L. major*, outro agente causador de LTA. A primeira apresentou um valor de CI<sub>50</sub> maior quando comparado com AB-DOC. Quando confrontado com amastigotas intracelulares, este valor diminuiu, sugerindo que a forma lipossomal seja captada

seletivamente pelos macrófagos, permitindo a entrega de medicamento dentro do vacúolo parasitóforo. Além disso, a citotoxicidade foi dez vezes menor em AmBisome® do que em AB-DOC.

Modelos murinos foram infectados com *L. major* para comparação da farmacodinâmica de AB-DOC e AmBisome® (WIJNANT et al., 2018). Após várias administrações, no dia 10 foi observado que a concentração da forma lipossomal era três vezes maior do que AB-DOC, com relação direta entre a concentração do medicamento e a diminuição do tamanho das lesões cutâneas e número de parasitos na lesão.

Ensaio *in vitro* com AmBisome® não costumam ter resultados compatíveis com o observado em ensaios *in vivo*. Concentrações significativamente maiores precisam ser empregadas quando comparadas com AB-DOC, o que não é observado em estudos com modelos murinos, possivelmente pelo fato de sua atividade biológica estar relacionada à captação por macrófagos (FILIPPIN; SOUZA, 2006; SOUZA et al., 2018).

Recentemente, novas formulações nanoparticuladas associadas à AB vêm apresentando atividade leishmanicida, e tornando-se alternativas promissoras de tratamento comparado às formulações já existentes (DE CARVALHO et al., 2013; MENDONÇA et al., 2016; MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001; SOUZA et al., 2018; YARDLEY; CROFT, 1997).

Jung e colaboradores (2009) apresentaram testes *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas lipídicas contendo AB-DOC. A citotoxicidade frente às células renais foi a menor, quando comparada com AB-DOC e AmBisome®. A forma nanoparticulada aumentou o tempo de meia-vida de AB-DOC na circulação sanguínea de modelos murinos.

Beheshti e colaboradores (2013) avaliaram a atividade de nanopartículas metálicas de selênio frente à *L. major*, onde foi observada a diminuição da proliferação de amastigotas e promastigotas limitando o aumento de LC em modelo murino, e até cura das lesões quando a administração foi feita após o início das lesões.

De Carvalho e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas de AB nanoencapsuladas em PLGA e DMSA. Este estudo utilizou modelo murino e avaliou atividade *in vivo* do composto nanoencapsulado frente a LTA. Observou-se que a carga parasitária na lesão diminuiu significativamente comparado ao tratamento com AB-DOC e permitiu atingir o mesmo potencial terapêutico com menor frequência de administrações.

Estes estudos são alguns exemplos de que a nanoterapia revela um futuro promissor para a diminuição da toxicidade associada ao tratamento com AB, devido suas propriedades farmacocinéticas. Um medicamento ideal deve surtir efeito em doses mínimas, não induzir a

resistência do parasito por meio de administrações menos frequentes, ser de baixo custo e ter o mínimo possível de efeitos adversos (ORYAN, 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial leishmanicida *in vitro* de formulações de Anfotericina B e associada a uma formulação de nanopartículas lipídicas sólidas sobre *L. (L.) amazonensis*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Padronizar o cultivo e teste de avaliação de viabilidade celular de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Preparar e caracterizar físico-quimicamente uma formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo AB (AB-NLS);
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* de AB-DOC, AB-HT e AB-NLS frente a formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade das formas farmacêuticas AB-DOC, AB-HT e AB-NLS sobre macrófagos.
- Avaliar o potencial hemolítico das formas farmacêuticas AB-DOC, AB-HT e AB-NLS e AmBisome® frente a eritrócitos humanos;
- Avaliar a produção e quantificação de TNF- $\alpha$  pelas formas farmacêuticas AB-DOC, AB-HT e AB-NLS.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cultivo e manutenção de parasitos e linhagem celular

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) foram cultivadas em meio 199 (Sigma-Aldrich), suplementado com biotina 1µg/mL, adenina 0,1mM, 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado. O pH foi ajustado para 7,3, mantidas a 26 °C por meio de repiques semanais.

Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram gentilmente cedidos pelo prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco. O meio RPMI foi utilizado para cultivo de macrófagos, suplementado com HEPES 10mM, 1% penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. O pH foi ajustado para 7,2 e mantidas em estufa a 36 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2. Curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis*

Promastigotas na fase exponencial de crescimento em meio 199 (Sigma-Aldrich) foram inoculadas ( $1,5 \times 10^4$  promastigota/mL), em placa de 96 poços. O crescimento foi monitorado por contagem manual diária em hemocítômetro, sendo expressa em número de promastigotas/mL de meio de cultivo. A contagem foi realizada durante um período de 9 dias, sendo a primeira contagem 24 h após o plaqueamento (T=1). A placa foi mantida em estufa a 26 °C durante o período da contagem. O resultado foi expresso em média e desvio padrão de três experimentos independentes.

### 4.3. Padronização do teste de viabilidade celular pela resazurina

O sal de resazurina foi adquirido da Sigma Chemical Co (St Louis, MO) e diluído a 2 mM com água para injetável. Um volume final de 10% (v/v) foi adicionado em cada poço.

Primeiramente, ensaios de padronização com um inóculo inicial de  $3 \times 10^5$  promastigotas/mL foram conduzidos em placas de 96 poços em triplicata e tratadas durante 48 h com 11 concentrações de AB-DOC (10,5; 21; 43; 86; 173; 335; 682; 1353; 2705; 5411 e 10822 nM).

Os tempos de leitura de fluorescência foram iniciados após a adição de resazurina, sendo eles: 5 minutos; 15 minutos; 30 minutos; 45 minutos; 60 minutos; 75 minutos; 90 minutos; 105 minutos; 120 minutos; e 180 minutos.

A determinação do melhor comprimento de onda foi avaliada para obtenção da condição de leitura do teste de viabilidade de promastigotas. Foram feitas avaliações em

comprimentos de onda de 530 nm e 560 nm de excitação e 590 nm de emissão. Estes dois tempos foram observados com relação à concentração de inibição das promastigotas.

#### **4.4. Formas farmacêuticas de Anfotericina B**

##### **4.4.1. Preparação de AB-DOC**

Para o preparo das soluções-teste contendo AB foi utilizado o medicamento Anforicin B®, adquirido do laboratório Cristália (Campinas, São Paulo, Brasil). O pó, que contém desoxicolato de sódio (DOC) como excipiente, foi diluído em água para a solução injetável com concentração final de 5 mg/mL. A solução foi mantida sob refrigeração e protegida da luz, conforme orientação do fabricante.

AmBisome® foi somente utilizado em ensaio comparativo de hemólise, pois há relatos de que sua atividade *in vitro* não é compatível com a atividade *in vivo*. Concentrações significativamente maiores precisaram ser empregadas para obter atividade antifúngica semelhante à de AB-DOC, possivelmente pelo fato da formulação lipossomal ter liberação prolongada, sendo captada por macrófagos e órgãos do sistema reticuloendotelial (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

##### **4.4.2. Obtenção de superagregados de AB-DOC**

Como descrito por Petit et al (1997), a obtenção de superagregados de AB-DOC foi feita por aquecimento constante. Alíquotas de 1 mL de AB-DOC foram acondicionadas em microtubos e aquecidas em banho-maria a 70 °C por 20 minutos. A formulação obtida foi denominada de Anfotericina B aquecida (AB-HT), com concentração final de 5 mg/mL e mantidas sob as mesmas condições de acondicionamento.

##### **4.4.3. Obtenção de Nanopartículas Lipídicas Sólidas**

Para o preparo das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foi utilizado o método de homogeneização por alto cisalhamento (NEVES et al., 2013), com modificações (SOLDATI et al., 2018).

Inicialmente, a fase orgânica composta por manteiga vegetal foi aquecida a 45 °C até a completa fusão. Em seguida, adicionou-se a esta fase AB-DOC liofilizada a fim de obter uma solução final de 1 mg/mL. Simultaneamente, uma fase aquosa constituída de Pluronic®F-127 (Sigma, USA) foi aquecida a mesma temperatura. Após, verteu-se a fase aquosa sobre a fase

oleosa e essa dispersão foi imediatamente submetida a alta agitação (11.500 rpm por 1 minuto), utilizando o Ultraturrax disperser (T 10 Basic Ultra Turrax, IKA®), seguido de irradiação ultrassônica (Vibra Cell, Sonics, USA) por 10 minutos com intensidade de 35%, auxiliado por uma ponta de ultrassom.

Desta mesma forma, uma nanopartícula vazia foi preparada para ser utilizada como controle nos ensaios de viabilidade (C-NLS).

## **4.5. Caracterização de NLS**

### **4.5.1. Caracterização físico-química**

O tamanho de partícula (TP) da nanopartícula foi analisado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz a 90° (*Dynamic Light Scattering* - DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Este método é baseado no movimento browniano, no qual as partículas em suspensão estão em movimento permanente e se difundem em todas as direções (RODRIGUES et al., 2003). DLS é utilizada somente para partículas com diâmetro entre 3 nm até 1 µm (HEURTAULT et al., 2003; UNER, 2006). Dessa forma, a intensidade da luz dispersa irá variar com o diâmetro das partículas e a velocidade dos movimentos brownianos, sendo que as partículas menores têm um movimento mais rápido, dispersando menos luz (HEURTAULT et al., 2003).

As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:400), e as medidas foram realizadas a 25 °C com laser HeNe (633 nm) como feixe incidente em ângulo de detecção de 173° em uma cubeta de quartzo. O índice de polidispersão (PDI) da nanopartícula foi determinado a partir dos dados obtidos da velocidade de decaimento da função de correlação de fótons.

O potencial zeta (PZ) foi medido por microeletroforese Doppler a laser utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS. O volume de 1 mL das amostras puras foi analisado a 25 °C, a carga das partículas foi calculada pela medida da sua velocidade de migração usando a equação de Smoluchowski, em cubeta DTS própria para a análise.

### **4.5.2. Estudo da estabilidade**

As amostras de C-NLS e AB-NLS foram mantidas a 4 °C durante o período de avaliação, em frascos protegidos da luz. As medidas de TP, PDI e PZ de AB-NLS foram avaliados em três amostras diferentes, nos dias 1, 30, 60 e 90, após o preparo.

#### 4.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Previamente à análise por MET, as amostras de AB-DOC, AB-HT e AB-NLS foram diluídas em água para injetável (1:5; 1:5; e 1:10 v/v, respectivamente) e depositadas sobre um *grid* de níquel (200 *mesh*), previamente revestido com parlodium® e carbono amorfo, e corada com acetato de uranila para contraste. A amostra foi seca em temperatura ambiente durante 48 h sob papel filtro. As partículas foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET JEM-1011, JEOL, EUA), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), em uma magnitude de 100.000 vezes, operado a 100 kV.

#### 4.6. Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

As promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase exponencial foram centrifugadas a 390 x *g* por 5 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensão com meio 199, e preparada uma suspensão para inoculação de  $3 \times 10^6$  promastigotas/mL em placa de 96 poços.

AB-DOC, AB-HT e AB-NLS, nas concentrações de 21; 43; 86; 173; 335; 682; 1353; 2705; 5411 e 10822 nM, foram diluídas a partir da solução-mãe em meio 199 e testadas frente a promastigotas. O controle negativo foi preparado apenas promastigotas e meio 199. Como controle positivo nos testes com AB-NLS, foram feitos poços com tratamento C-NLS referente à maior concentração testada (10822 nM). Os valores de viabilidade foram normalizados de acordo com este controle e o resultado está expresso nos gráficos de AB-NLS, junto ao controle negativo. Para cada uma das concentrações, foi feito um poço de branco, contendo a formulação diluída em meio 199, sem células, para posterior subtração da unidade de fluorescência.

O tratamento foi adicionado junto com a suspensão de células, e ambos ficaram em contato durante 24 h, 48 h e 72 h, em estufa a 26°C.

Após os períodos de incubação, adicionou-se 10% (v/v) de resazurina 2mM em cada um dos poços de tratamento, incluindo os poços de controle e branco. A fluorescência foi obtida em fluorímetro (Multileitora Spectramax Paradigma) após 1 hora, 12 horas e 24 horas da adição do resazurina, em comprimento de onda de 530 nm excitação/590 nm emissão.

#### 4.7. Avaliação da citotoxicidade das formas farmacêuticas de Anfotericina B

Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram centrifugados a 390 x *g* por 5 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensão com meio RPMI para obtenção de uma suspensão de  $10^5$



macrófagos/mL, em placa de 96 poços. Durante 24 h, a placa foi incubada a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> permitindo a adesão das células, para posterior tratamento.

AB-DOC, AB-HT e AB-NLS, nas concentrações de 21; 43; 86; 173; 335; 682; 1353; 2705; 5411 e 10822 nM, foram diluídas a partir da solução-mãe em meio RPMI. Foram preparados poços de controle, contendo apenas células e meio RPMI. Como controle positivo nos testes com AB-NLS, foram feitos poços com tratamento C-NLS referente à maior concentração testada (10822 nM). Os valores de viabilidade foram normalizados de acordo com este controle e o resultado está expresso nos gráficos de AB-NLS, junto ao controle negativo. Para cada uma das concentrações, preparou-se um poço de branco, contendo a formulação diluída em meio RPMI, sem células.

O tratamento foi adicionado após 24h de adesão e ficou em contato durante 24 h, 48 h e 72 h em estufa de 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após esse período, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se uma diluição de 10% (v/v) de resazurina 2mM em cada um dos poços de tratamento, incluindo os poços de controle e branco. A fluorescência foi lida em fluorímetro (Multileitora Spectramax Paradigma) após 1 hora, 12 horas e 24 horas da adição do resazurina, em comprimento de onda de 530 nm excitação/590 nm emissão.

#### **4.8. Quantificação de TNF- $\alpha$**

Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram inoculados em placa de 96 poços, conforme descrito no ensaio de atividade biológica.

Para o teste de quantificação de TNF- $\alpha$ , foi utilizado o sobrenadante de macrófagos que ficaram em contato com o tratamento durante 48 h com os compostos AB-DOC, AB-HT, AB-NLS e C-NLS, na concentração de 10822 nM. O controle utilizado foi o sobrenadante de poços que continham apenas células e meio RPMI.

De acordo com bula do fabricante (BD OptEIA®), uma placa de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) de 96 poços foi coberta com 100  $\mu$ L de anticorpo de captura anti-*mouse* monoclonal e incubada *overnight* a 4 °C. Posteriormente, foi aspirado e lavado com tampão de lavagem, bloqueado com diluente constituído de PBS e SBF 10% a temperatura ambiente durante 1 h, e lavado novamente com tampão.

Uma curva de calibração foi construída contendo concentrações conhecidas de padrão, concomitantemente ao ensaio com as amostras. Uma alíquota de 100  $\mu$ L de cada componente foi adicionado à placa, e incubado a temperatura ambiente durante 2 h. Após este período, os poços foram lavados com tampão, e 100  $\mu$ L de uma solução de detecção contendo anticorpo

anti-*mouse* e um conjugado de peroxidase (Streptavidin-HRP) foram adicionados em cada poço. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 h.

Posteriormente, a adição de uma solução para bloquear a reação, a placa foi levada para leitura da absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. O ensaio foi realizado em triplicatas, e os valores de média da curva analítica foram utilizados para determinar a equação da reta. Com esses valores, as concentrações das amostras foram calculadas, em pg/mL.

#### 4.9. Teste de Hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado conforme descrito por Wang et al. (2009) com modificações. Utilizou-se uma amostra de um indivíduo saudável, não fumante e voluntário, coletada por punção venosa em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio (3,2%).

Os eritrócitos foram separados do plasma por centrifugação durante 10 min a 390 x g, em que o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos lavados com solução salina (0,9% NaCl) sucessivas vezes. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas em placa de ELISA 96 poços com diferentes volumes de dispersão de eritrócitos, e esta placa foi lida em espectrofotômetro a fim de obter valores em absorbância entre 1,8 e 2,2 UA. A faixa de diluição entre estes valores foi selecionada, sendo 90 µL de eritrócitos e 910 µL de salina.

As concentrações-teste utilizadas foram as  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  encontradas em ensaio leishmanicida das formulações AB-DOC, AB-HT, AB-NLS, C-NLS e AmBisome®. Como controle negativo, utilizou-se a solução salina, e como controle positivo, água. Os valores utilizados para teste estão na Tabela 1.

**Tabela 1. Concentrações-teste utilizadas no teste de hemólise**

$CI_{50}$		$CI_{90}$	
SOLUÇÃO	CONCENTRAÇÃO (nM)	SOLUÇÃO	CONCENTRAÇÃO (nM)
C-NLS	654	C-NLS	2413
AB-NLS	654	AB-NLS	2413
AMBISOME	654	AMBISOME	2413
AB-DOC	364	AB-DOC	1750
AB-HT	269	AB-HT	3548

Em microtubos de centrifugação, foram adicionados 90 µL de eritrócitos, 910 µL de salina e as concentrações-teste para cada uma das soluções, e então as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 h com agitação leve. Após incubação, foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos.

Posteriormente, 100 µL do sobrenadante foi retirado e inoculado em placas de 96 poços em triplicata com posterior leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm (ELX800, Biotek, Vermont, EUA). A taxa de hemólise foi calculada de acordo com a densidade óptica das amostras e controles, sendo que os controles negativos foram descontados (Equação 1). O resultado obtido indica a quantidade de hemoglobina liberada no sobrenadante pela ruptura dos eritrócitos.

#### **Equação 1. Cálculo da taxa de hemólise**

$$\text{Taxa de hemólise} = \frac{DO_T - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}} \times 100$$

DOT: densidade óptica da amostra teste; DOCN: densidade óptica do controle negativo, DOCP: densidade óptica do controle positivo.

#### **4.10. Análise estatística**

As análises estatísticas para estimar os valores de CI<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão e analisados por meio de regressão não-linear, com interpolação de 50%. Para testes que necessitam comparação entre grupos, foi usado One-way ANOVA com pós teste de Tukey. O nível de significância adotado para os testes foi definido como  $p < 0,05$ .

Para comparação da viabilidade celular entre os grupos de tratamento, os resultados são apresentados com médias e desvio padrão e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Conover utilizando o programa MedCalc. O nível de significância adotado para os testes foi definido como  $p < 0,05$ .

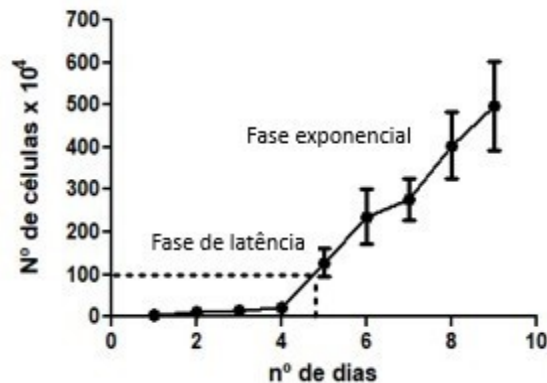
O Índice de Seletividade foi calculado com base na razão entre CC<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> encontrados nos ensaios de atividade biológica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis*

A curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis* foi construída a partir da contagem de promastigotas durante 9 dias de cultivo, com a finalidade de observar o perfil de crescimento da cepa e determinar o tempo de cultivo para os testes de atividade biológica. O início da fase exponencial foi entre o 4º e 5º dia de cultivo (Figura 4), o que permitiu determinar o tempo ideal para uso da cultura de promastigotas para os testes de atividade biológica entre o 4º e 6º dia de cultivo.

**Figura 4. Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis***



Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após inoculação de concentração inicial  $1,5 \times 10^4$  parasito/mL em meio 199. Os valores correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de três replicatas. Fonte: a autora.

### 5.2. Padronização do ensaio de resazurina para avaliação da viabilidade celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

O método da resazurina (LANCASTER; FIELDS, 1996) apresenta-se como um indicador fluorescente/colorimétrico de crescimento celular, baseado na detecção de atividade metabólica da célula majoritariamente por desidrogenases mitocondriais. O ensaio consiste em uma reação de oxirredução do indicador, o qual ao mesmo tempo que muda de cor, também emite fluorescência detectável em comprimentos de onda de 530 a 560 nm. Sugere-se que a célula necessita fazer a captação de resazurina para metabolizar o composto em resorufina (rosa, reduzido).

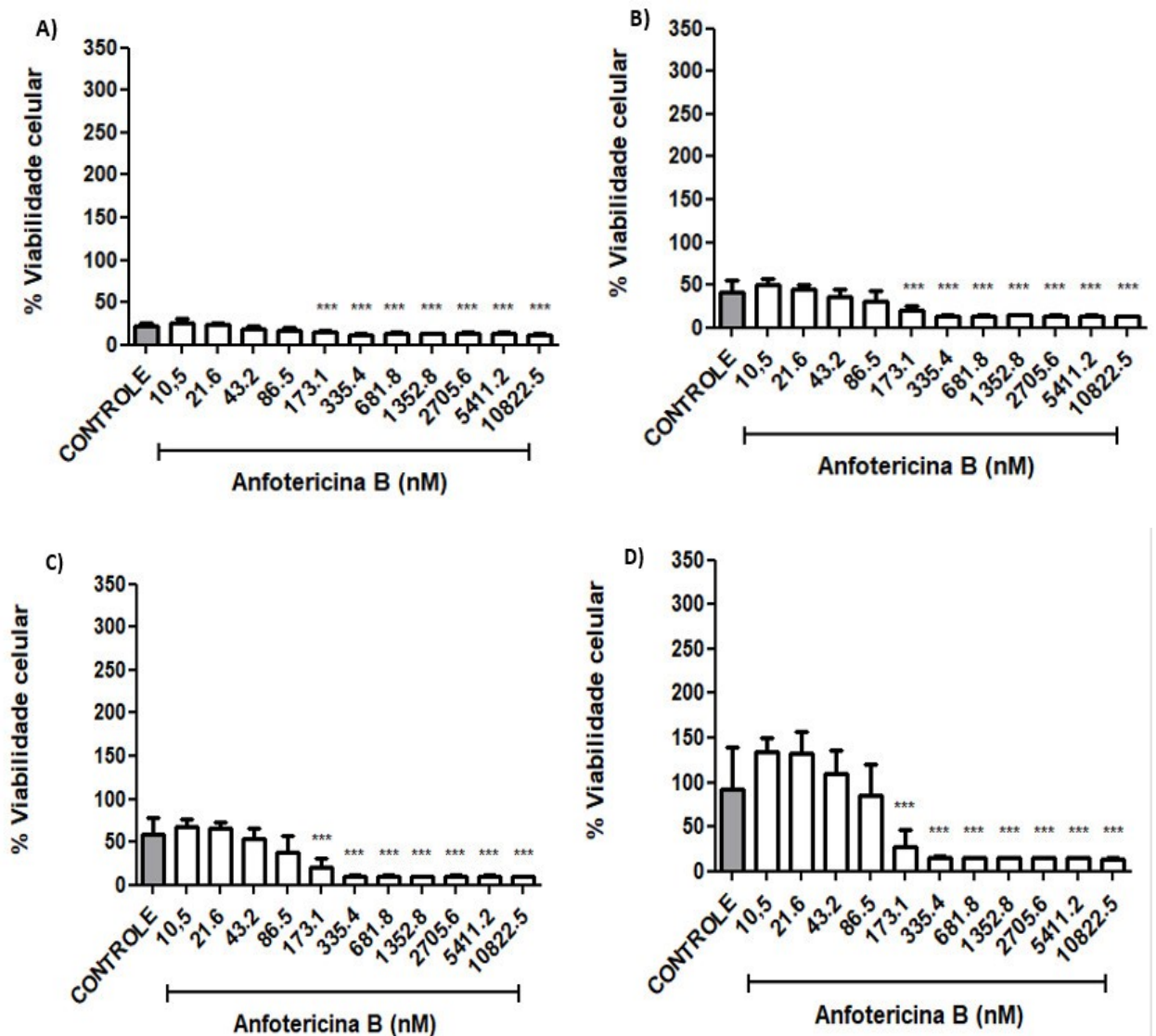
Considerando que a incubação com resazurina pode acontecer em tempos de até 72 h, e as leituras de fluorescência podem acontecer em dois comprimentos de onda, o objetivo da

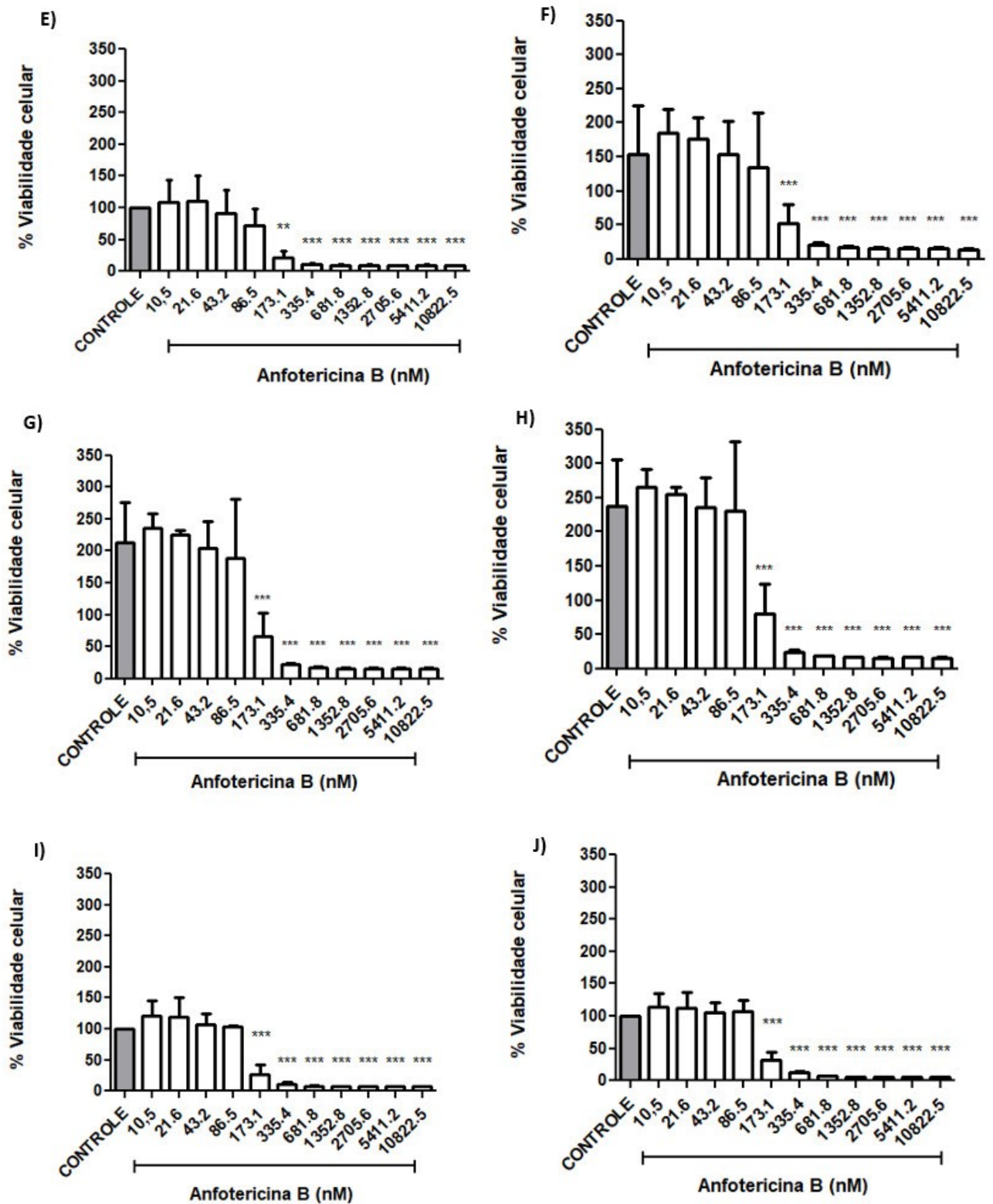
padronização foi encontrar o tempo ideal e determinar qual o comprimento de onda para utilização nos ensaios de viabilidade celular.

Primeiramente, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas durante 48 h com 11 concentrações de AB-DOC (10,5; 21; 43; 86; 173; 335; 682; 1353; 2705; 5411 e 10822 nM) e um inóculo inicial de  $3 \times 10^5$  promastigota/mL.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5, de acordo com os tempos de leitura de fluorescência após a adição de resazurina.

**Figura 5. Padronização do tempo de incubação para avaliação da viabilidade celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pelo método da resazurina**





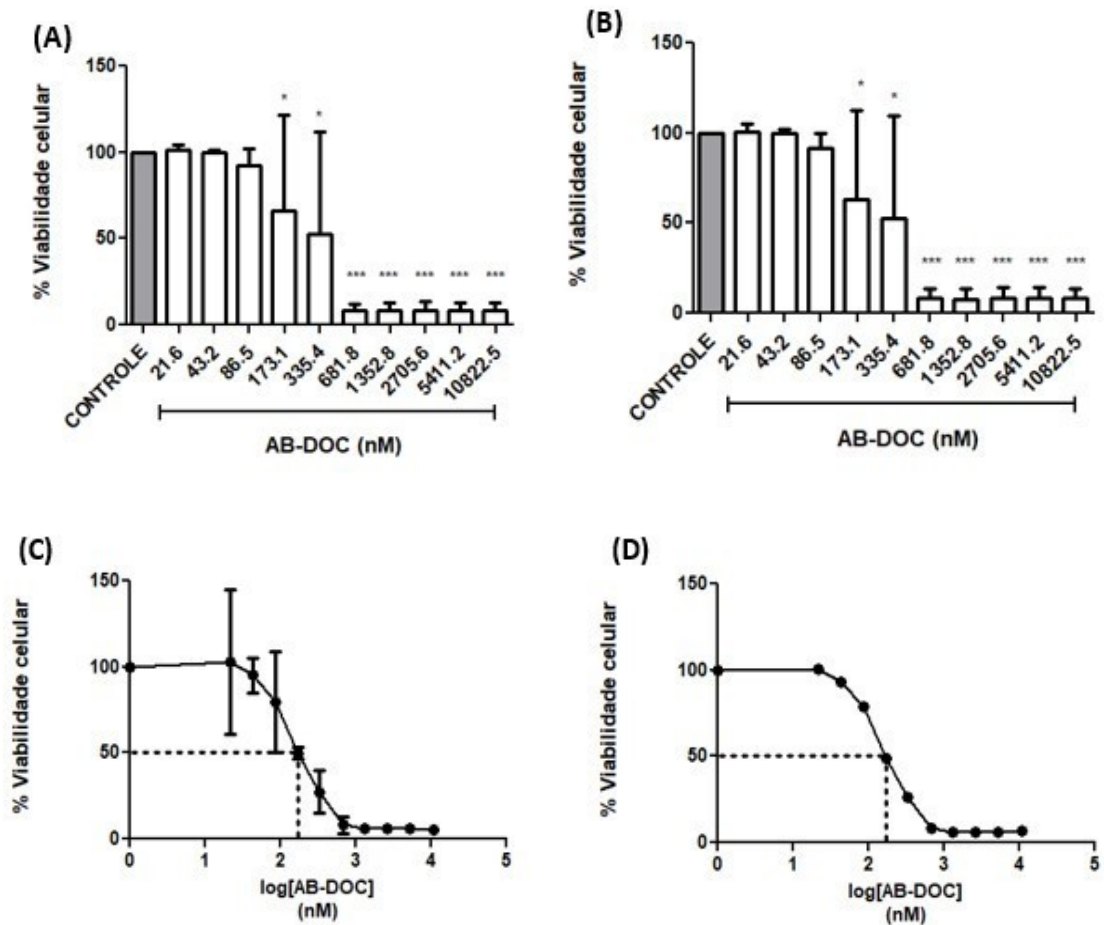
Promastigotas tratadas com AB-DOC em concentrações crescentes. Controle de promastigotas em meio 199. Perfil de fluorescência de resazurina quanto ao tempo de leitura em fluorimetria 530/590 nm, onde (A) 5 minutos; (B) 15 minutos; (C) 30 minutos; (D) 45 minutos; (E) 60 minutos; (F) 75 minutos; (G) 90 minutos; (H) 105 minutos; (I) 120 minutos; e (J) 180 minutos. One-way ANOVA e pós-teste de Tukey,  $*p < 0,05$  comparado com o controle negativo.

Neste ensaio, observou-se que para os tempos de até 180 minutos não houve redução da resazurina a resorufina. Os gráficos representam o perfil de fluorescência, que aumentou com o tempo, pois as promastigotas metabolizam o indicador, gerando fluorescência. É possível observar que altas concentrações de AB-DOC (acima de 173 nM) apresentaram diferença significativa com relação ao controle negativo ( $*p < 0,05$ ). Entre os tempos de 75 minutos a 105 minutos, houve um pico de fluorescência, que se normaliza após 120 e 180 minutos de incubação, apresentando o mesmo perfil do que o tempo de 60 minutos.

Como não foi observada mudança na coloração do fluoróforo, o tempo de incubação estendeu-se por até 12h, onde foi possível observar a metabolização do composto de azul (resazurina) para rosa (resorufina), com emissão de fluorescência detectável e reprodução do número de células viáveis.

Um ensaio foi feito para comparação dos comprimentos de onda com fluorescência detectável após 12 h de incubação (Figura 6).

**Figura 6. Padronização da leitura por fluorescência para avaliação da viabilidade celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pelo método da resazurina**



Promastigotas tratadas com AB-DOC em concentrações crescentes. Controle de promastigotas em meio 199. Comprimentos de onda de fluorescência, onde (A) e (C) 530 nm de excitação 590 nm de emissão; (B) e (D) 560 nm excitação 590 nm emissão. (A) e (B) One-way ANOVA e pós-teste de Tukey,  $*p < 0,05$  comparado com o controle negativo. (C) e (D) Regressão não-linear com interpolação de 50%,  $CI_{50}$  indicada pela linha tracejada.

Observou-se que a partir da concentração de 173 nM existe a diferença significativa com relação ao controle negativo ( $*p < 0,05$ ), assim como observado na padronização dos tempos de leitura. A  $CI_{50}$  pôde ser calculada, apresentando valor semelhante de 186 nM para 530/590 nm; e 180 nM para 560/590 nm.

Optou-se então por fazer os ensaios de viabilidade com tempos de 12 h de incubação com resazurina e comprimento de onda de 530/590 nm. Os resultados dos bioensaios serão apresentados nestas condições.

### 5.3. Caracterização de formas farmacêuticas contendo AB-DOC

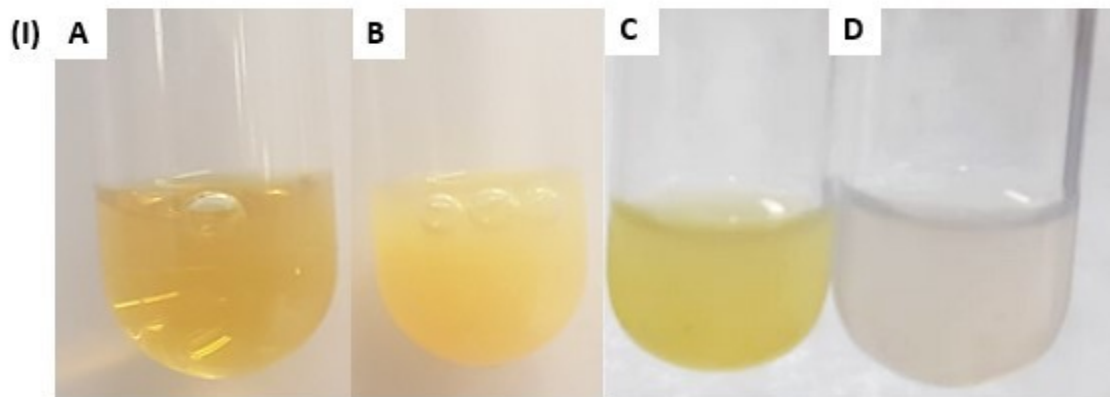


### **5.3.1. Características físico-químicas**

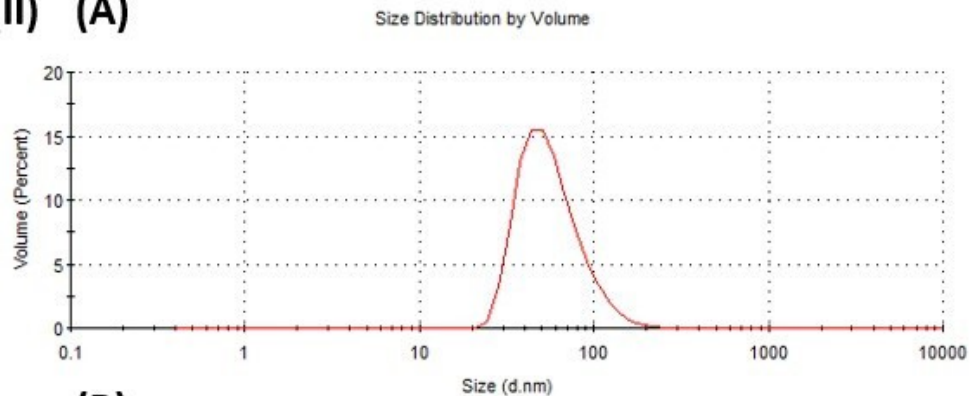
Após o preparo, as formulações foram analisadas pelo aspecto macroscópico. A formulação AB-DOC apresentou-se límpida, de cor amarelo palha (Figura 7-IA). Após o aquecimento a 70 °C (PETIT et al., 1997) a formação de superagregados aumentou a turbidez da solução, deixando-a com aspecto opaco (Figura 7- IB).

O aspecto macroscópico de AB-NLS apresentou-se como uma formulação opaca, de cor amarelo claro, e baixa fluidez (Figura 7-IC). Da mesma forma, o aspecto de C-NLS apresentou-se como uma solução opaca, de cor branca, e turbidez semelhante à da formulação incorporada com AB-DOC (Figura 7-ID). Esta turbidez dá-se principalmente por se tratar de um veículo de composição lipídica, visto que a utilização de misturas de lipídeos contribui para a diminuição da viscosidade (SOLDATI et al., 2018).

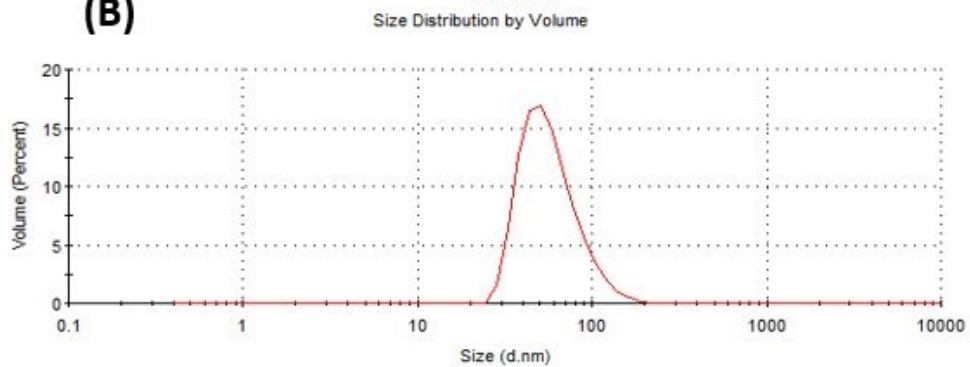
**Figura 7. Aspecto macroscópico das formulações contendo AB-DOC e distribuição de partículas de acordo com o tamanho**



**(II) (A)**



**(B)**



I) Características macroscópicas das formulações de AB. (A) AB-DOC; (B)- AB-HT; (C) AB-NLS; (D) C-NLS.  
 II) Distribuição de tamanho de partícula de acordo com o volume. (A) AB-NLS; (B) C-NLS. Fonte: a autora.

A distribuição do tamanho de partículas (figura 7-II) apresenta um perfil de distribuição homogênea, com uma população de aproximadamente 100 nm de tamanho, o que corrobora o aspecto macroscópico encontrado.

Previamente à análise de DLS, as amostras AB-NLS e C-NLS foram diluídas em água ultrapura para evitar interferências nos parâmetros de tamanho de partícula (TP) e índice de polidispersão (PdI).

Os resultados obtidos demonstram um tamanho de partícula pequeno (aproximadamente 100 nm) e de distribuição homogênea. De acordo com a tabela 2, a C-NLS apresentou TP de 95,63 nm e PDI de 0,103. A incorporação de AB-DOC a esse sistema não alterou suas características de dispersão, mas contribuiu para a diminuição do TP, visto que AB-NLS apresentou TP de  $77,7 \pm 4,09$  nm e PDI de  $0,192 \pm 0,04$ .

Estes dados indicam que o sistema foi produzido pelo método adequado, tendo em vista a distribuição uniforme de tamanho de partícula e índice de polidispersão, e que se mantém reproduzível mesmo quando incorporado a AB-DOC.

**Tabela 2. Tamanho médio de Partículas, PDI e Potencial Zeta de nanopartículas lipídicas sólidas**

<b>Formulação</b>	<b>Dias</b>	<b>Tamanho Médio de Partículas (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
<b>Nanopartículas Lipídicas sólidas Branca (C-NLS)</b>	1	95,63	0,103	-31,7
	30	115,9	0,376	-18,5
	60	113,5	0,323	-18,5
	90	124,4	0,468	-18,9
<b>Nanopartículas Lipídicas Sólidas associadas à Anfotericina B (AB-NLS)</b>	1	$77,7 \pm 4,09505$	$0,192 \pm 0,049427$	$-39,2 \pm 1,819341$
	30	$85,7 \pm 10,24133$	$0,323 \pm 0,03245$	$-27,4 \pm 4,582939$
	60	$84,54 \pm 2,360028$	$0,259 \pm 0,058184$	$-23,7 \pm 1,967232$
	90	$85,77 \pm 10,7476$	$0,334 \pm 0,024556$	$-26,1 \pm 0,916515$

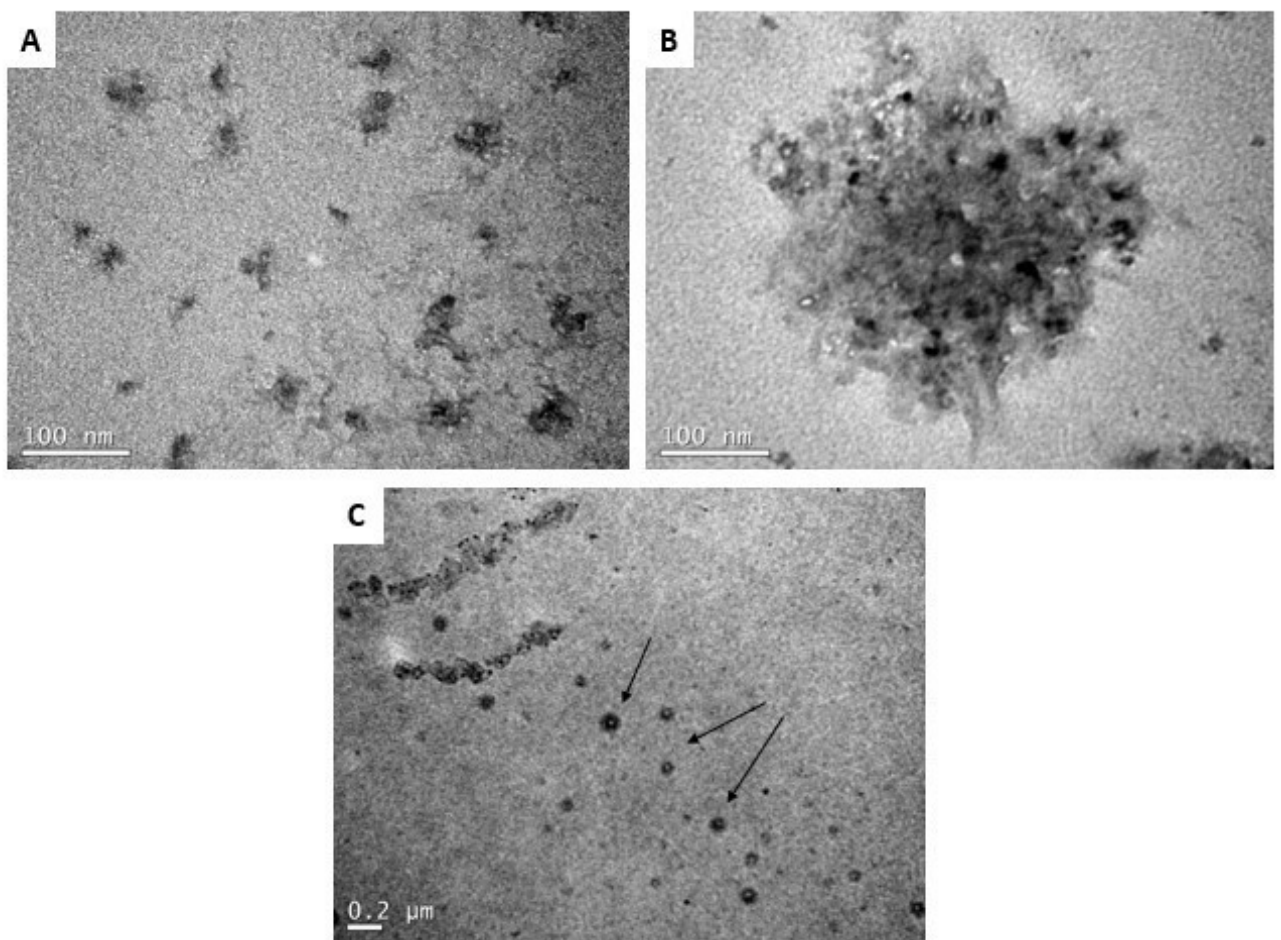
### 5.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A morfologia das formas farmacêuticas de AB-DOC foi observada em microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 8).

Na figura 8-A observam-se micelas de AB-DOC, compatível com a mistura coloidal da formulação. Após o aquecimento (figura 8-B), houve a formação de estruturas pleomórficas e de superagregados, com diâmetro médio entre 150-200 nm.

Já a figura 8-C apresenta a morfologia de AB-NLS, com uma população relativamente homogênea e de tamanho esférico, e tamanho de partículas de aproximadamente 100 nm, resultado que corrobora com a medida por DLS.

**Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de formulações farmacêuticas de AB-DOC**



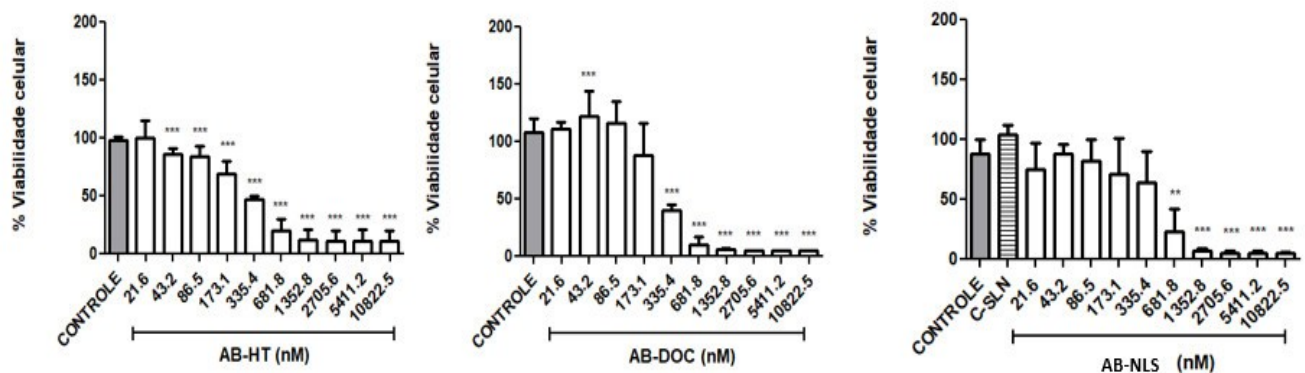
(A) AB-DOC; (B) AB-HT; (C) AB-NLS, indicadas pelas setas. Aumento de 100.000 vezes. Fonte: a autora.

#### **5.4. Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis***

As promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase logarítmica foram adicionadas na concentração de  $3 \times 10^6$  promastigotas/mL em placa de 96 poços, conforme descrito anteriormente. AB-DOC, AB-HT e AB-NLS foram testadas nas concentrações de 21; 43; 86;

173; 335; 682; 1353; 2705; 5411 e 10822 nM. A Figura 9 demonstra a viabilidade celular após tratamento de 24 h. Os valores são considerados significativos em relação ao controle nas concentrações acima de 43,2 nM para AB-HT, acima de 335,4 nM para AB-DOC e a partir de 681,8 nM para AB-NLS.

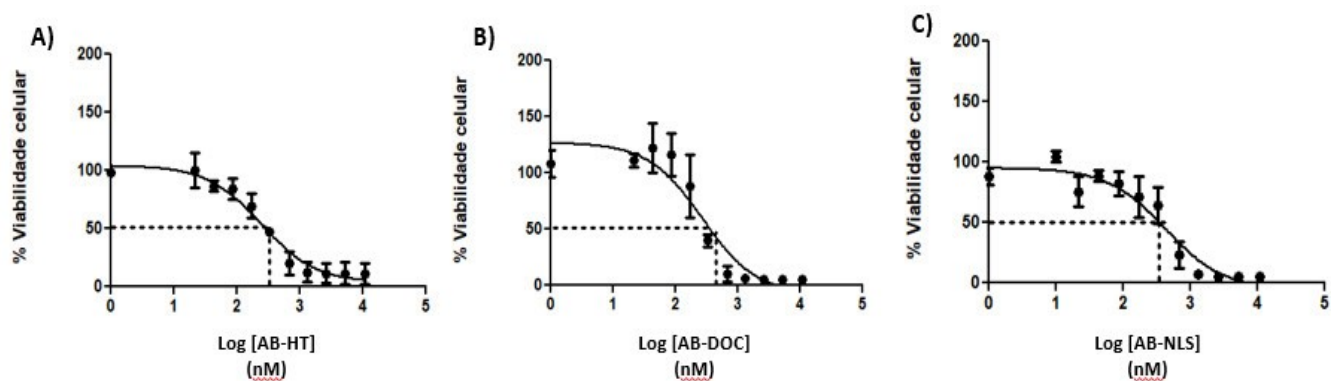
**Figura 9. Atividade leishmanicida das formulações de AB frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24 h de tratamento**



(A) AB-HT; (B) AB-DOC; (C) AB-NLS. A diferença estatística foi avaliada pelo software MedCalc, pós-teste de Kruskal-Wallis (\* $p < 0,05$ ). Ensaio em três triplicatas. Fonte: a autora.

Para 24 h de tratamento, os valores de  $CI_{50}$  apresentados foram de 367 nM para AB-DOC, 292 nM para AB-HT, e 353 nM para AB-NLS (Figura 10).

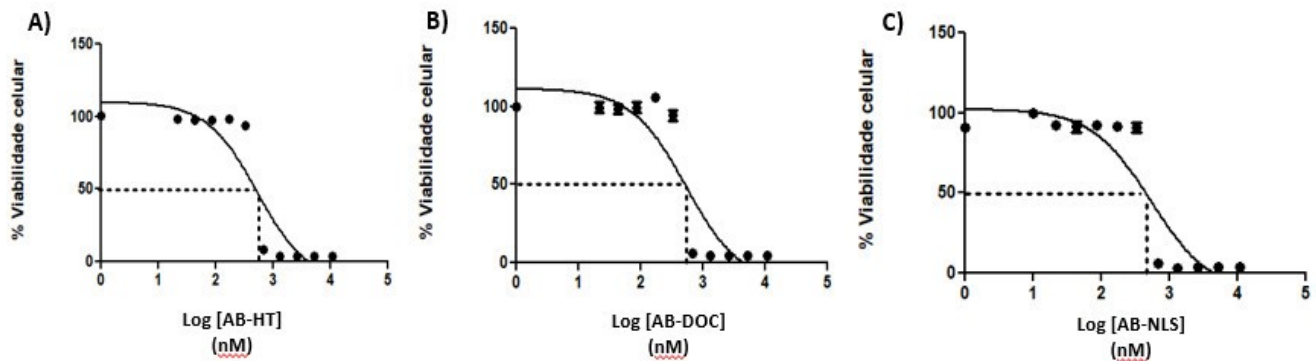
**Figura 10. Determinação da  $CI_{50}$  das formulações de AB frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24 h de tratamento**



Após 24 h de tratamento e 12 h de incubação com resazurina. Leitura de fluorescência em 530/590 nm. (A) AB-HT; (B) AB-DOC; e (C) AB-NLS. Regressão não linear com interpolação de 50%,  $CI_{50}$  indicada pela linha tracejada. Ensaio em três triplicatas. Fonte: a autora.

Para 48h de tratamento foi observada morte celular, com valores de  $CI_{50}$  para AB-HT, AB-DOC e AB-NLS de 504 nM, 526 nM e 458 nM, respectivamente (Figura 11).

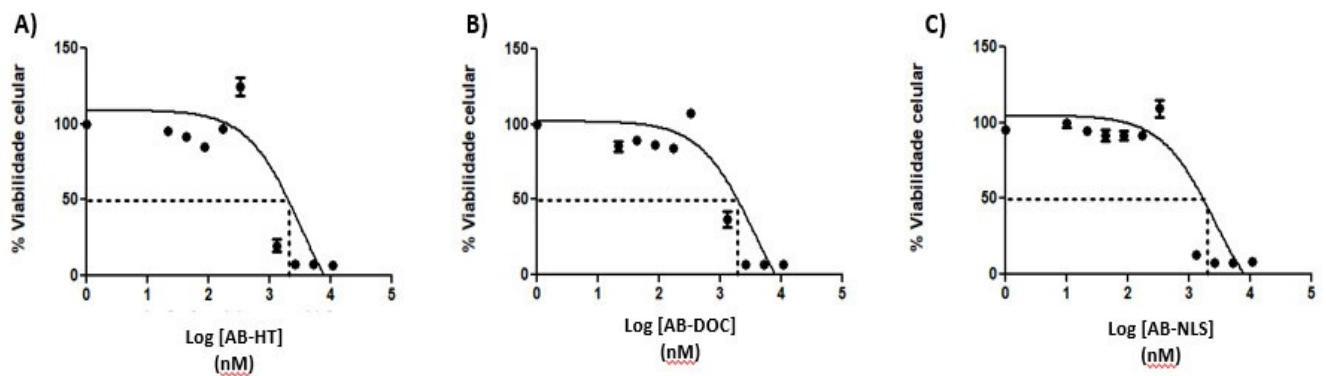
**Figura 11. Determinação da  $CI_{50}$  das formulações de AB frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 48 h de tratamento**



Após 48 h de tratamento e 12 h de incubação com resazurina. Leitura de fluorescência em 530/590 nm. (A) AB-HT; (B) AB-DOC; e (C) AB-NLS. Regressão não linear com interpolação de 50%,  $CI_{50}$  indicada pela linha tracejada. Fonte: a autora.

Para 72h de tratamento foi observada morte celular, com valores de  $CI_{50}$  para AB-HT, AB-DOC e AB-NLS de 2051 nM, 1955 nM e 1719 nM, respectivamente (Figura 12).

**Figura 12. Determinação da  $CI_{50}$  das formulações de AB frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 72h de tratamento**



Após 72 h de tratamento e 12 h de incubação com resazurina. Leitura de fluorescência em 530/590 nm. (A) AB-HT; (B) AB-DOC; e (C) AB-NLS. Regressão não linear com interpolação de 50%,  $CI_{50}$  indicada pela linha tracejada. Fonte: a autora.

A seguir, a Tabela 3 apresenta os valores de  $CI_{50}$  encontrados nos diferentes tempos de tratamento frente a promastigotas.

**Tabela 3. Valores de CI<sub>50</sub> frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* das formulações de AB-DOC**

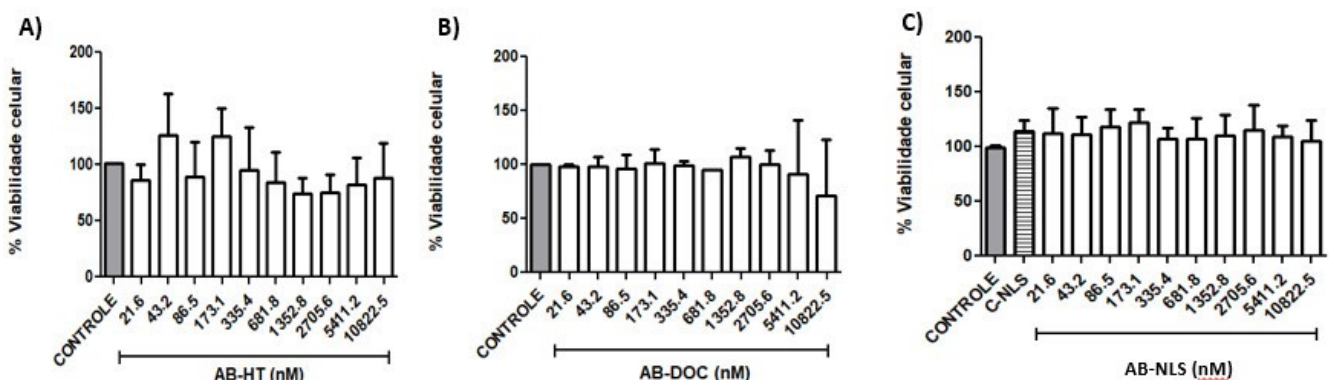
TRATAMENTO	CI <sub>50</sub> (nM)		
	24 h	48 h	72 h
AB-DOC	367	526	1955
AB-HT	292	504	2051
AB-NLS	353	458	1719

CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória que mata 50% de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

### 5.5. Avaliação da citotoxicidade das formulações de Anfotericina B frente a células de macrófagos Raw 264.7

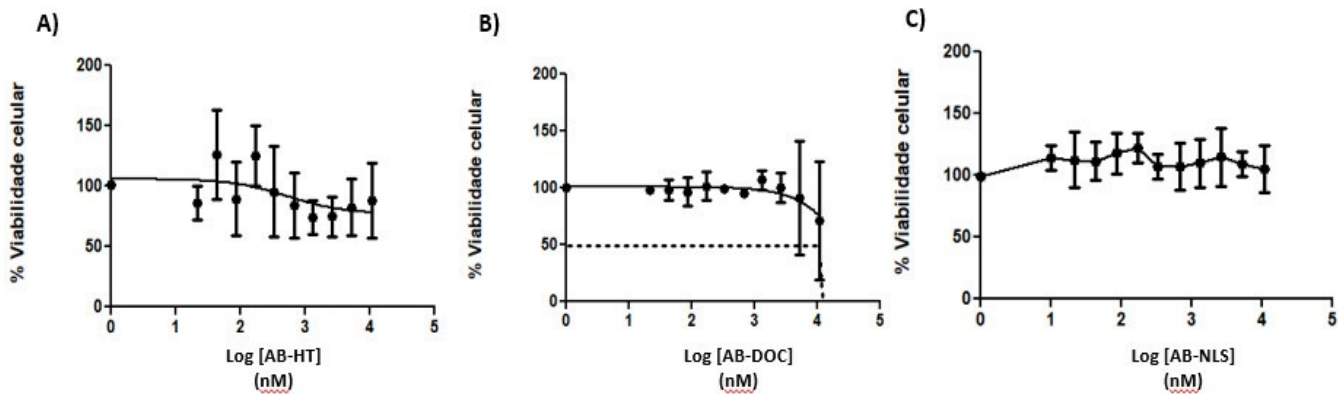
Para avaliar o efeito citotóxico das formulações AB-DOC, AB-HT e AB-NLS, concentrações crescentes foram testadas frente aos macrófagos da linhagem Raw 264.7 após 24 h de tratamento. As concentrações testadas não causaram a morte dos macrófagos (Figura 13). Os valores de CC<sub>50</sub> foram maiores do que o valor máximo utilizado para tratamento (10822 nM) (Figura 14).

**Figura 13. Citotoxicidade das formulações de AB frente a células de macrófagos Raw 264.7 após 24h de tratamento**



Macrófagos tratados com (A) AB-HT; (B) AB-DOC; (C) AB-NLS, viabilidade celular determinada por resazurina após 24 h de tratamento e 12 h de incubação. Nenhuma das formulações causou morte celular significativa em relação ao controle, avaliado pelo software MedCalc, pós-teste de Kruskal-Wallis. Fonte: a autora.

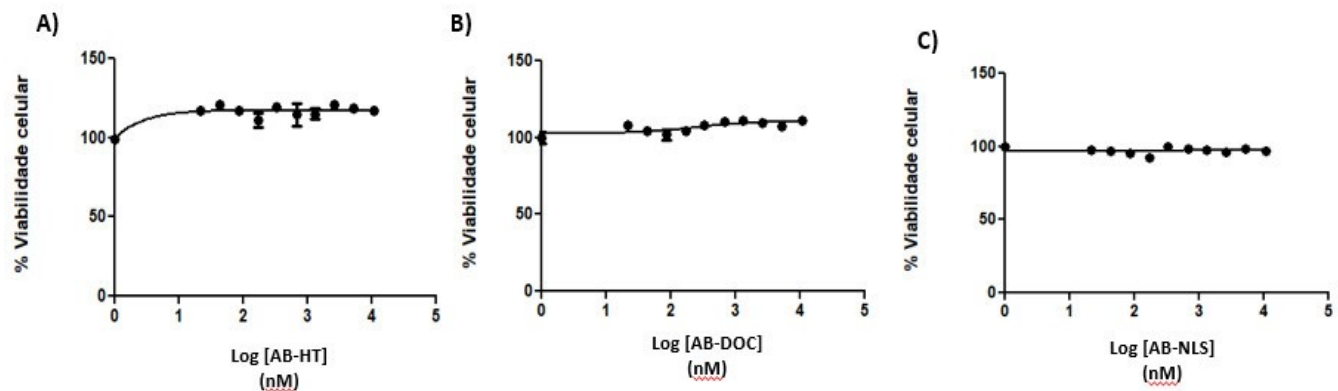
**Figura 14. Determinação da  $CC_{50}$  das formulações de AB frente a macrófagos após 24h de tratamento**



Macrófagos tratados com (A) AB-HT; (B) AB-DOC; e (C) AB-NLS, e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de resazurina após 24 h de tratamento e 12 h de incubação. Regressão não linear com interpolação de 50%. Fonte: a autora.

Como as nanopartículas podem ser um sistema de liberação prolongada, foram feitos testes em outros tempos de tratamento para presumir se haveria citotoxicidade em tempos de tratamento maiores do que 24 h, sendo testados os tempos de tratamento de 48 h e 72 h, respectivamente (Figuras 15 e 16).

**Figura 15. Determinação da  $CC_{50}$  das formulações de AB frente a macrófagos após 48h de tratamento**

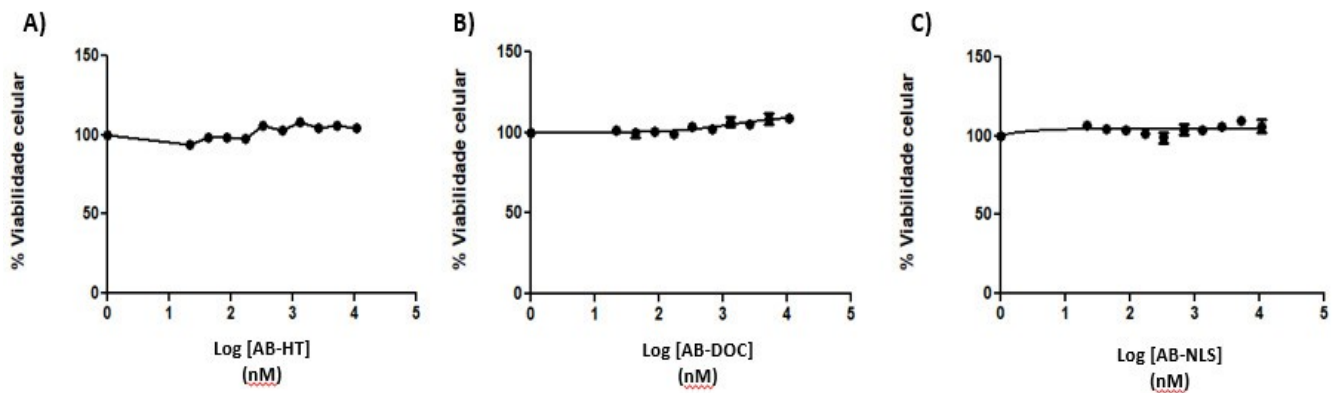


Macrófagos tratados com (A) AB-HT; (B) AB-DOC; e (C) AB-NLS, e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de resazurina após 48 h de tratamento e 12 h de incubação. Regressão não linear com interpolação de 50%. Fonte: a autora.

Para 48 h de tratamento, assim como observado em 24 h de tratamento, os valores de  $CC_{50}$  foram maiores do que 10822 nM, ou seja, não se observou citotoxicidade dentro dos valores de tratamento utilizados.



**Figura 16. Determinação da CC<sub>50</sub> das formulações de AB frente a macrófagos após 72 h de tratamento**



Macrófagos tratados com (A) AB-HT; (B) AB-DOC; e (C) AB-NLS, e a viabilidade celular foi determinada por ensaio de resazurina após 72 h de tratamento e 12 h de incubação. Regressão não linear com interpolação de 50%. Fonte: a autora.

Para 72 h de tratamento, assim como observado anteriormente, os valores de CC<sub>50</sub> foram maiores do que 10822 nM, ou seja, não se observou citotoxicidade dentro dos valores de tratamento utilizados.

Após ter feito a análise dos diferentes tempos de tratamento, foi possível mensurar os valores de índice de seletividade para cada uma das formas farmacêuticas de AB-DOC, valores indicados na Tabela 4. O índice de seletividade foi calculado pela razão de CC<sub>50</sub> observado frente a macrófagos, pela CI<sub>50</sub> observada frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

**Tabela 4. Valores de CC<sub>50</sub>, CI<sub>50</sub> e IS das formas farmacêuticas de AB-DOC**

		RAW 264.7 CC <sub>50</sub>	PROMASTIGOTA CI <sub>50</sub>	IS
		nM		
AB-DOC	24 h	>10822	367	29
	48 h	>10822	526	20
	72 h	>10822	1955	5
AB-HT	24 h	>10822	292	37
	48 h	>10822	504	21

	72 h	>10822	2051	5
AB-NLS	24 h	>10822	353	30
	48 h	>10822	458	23
	72 h	>10822	1719	6

CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica que mata 50% de macrófagos Raw 264.7; CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória que mata 50% de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*; IS: Índice de Seletividade, calculado pela razão CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.

### 5.7. Quantificação de TNF- $\alpha$

Para o teste de quantificação de TNF- $\alpha$  por ELISA, utilizou-se o sobrenadante de macrófagos que ficaram em contato com as formulações AB-DOC, AB-HT, AB-NLS e C-NLS, na concentração de 10822 nM durante 48 h.

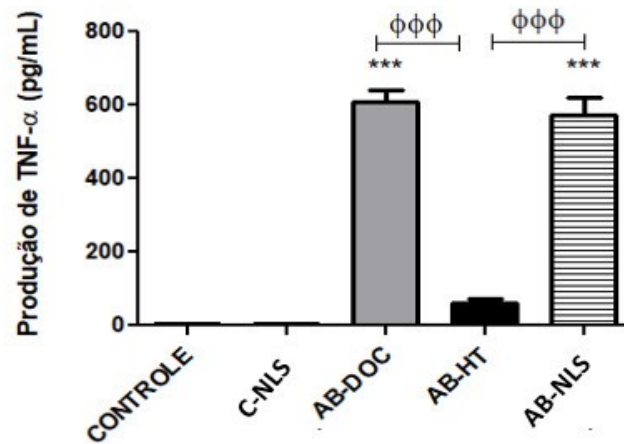
Primeiramente, a equação da reta foi determinada pela curva de calibração, conforme apresentado na figura 18. Um valor de R<sup>2</sup> de 0,92 foi encontrado. Com essa equação, as concentrações das amostras foram calculadas, em pg/mL.

#### Equação 2. Equação da reta referente a curva de calibração do teste de ELISA

$$y = 0,0021x + 0,1652$$

Para os controles, o valor de produção de TNF- $\alpha$  foi indetectável, ou seja, ficaram abaixo do limite de sensibilidade do teste (4 pg/mL). Para AB-DOC, o valor encontrado foi de  $610 \pm 33,6$  pg/mL; para AB-HT, foi de  $67,5 \pm 9,5$  pg/mL; e para AB-NLS, a concentração foi de  $602 \pm 48$  pg/mL. A Figura 17 apresenta a relação entre os grupos de tratamento.

**Figura 17. Produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos Raw 264.7 após tratamento com formulações de AB**



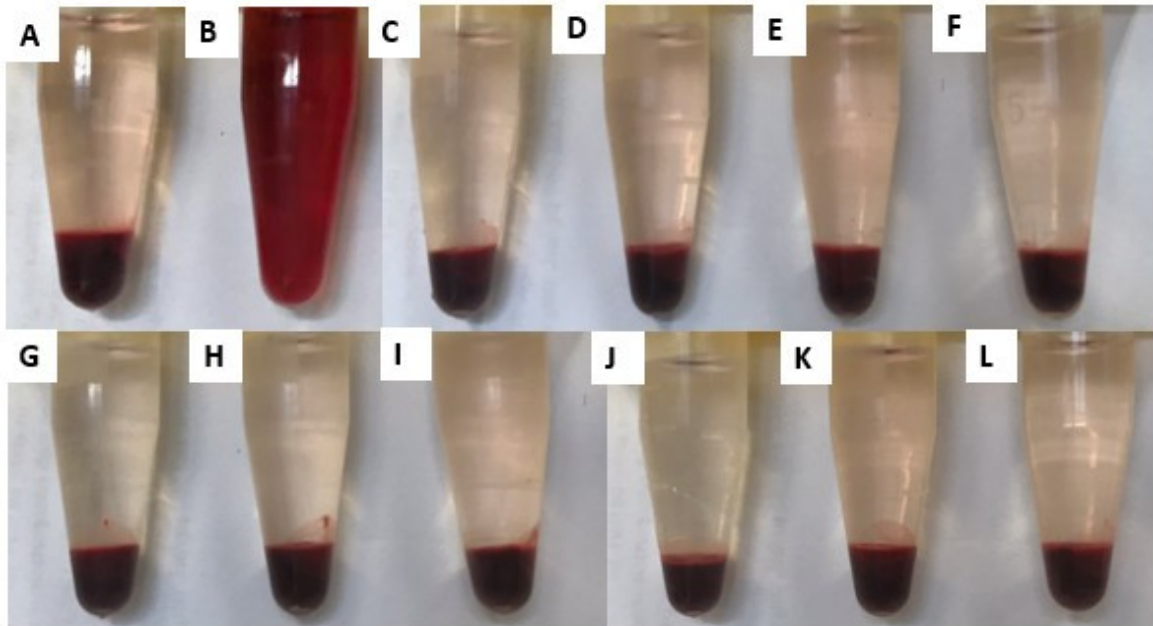
Macrófagos tratados com AB-DOC, AB-HT e AB-NLS na concentração de 10822 nM durante 48 h de incubação. Comparação entre grupos pela análise de One-way ANOVA e pós-teste de Tukey onde \* $p < 0,05$  comparado com o controle negativo e C-NLS; e ø  $p < 0,05$  comparado com AB-HT.

### 5.8. Teste de Hemólise

O teste de hemólise *in vitro* fornece dados simples e confiáveis sobre o potencial terapêutico para a busca por promissores medicamentos injetáveis (WANG et al., 2009).

As concentrações-teste utilizadas foram os valores de  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  encontradas em ensaio leishmanicida após o tratamento durante 24 h com os compostos AB-DOC, AB-HT, e o dobro do valor (aproximadamente) de  $CI_{50}$  para AB-NLS, C-NLS e Ambisome®. Uma solução clara com *pellet* de eritrócitos foi observada no controle negativo, enquanto a hemólise completa dos eritrócitos (solução avermelhada) foi observada no controle positivo (Figura 18).

**Figura 18. Efeito sobre eritrócitos de sangue periférico das formulações de AB**



Imagens representativas dos microtubos após centrifugação, antes de ser feita a leitura das absorvâncias, onde (A) Controle negativo; (B) Controle positivo; (C) AB-DOC  $CI_{50}$ ; (D) AB-DOC  $CI_{90}$ ; (E) AB-HT  $CI_{50}$ ; (F) AB-HT  $CI_{90}$ ; (G) C-NLS  $CI_{50}$ ; (H) AB-NLS  $CI_{50}$ ; (I) AMBISOME  $CI_{50}$ ; (J) C-NLS  $CI_{90}$ ; (K) AB-NLS  $CI_{90}$ ; (L) AMBISOME  $CI_{90}$ . Fonte: a autora.

O ensaio foi feito em triplicata, e os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (Tabela 5). Considerou-se a lise do controle positivo como sendo 100%. Para todos os valores de concentrações-teste, a taxa de hemólise observada é menor que 3%, incluindo o controle negativo que apresentou taxa de hemólise de  $2,15 \pm 0,002$ .

**Tabela 5. Concentrações-teste das formulações de AB**

$CI_{50}$			$CI_{90}$		
FORMA	CONCENTRAÇÃO (nM)	TAXA DE HEMÓLISE (%)	FORMA	CONCENTRAÇÃO (nM)	TAXA DE HEMÓLISE (%)
C-NLS	654	$1,77 \pm 0,001$	C-NLS	2413	$2,00 \pm 0,0005$
AB-NLS	654	$1,95 \pm 0,001$	AB-NLS	2413	$2,37 \pm 0,002$
AMBISOME	654	$1,90 \pm 0,002$	AMBISOME	2413	$2,15 \pm 0,003$
AB-DOC	364	$1,98 \pm 0,001$	AB-DOC	1750	$2,71 \pm 0,002$
AB-HT	269	$2,15 \pm 0,001$	AB-HT	3548	$2,42 \pm 0,001$

## 6. DISCUSSÃO

Entre as espécies de *Leishmania* que causam LTA, *L. (L.) amazonensis* é um dos agentes etiológicos mais prevalentes no Brasil, responsável pelos casos graves da forma disseminada ou difusa (LCD), caracterizada por ulcerações secundárias resultantes de metástases e geralmente associadas a infecções secundárias por fungos ou bactérias (CARVALHO et al., 2019). Casos de LCD são pouco responsivos e refratários ao tratamento com antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2017; CHRISTENSEN et al., 2018; SILVEIRA, 2019).

A Anfotericina B (AB) é considerada o tratamento de segunda escolha para a LTA em áreas com prevalência de resistência, em casos de contra-indicações e intolerância aos antimoniais pentavalentes. Ao longo das últimas duas décadas, as formulações lipídicas de AB têm sido usadas clinicamente para o tratamento das leishmanioses a fim de combater a toxicidade. Extensos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de novas formulações de AB contendo polímeros, lipídeos ou agregados físicos para substituir a formulação lipossomal disponível aprovada pelo FDA (AmBisome®), que apresenta alto custo.

Neste estudo foi realizada a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de formas farmacêuticas de AB e incorporada em uma nanopartícula lipídica sólida (AB-NLS), utilizando como veículo uma manteiga vegetal, rica em lipídeos naturais. A vantagem de se utilizar uma manteiga natural e não sintética é a produção de nanopartículas biodegradáveis, segura para o uso em seres humanos e para o meio ambiente (SODDU et al., 2016; SOLDATI et al., 2018).

A formulação AB-HT utilizada no presente trabalho foi produzida de acordo com estudos prévios feitos por Petit (1997) e Van Etten (2000) e colaboradores, que obtiveram após o aquecimento de AB-DOC a agregação de monômeros, formando superagregados de AB, diminuindo assim a citotoxicidade, porém sem prejuízo da atividade antimicrobiana.

As formulações obtidas foram avaliadas individualmente de acordo com as características macro e microscópicas, como também físico-químicas. Macroscopicamente, as formulações de AB apresentaram a coloração amarela (Figura 7), variando o grau de turbidez entre elas. A turbidez de AB-NLS dá-se pelo fato de que a mistura de lipídeos diminui a viscosidade (SOLDATI et al., 2018), enquanto AB-HT apresentou-se como uma formulação opaca e turva, compatível com a formação de superagregados (VAN ETTEN et al., 1998).

Tal constatação pôde ser confirmada através de micrografias feitas por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 8). Observou-se que o sistema coloidal de AB-DOC possuía uma população heterogênea de agregados de DOC (Figura 8A), e que após o aquecimento a

70 °C por 20 minutos, houve a formação de superagregados com tamanho de partícula entre 150 nm-200 nm (Figura 8B). Já a AB-NLS apresentou tamanho esférico e uma população homogênea de nanopartículas, com tamanhos de aproximadamente 100 nm (Figura 8C).

Com relação às características físico-químicas das formulações, os parâmetros avaliados foram: potencial zeta (PZ), índice de polidispersão (PdI), e tamanho médio de partículas (TP) (Tabela 2), por método DLS e durante um período de até 90 dias. AB-NLS apresentou TP de  $77,7 \pm 4,09$  nm, compatível com o sistema nanoparticulado. Buchele (2017) observou que AB-DOC apresentava TP de  $82,16 \pm 9,93$  nm, e que após o aquecimento o tamanho aumentou para  $982 \pm 12,10$  nm, o que demonstra a formação de superagregados de AB-DOC.

O mecanismo de ação sugerido para AB lipossomal está relacionado ao pequeno tamanho dos lipossomas (<100 nm), que são captados de maneira seletiva pelos macrófagos, permitindo a distribuição do medicamento em diferentes órgãos, aumentando assim a eficácia do tratamento por ser alvo específico (ADLER-MOORE; GANGNEUX; PAPPAS, 2016; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Os macrófagos fagocitam estes corpos nanoparticulados, entregando o medicamento diretamente no vacúolo parasitóforo onde as formas amastigotas de *Leishmania* spp. residem (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; KUMARA et al., 2014; MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001). As características apresentadas pela formulação AB-NLS demonstram potencial aplicação para uso sistêmico, uma vez que houve a formação de nanopartículas de tamanho aproximado ao da formulação comercial AmBisome®.

O índice de polidispersão (PdI) fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Este pode variar de zero, quando todas as partículas presentes na suspensão apresentam o mesmo tamanho, até um, quando o diâmetro das partículas tem uma distribuição bastante heterogênea (LIU; WU, 2010). Nanopartículas lipídicas são consideradas homogêneas quando um valor de PdI é inferior ou igual a 0,30. Devido aos métodos de produção para NLS, valores mais elevados são aceitos, podendo chegar a 0,40 (BATTAGLIA; GALLARATE, 2012).

AB-NLS apresentou PdI de  $0,192 \pm 0,04$ , o que corrobora que as nanopartículas lipídicas possuem uma distribuição homogênea de sua população, previamente observado nas características microscópicas. Buchele (2017) apresentou para AB-DOC um valor de  $0,317 \pm 0,03$ , e para AB-HT,  $0,303 \pm 0,020$ .

Ao final de um período de 90 dias, AB-NLS não apresentou aumento de tamanho significativo ( $85,77 \pm 10,74$  nm), mas o PdI aumentou para  $0,334 \pm 0,02$ , o que indica que

este sistema manteve uma população homogênea, ou seja, uma possível degradação pelo tempo não interferiu na distribuição das nanopartículas.

AB-DOC e AB-HT apresentaram um TP de  $371 \pm 35,03$  nm e  $799,86 \pm 16,15$  nm, respectivamente. Observou-se que, do ponto de vista de homogeneidade da solução, AB-HT é mais estável do que AB-DOC. O PDI aumentou para  $0,958 \pm 0,036$  e  $0,383 \pm 0,043$ , respectivamente, ao final de 90 dias (BUCHELE, 2017). AB-DOC apresentou aumento de TP e PDI ao final de 90 dias, estocada a 4 °C e protegida da luz. Este dado está de acordo com estudos que indicam que AB-DOC possui um sistema coloidal, de mistura de monômeros e agregados solúveis e insolúveis, que podem agregar-se entre si (PETIT et al., 1997; TORRADO et al., 2008; ZIA et al., 2016).

AB-NLS apresentou PZ de  $-26,1 \pm 0,91$  mV ao final de 90 dias, mantida sob refrigeração a 4 °C e protegida da luz. Este resultado indica que as partículas podem estar perdendo o potencial de repulsão, mas insuficiente para o sistema perder a estabilidade.

Filippin e colaboradores (2008) demonstraram a estabilidade de AB-DOC incorporada em nanoemulsão contendo fosfolípidos de lecitina de soja. A formulação manteve-se estável durante um período de seis meses em temperaturas de estocagem de 4 °C e 25 °C. O TP variou de 140 a 160 nm na menor temperatura, demonstrando que tamanhos menores de partícula têm uma melhor estabilidade.

Jain e colaboradores (2014) desenvolveram uma nanopartícula lipídica sólida contendo quitosana e a incorporaram com AB-DOC. O estudo demonstrou um TP de  $158,9 \pm 7,1$  nm, o valor de PDI de  $0,13 \pm 0,03$ , e PZ positivo no valor de  $34,26 \pm 1,22$  mV. Após três meses de estocagem a 4 °C, a NLS manteve-se estável, com TP de  $157,5 \pm 2,1$  nm; PDI  $0,18 \pm 0,01$ ; e PZ  $35,46 \pm 0,83$  mV. Apesar de apresentar carga positiva devido à presença de surfactantes, a NLS apresentou dados de estabilidade e tamanho bastante parecidos com o que foi apresentado neste trabalho.

No presente estudo, a estabilidade de AB-NLS em tempo de estocagem de até 90 dias, com tamanho de partícula que não aumentou significativamente e estabilidade do potencial de repulsão entre as partículas, apresentou-se como um sistema estável e promissor para o uso terapêutico.

As formulações farmacêuticas foram então testadas quanto à atividade biológica frente a promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e a macrófagos Raw 264.7, através de bioensaios de resazurina. Na padronização quanto ao tempo de incubação e ao comprimento de onda utilizados nos ensaios, a fluorescência aumentou com o tempo de incubação, indicando que as promastigotas metabolizam a resazurina (Figura 5). Em altas concentrações de AB-DOC

(acima de 173 nM) foi possível observar que a viabilidade de promastigotas diminuiu, apresentando diferença significativa com relação ao controle negativo (\* $p < 0,05$ ). Entre os tempos de 75 minutos a 105 minutos, há um pico de fluorescência, que se normaliza após 120 e 180 minutos de incubação, apresentando o mesmo perfil do que o tempo de 60 minutos.

Já quando confrontados dois comprimentos de onda diferentes (Figura 6), o perfil de fluorescência é muito parecido entre os dois, onde observou-se que a partir da concentração de 173 nM houve diferença significativa com relação ao controle negativo (\* $p < 0,05$ ). O resultado de  $CI_{50}$  calculado foi muito próximo um do outro, apresentando valores de 186 nM e 180 nM para os comprimentos de onda de 530/590 nm e 560/590 nm, respectivamente. Após 12 h de incubação com resazurina foi possível observar mudança na coloração do fluoróforo, o qual foi reduzido a resorufina, um composto rosa. A partir dos dados observados, definiu-se o tempo de incubação de 12 h com resazurina, e as leituras de fluorescência de 530 nm de excitação e 590 nm de emissão para os ensaios de bioatividade com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Existem vários estudos de avaliação de viabilidade celular através do ensaio de resazurina frente a espécies do gênero *Trypanosoma* (RAZ et al., 1997) e *Leishmania* (CORRAL et al., 2013; E BASTOS et al., 2017; KULSHRESTHA et al., 2013; MIKUS; STEVERDING, 2000).

Os resultados da padronização de resazurina frente a *L. (L.) amazonensis* realizado no presente estudo foram semelhantes aos resultados obtidos por Mikus e Steverding (2000), que observaram que promastigotas de *L. major* reduzem a resazurina de maneira tempo-dependente. O tempo ideal de incubação foi de no máximo 72h. Passado este período, o ensaio foi comprometido devido à relação direta com a concentração celular. Tempos maiores levam à maior concentração celular final, e a resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis (CORRAL et al., 2013).

Kulshrestha e colaboradores (2013) demonstraram que a atividade leishmanicida de miltefosina frente a promastigotas de *L. donovani* apresentava valores mais robustos em tempos maiores de incubação. Corral e colaboradores (2013) reforçaram que o ensaio é eficiente para avaliar multiplicação de promastigotas de *Leishmania* spp. e inibição do crescimento celular relacionado a medicamentos leishmanicidas.

Os bioensaios foram feitos em diferentes tempos de tratamento (24 h, 48 h e 72 h). As formas farmacêuticas de AB-DOC, AB-HT e AB-NLS foram testadas a fim de calcular os valores de  $CI_{50}$  e de  $CC_{50}$ .



Quando confrontados com promastigotas, os valores de  $CI_{50}$  encontrados para AB-DOC após 24 h, 48 h e 72 h de tratamento foram 0,36  $\mu$ M, 0,52  $\mu$ M, e 1,95  $\mu$ M respectivamente. Para AB-HT, 0,30  $\mu$ M, 0,50  $\mu$ M, e 2,05  $\mu$ M, respectivamente. E para AB-NLS, 0,35  $\mu$ M, 0,46  $\mu$ M, e 1,72  $\mu$ M, respectivamente.

Nos ensaios de citotoxicidade não foi observada morte celular pelos compostos nas concentrações testadas (até 10,8  $\mu$ M), o que é um resultado promissor quando se busca a aplicação de um fármaco para tratamento de parasitos intracelulares, tendo em vista que a citotoxicidade é um dos maiores problemas quando se pensa em tratamento com AB-DOC.

Bastos e colaboradores (2017) testaram AB-DOC frente a promastigotas de *L. braziliensis* utilizando ensaio de resazurina, e encontraram um valor de  $CI_{50}$  de 0,84  $\mu$ M. Mikus e Steverding (2000) utilizaram o ensaio de resazurina para investigar a toxicidade celular de AB-DOC frente a promastigotas de *L. major*, e encontraram um valor de  $CI_{50}$  de 0,31  $\mu$ g/mL, bem próximo ao encontrado neste estudo (aproximadamente 0,34  $\mu$ g/mL).

Mendonça e colaboradores (2016) avaliaram a atividade biológica de um sistema de hidrogel Poloxamer P407® associado a AB-DOC frente a promastigotas de *L. (L) amazonensis*, durante 48 h de tratamento. O valor de  $CI_{50}$  do sistema micelar foi de  $1,83 \pm 0,4$   $\mu$ M, e para AB-DOC foi de  $1,2 \pm 0,3$   $\mu$ M, comparativamente bem acima dos valores para AB-DOC e AB-NLS encontrados nesse estudo. Já quando comparado com macrófagos, a  $CC_{50}$  do sistema foi de  $119,5 \pm 9,6$   $\mu$ M, enquanto AB-DOC apresentou uma  $CC_{50}$  de  $9,5 \pm 0,4$   $\mu$ M. O valor de índice de seletividade para o sistema foi muito maior (65,3) quando comparado com o de AB-DOC (7,9), o que indica que AB-DOC incorporada a um sistema micelar tem atividade biológica maior.

O índice de seletividade (IS) apresentado pela AB-NLS é muito próximo ao apresentado por AB-HT, o que infere que o sistema nanocarreador deste trabalho tem grande seletividade por promastigotas. Em 48 h de tratamento, o IS de AB-NLS foi o mais alto, sugerindo um mecanismo de sistema de entrega controlado (SOLDATI et al., 2018). Após 72 h de incubação, esta seletividade decaiu para todas as formulações, indicando uma possível degradação de AB devido à mudança de temperatura (de 4 °C de estocagem, para 26 °C de incubação na estufa).

Para poder ser usado *in vivo*, candidatos a medicamentos não podem desencadear processo hemolítico (WANG et al., 2009). Este efeito é característico de moléculas anfipáticas, como é o caso de AB, uma vez que estas moléculas interagem com a superfície de membrana de eritrócitos (DA GAMA BITENCOURT et al., 2016).

As formulações usadas neste estudo, incluindo AmBisome®, não apresentaram taxa de hemólise nas concentrações testadas. A AB lipossomal foi utilizada neste teste, com a finalidade de comparação entre as formas comercial e a desenvolvida neste estudo.

Espada e colaboradores (2008) demonstraram que em baixas concentrações (até 10 µg/mL), não houve efeito hemolítico de AB-DOC, AB-HT e AmBisome®, apresentando taxas de hemólise menores que 1%. Este valor aumentou com o aumento da concentração, e concentrações 10 vezes maiores apresentaram taxa de hemólise próximo a 10%. Mesmo com valores altos, AmBisome® apresentou o menor percentual hemolítico, 0,06% para concentração 100 µg/mL.

Outros estudos demonstraram o potencial hemolítico de formulações contendo AB-DOC. Darole (2008) desenvolveu uma microemulsão a base de lecitina de soja carregada com AB-DOC, que apresentou uma diminuição do efeito hemolítico em comparação com AB-DOC comercial.

Singh e colaboradores (2017) desenvolveram nanomicelas cobertas com quitosana e incorporadas com AB-DOC. Comparou-se a formulação comercial de AB lipossomal com as nanomicelas e pôde-se observar efeito hemolítico similar. Nas condições avaliadas, valores de até 10 µg/mL não induziam hemólise, com taxas inferiores a 5%.

O tratamento com AB-DOC pode apresentar efeito hemolítico, resultando em anemia e outras desordens vasculares nos pacientes. Observou-se que AB-DOC estimula a morte celular de eritrócitos (MAHMUD et al., 2009), mas tal efeito pode ser contornado com o desenvolvimento de medicamentos nanoencapsulados, cuja liberação prolongada reduz o efeito hemolítico (SINGH et al., 2017). A AB-NLS desenvolvida neste estudo não apresentou hemólise, o que indica que devido à liberação prolongada de AB-DOC, trata-se de um potencial candidato para uso sistêmico.

*Leishmania* spp. por atuarem como parasitos intracelulares obrigatórios em macrófagos, os principais alvos de pesquisa para o tratamento desta patologia são substâncias que possam estimular as células hospedeiras para a produção de mediadores que culminariam em uma atividade leishmanicida, os quais podem exercer uma variedade de respostas biológicas como a indução de TNF- $\alpha$  por macrófagos.

Este estudo demonstrou a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, após 48 h de tratamento com a maior concentração testada (Figura 17). Observou-se que AB-DOC e AB-NLS induziram esta produção, quando comparados com AB-HT.

Pacientes com LCD possuem menor número de células NK circulantes, resultando em menor capacidade de produção de citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que estão associadas à resposta

imune do tipo CD4<sup>+</sup>/Th1, responsável pela proteção contra patógenos intracelulares pela ativação de células fagocíticas (ANTONELLI et al., 2005; CHRISTENSEN et al., 2018; FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016).

Singh e colaboradores (2017) também investigaram o potencial de produção de citocinas, como o TNF-  $\alpha$ . O sistema nanoencapsulado levou os macrófagos à produção de mais de 400 pg/mL, indicando a possibilidade de ativação do tipo de resposta Th1, com aumento de citocinas pró-inflamatórias.

## 7. CONCLUSÃO

Como conclusão, mostramos que a formulação de nanopartículas lipídicas sólidas associadas à AB-DOC possui um bom tamanho de partícula para ser utilizado na nanoterapia, próximo ao de AB lipossomal. A AB-NLS manteve-se estável estocada a 4 °C e protegida da luz, apresentou excelente IS e potencial leishmanicida próximo ao relatado para outras formulações, com valores muito próximos ao indicado por AB-DOC e AB-HT. Não foi citotóxica frente a macrófagos, mesmo em altas concentrações, como também observado frente aos eritrócitos humanos. Além disso, a AB-NLS induziu a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, tratando-se de um promissor candidato a apresentar atividade frente a amastigotas intracelulares, mas sem comprometer a integridade da célula humana. Diante dos resultados, apresenta-se a AB-NLS como uma nova formulação nanoparticulada, promissora para futuros estudos contra formas amastigotas intracelulares e *in vivo*.

## **8. PERSPECTIVAS**

- Avaliação dos compostos contendo AB-DOC frente a amastigotas intracelulares;
- Determinação de teor e eficiência de encapsulação de AB-DOC em nanopartícula lipídica sólida;
- Avaliação da atividade biológica de AB-NLS frente a células renais;
- Avaliação da utilização de AB-NLS como formulação tópica.

## 9. REFERÊNCIAS

- ADLER-MOORE, Jill P.; GANGNEUX, Jean Pierre; PAPPAS, Peter G. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. **Medical Mycology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 223–231, 2016.
- AKBARI, Maryam; ORYAN, Ahmad; HATAM, Gholamreza. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 172, n. January, p. 86–90, 2017.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- AKHOUNDI, Mohammad et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 57, p. 1–29, 2017.
- ALEXANDER, James; RUSSELL, David G. The Interaction of *Leishmania* Species with Macrophages. In: BAKER, J. R.; MULLER, R. (Eds.). *Advances in Parasitology*[s.l.] : Academic Press, 1992. v. 31p. 175–254.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012.
- AMARAL, Alex Evangelista Do. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPLEXOS POLISSACARÍDEOS- OXOVANÁDIO (IV/V) SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS E *Leishmania in vitro***. 2011. Universidade Federal do Paraná, [s. l.], 2011.
- ANTONELLI, Lis R. V. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.
- ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária. Secretaria Executiva. **Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED): PREÇOS MÁXIMOS DE MEDICAMENTOS POR PRINCÍPIO ATIVO**. 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/listas-de-precos>>. Acesso em: 16 maio 2019.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, United States, v. 44, n. 5, p. 536–546, 1991.
- BATTAGLIA, Luigi; GALLARATE, Marina. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, England, v. 9, n. 5, p. 497–508, 2012.
- BEHESHTI, Nasibeh et al. Efficacy of biogenic selenium nanoparticles against *Leishmania major*: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 203–207, 2013.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral por**

**unidade federativa.** 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. (Org.). **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar.** Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 191 p. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf) >. Acesso em: 18 abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec)**, [s. l.], v. 365, p. 34, 2018. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio\\_Miltefosina\\_LeishmanioseTegumentar.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf) >. Acesso em: 12 maio 2019

BUCHELE, Maria Luiza Carneiro. **SISTEMA DE GELEIFICAÇÃO *in situ* TERMORREVERSÍVEL DE SUPERAGREGADOS DE ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO DA CERATITE AMEBIANA.** 2017. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

BUENO, Greyce Christine Lisboa et al. Visceral leishmaniasis mimicking systemic lupus erythematosus. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 52, n. 0, p. 0–1, 2019.

CAMPOS, Marliane Batista et al. Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1–22, 2018.

CANNELLA, Anthony P. et al. Short report: A cluster of cutaneous leishmaniasis associated with human smuggling. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 847–850, 2011.

CAPEWELL, Paul et al. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. **Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 17716, n. 5, p. 1–17, 2016.

CARVALHO, Silvia 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 & international health : TM & IH**, England, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (Estados Unidos). **Leishmania spp.** 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> >. Acesso em: 23 maio 2019

CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHRISTENSEN, Stephen M. et al. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1–23, 2018.

CORRAL, María Jesús et al. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 111–116, 2013.

CORWARE, Karina et al. Accelerated healing of cutaneous leishmaniasis in non-healing BALB/c mice using water soluble amphotericin B-polymethacrylic acid. **Biomaterials**, [s. l.], v. 32, n. 31, p. 8029–8039, 2011.

CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, United States, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

DA GAMA BITENCOURT, José Jardes et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: Improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythrocytes and its cytotoxic effect on macrophages. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 217, p. 20–31, 2016.

DAROLE, Pradnya S.; HEGDE, Darshana D.; NAIR, Hema A. Formulation and Evaluation of Microemulsion Based Delivery System for Amphotericin B. **The American Association of Pharmaceutical Scientists**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 122–128, 2008.

DE CARVALHO, Ricardo Fontoura et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA – DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL / 6 mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 135, n. 2, p. 217–222, 2013.

DE LIMA, Edson Borges et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 111–123, 2007.

DE MARIA, Andrea et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16<sup>+</sup> NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 108, n. 2, p. 728–732, 2011.

DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: A case report and review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 165–170, 2006.

E BASTOS, Matheus Silva et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 155–159, 2017.

ESPADA, Raquel et al. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 361, n. 1–2, p. 64–69, 2008.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, Edith A. et al. Down-Regulation of TLR and JAK/STAT Pathway Genes Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A Gene Expression Analysis in NK Cells from Patients Infected with *Leishmania mexicana*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–17, 2016.



FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** scielo , , 2006

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes; MARANHÃO, Raul Cavalcante. Amphotericin B associated with triglyceride-rich nanoemulsion: Stability studies and *in vitro* antifungal activity. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 591–594, 2008.

GANIS, P. et al. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. **Journal of the American Chemical Society**, United States, v. 93, n. 18, p. 4560–4564, 1971.

GERSHKOVICH, Pavel et al. Pharmacokinetics and biodistribution of amphotericin B in rats following oral administration in a novel lipid-based formulation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 101–108, 2009.

GETTI, G. T.; CHEKE, R. A.; HUMBER, D. P. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? **Parasitology**, [s. l.], v. 135, n. 12, p. 1391, 2008.

GRISARD, EC et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 89–93, 2000.

GROTT, Suelen Cristina et al. EPIDEMIOLOGY AND DISTRIBUTION OF PHLEBOTOMINE SAND FLIES (DIPTERA: PHLEBOTOMINAE) IN BLUMENAU, SC, BRAZIL, AN AREA OF TRANSMISSION OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. **Revista de Patologia Tropical**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 483–491, 2014.

GUEIRARD, Pascale et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. [s. l.], v. 10, n. July 2007, p. 100–111, 2008.

GUPTA, Gaurav; OGHUMU, Steve; SATOSKAR, Abhay R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. In: SARIASLANI, Sima; GADD, Geoffrey M. (Eds.). *Advances in Applied Microbiology*[s.l.] : Academic Press, 2013. v. 82p. 155–184.

HAMILL, Richard J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, [s. l.], v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013.

HARTSEL, Scott C. et al. Heat-induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF- $\alpha$ . **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 124–133, 2001.

HERWALDT, Barbara L. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HEURTAULT, Beatrice et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, Netherlands, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 2003.

JACKSON, Andrew P. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**, [s. l.],

v. 142, n. 2015, p. S40–S56, 2015.

JAIN, Vineet et al. Chitosan-Assisted Immunotherapy for Intervention of Experimental Leishmaniasis via Amphotericin B-Loaded Solid Lipid Nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 174, n. 4, p. 1309–1330, 2014.

JUNG, Suk Hyun et al. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their *in vitro* and *in vivo* characteristics. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 37, n. 3–4, p. 313–320, 2009.

KEDZIERSKI, Lukasz et al. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. **Current Medicinal Chemistry**, 2009.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KLEINBERG, Michael. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 27, n. SUPPL. 1, p. 12–16, 2006.

KRÜGER, Timothy; ENGSTLER, Markus. Flagellar motility in eukaryotic human parasites. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 46, p. 113–127, 2015.

KULSHRESTHA, Arpita et al. Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, [s. l.], p. 825–828, 2013.

KUMARA, Rishikesh et al. PLGA-PEG Encapsulated sitamaquine nanoparticles drug delivery system against *Leishmania donovani*. **Journal of Scientific and Innovative Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 85–90, 2014.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature Parasitology Supplements**, [s. l.], v. 273, p. 595–600, 1978.

LAINSON, Ralph; SHAW, J. J. New World leishmaniasis Parasitology. In: COLLIER L, BALOWS A, Sussman M. (Ed.). **Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections**. 10th. ed. London: Edward Arnold Ltd, 2005. p. 313–349.

LANCASTER, Michael V; FIELDS, Rebecca D. **Alamar Blue Patent**, 5501959, 1996.

LEGRAND, P. et al. Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 2518–2522, 1992.

LINDOSO, José Angelo L.; LINDOSO, Ana Angélica B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 247–253, 2009.

LIU, Chi-Hsien; WU, Chao-Ting. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v.

353, n. 2, p. 149–156, 2010.

MAHMUD, Hasan et al. Triggering of suicidal erythrocyte death by amphotericin B. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 24, p. 263–270, 2009.

MANZONI, P. et al. Early Human Development Liposomal amphotericin B does not induce nephrotoxicity or renal function impairment in premature neonates. **Early Human Development**, [s. l.], v. 88, p. S86–S91, 2012.

MARLOW, Mariel Asbury et al. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2013.

MedCalc Statistical Software version 19 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019).

MENDONÇA, V. C. et al. Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: *In vitro* biological activity, toxicity and *in vivo* therapeutic efficacy against murine tegumentary leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 169, p. 34–42, 2016.

MIKUS, Judith; STEVERDING, Dietmar. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye AlamarBlue. **Parasitology International**, [s. l.], v. 48, p. 265–269, 2000.

MINODIER, Philippe; PAROLA, Philippe. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 150–158, 2007.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; ANDRESEN, T. L. Factors Controlling Nanoparticle Pharmacokinetics: An Integrated Analysis and Perspective. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 481–503, 2011.

MOSIMANN, Vincent et al. Liposomal amphotericin B treatment of Old World cutaneous and mucosal leishmaniasis: A literature review. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 182, p. 246–250, 2018.

MÜLLER, R. ...; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 3–19, 2001.

MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, United States, v. 45, n. 8, p. 2185–2197, 2001.

NAUCKE, Torsten J.; LORENTZ, Susanne. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–5, 2012.

NEVES, Ana Rute et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **International journal of nanomedicine**, New Zealand, v. 8, p. 177–187, 2013.

OGUNGBE, Ifedayo Victor; ERWIN, William R.; SETZER, William N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, [s. l.], v. 48, p. 105–117, 2014.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Neglected Tropical Diseases**. 2018. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em: 22 fev. 2018

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Leishmaniasis in Brazil**. 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis\\_Brazil/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Brazil/en/)>. Acesso em: 30 jul. 2019

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian journal of veterinary research**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

PACE, David. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PAPPAS, Peter G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016.

PETERS, Nathan C. et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **Science**, [s. l.], v. 321, n. 5891, p. 970 LP – 974, 2008.

PETIT, Caroline et al. Heat-Induced Superaggregation of Amphotericin B Reduces Its *In Vitro* Toxicity: a New Way To Improve Its Therapeutic Index. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 2345–2351, 1997.

PHILLIP, Scott. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1707–1713, 2005.

PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 93, n. 20, p. 10984–9, 1996.

RAZ, B. et al. The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. **Acta tropica**, Netherlands, v. 68, n. 2, p. 139–147, 1997.

REAL, Fernando et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1549–1564, 2014.

REITHINGER, Richard et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RODRIGUES, J. S. et al. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein

loading and surface modification with lectins. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, Netherlands, v. 92, n. 1–2, p. 103–112, 2003.

SAMPAIO, SEBASTIAO A. P. et al. The Treatment of American (Mucocutaneous) Leishmaniasis with Amphotericin B. **JAMA Dermatology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 627–635, 1960.

SANTA CATARINA. Secretaria do Estado de Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica (DIVE). **GUIA DE ORIENTAÇÃO PARA A VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)**. 2018. Disponível em: <[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia\\_Basico\\_de\\_Orientacao\\_LVC\\_2018.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/Guia_Basico_de_Orientacao_LVC_2018.pdf)>. Acesso em: 25 jul. 2019.

SILVEIRA, Fernando T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 00, p. 1–12, 2019.

SINGH, Pankaj K. et al. Chitosan coated PluronicF127 micelles for effective delivery of Amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 105, p. 1220–1231, 2017.

SODDU, Elena et al. The effect of formulative parameters on the size and physical stability of SLN based on “green” components. **Pharmaceutical development and technology**, England, v. 21, n. 1, p. 98–107, 2016.

SOLDATI, Pedro P. et al. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **IFAC-PapersOnLine**, [s. l.], v. 51, n. 27, p. 16–21, 2018.

SOUZA, Aline De et al. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018.

SOUZA, Wanderley De; ATTIAS, Márcia; RODRIGUES, Juliany C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 41, p. 2069–2080, 2009

SYMMERS, W. St. C. LEISHMANIASIS ACQUIRED BY CONTAGION: A CASE OF MARITAL INFECTION IN BRITAIN. **The Lancet**, [s. l.], v. 275, n. 7116, p. 127–132, 1960.

TORRADO, J. J. et al. Amphotericin B Formulations and Drug Targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 97, n. 7, p. 2405–2425, 2008.

TRINDADE BEZERRA, Juliana Maria et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990–2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–19, 2018.

TURCO, Salvatore J.; DESCOTEAUX, Albert. The Lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 46, p. 65–94, 1992.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid

nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Die Pharmazie**, Germany, v. 61, n. 5, p. 375–386, 2006.

VAN ETTEN, EELS W. M. et al. Activity of liposomal amphotericin B with prolonged circulation in blood versus those of AmBisome and fungizone against intracellular *Candida albicans* in murine peritoneal macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 2437–2439, 1998.

VAN ETTEN, Els W. M. et al. Mild heating of amphotericin B-desoxycholate: Effects on ultrastructure, *in vitro* activity and toxicity, and therapeutic efficacy in severe candidiasis in leukopenic mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1598–1603, 2000.

VYAS, Suresh P.; GUPTA, Swati. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International journal of nanomedicine**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 417–32, 2006.

WANG, Jhi-joung et al. Lipid nanoparticles with different oil / fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 38, p. 138–146, 2009.

WIJNANT, Gert-Jan et al. Relation between Skin Pharmacokinetics and Efficacy in AmBisome Treatment of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. e02009-17, 2018.

YARDLEY, Vanessa; CROFT, Simon L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 752–756, 1997.

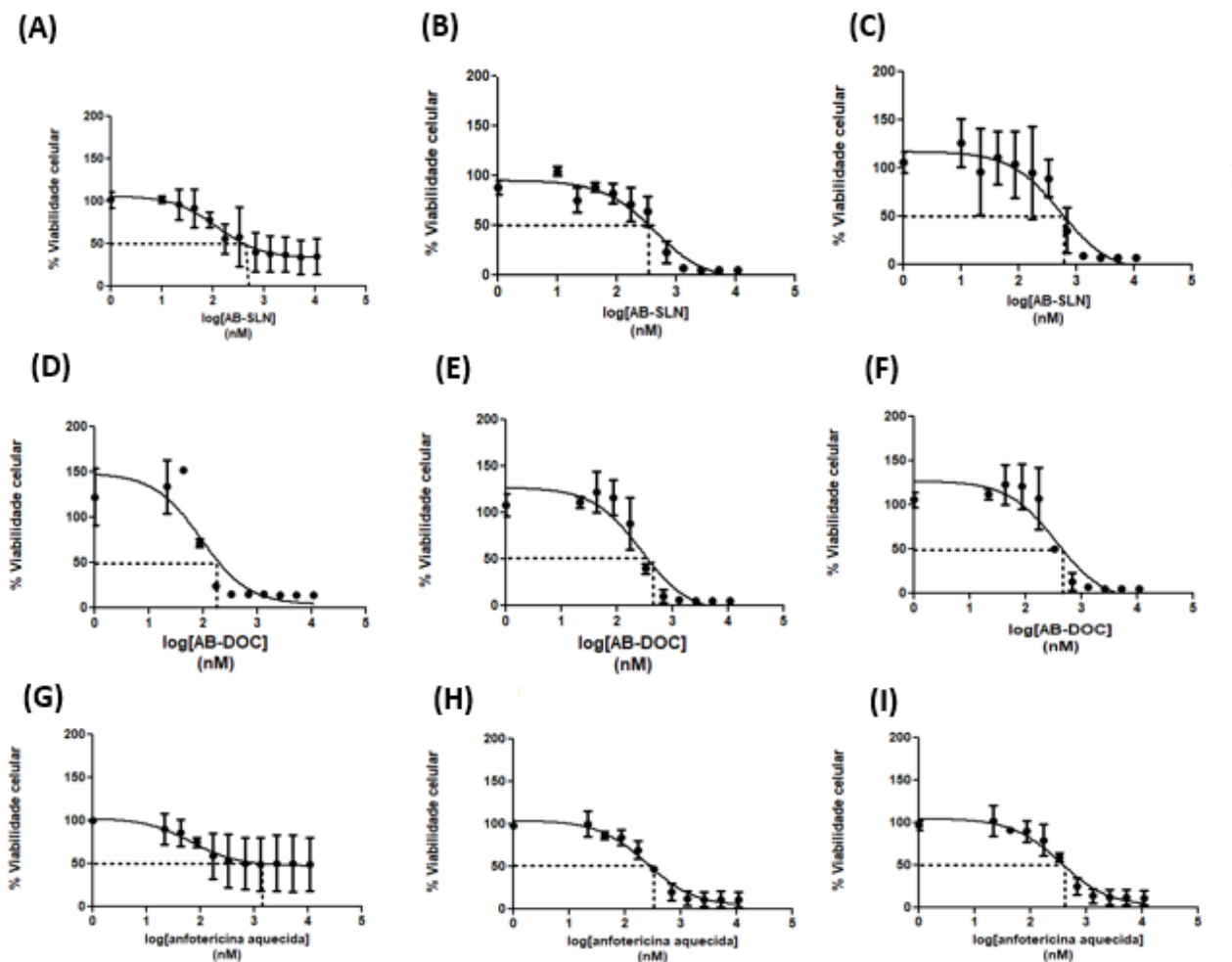
YARDLEY, Vanessa; CROFT, Simon L. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 243–248, 2000.

ZIA, Qamar et al. Super aggregated form of Amphotericin B: a novel way to increase its therapeutic index. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 792–803, 2016.

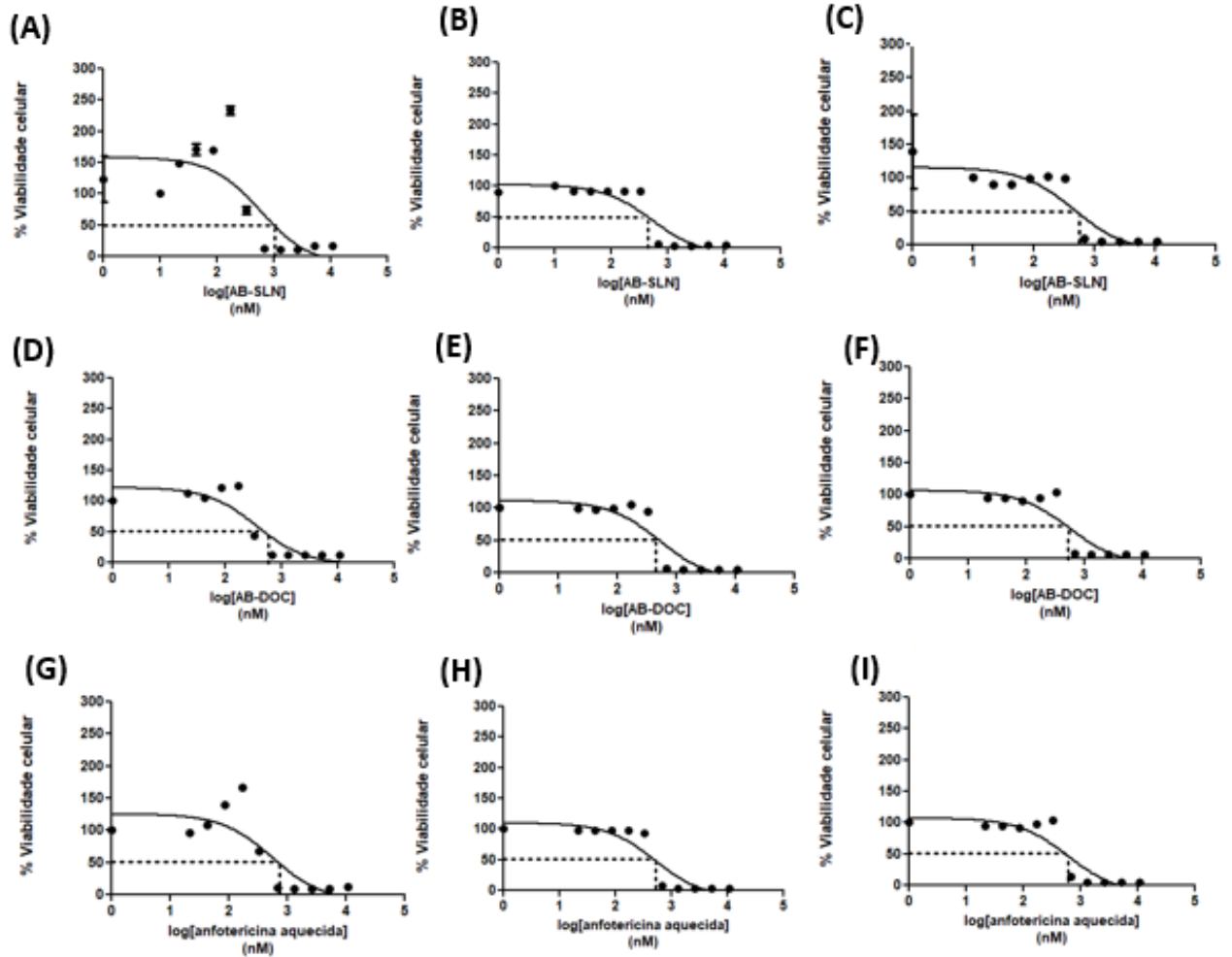
## 10. APÊNDICES

### APÊNDICE A - Avaliação da atividade biológica frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis*

CI<sub>50</sub> para tratamento de 24h: (A), (B) e (C) referem-se ao tratamento com AB-NLS; (D), (E) e (F) referem-se ao tratamento com AB-DOC; e (G), (H) e (I) referem-se ao tratamento com AB-HT. (A), (D) e (G) foram incubadas por 1h com resazurina; (B), (E) e (H) foram incubadas por 12h; e (C), (F) e (I) foram incubadas por 24h.

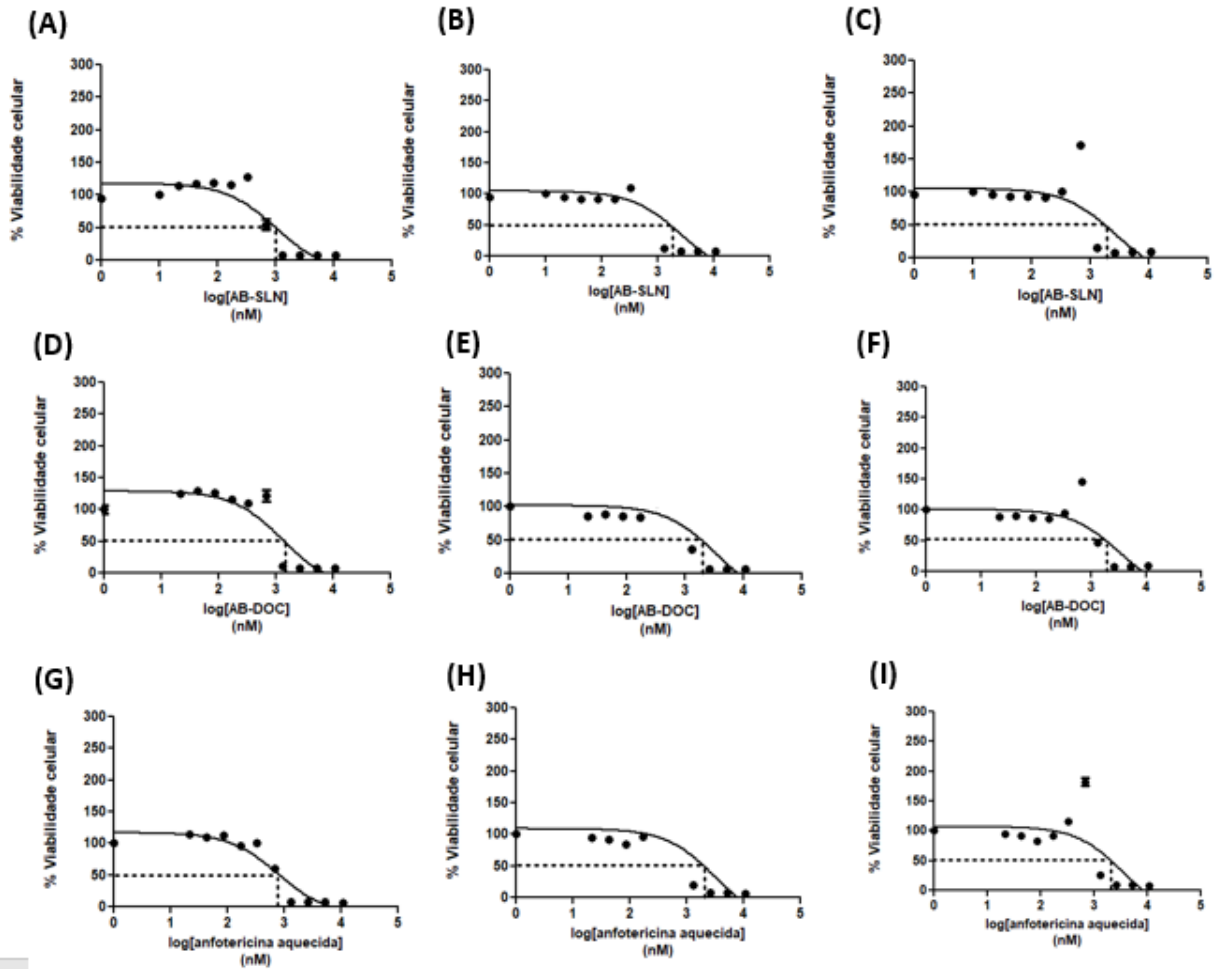


CI<sub>50</sub> para tratamento de 48h: (A), (B) e (C) referem-se ao tratamento com AB-NLS; (D), (E) e (F) referem-se ao tratamento com AB-DOC; e (G), (H) e (I) referem-se ao tratamento com AB-HT. (A), (D) e (G) foram incubadas por 1h com resazurina; (B), (E) e (H) foram incubadas por 12h; e (C), (F) e (I) foram incubadas por 24h.





CI<sub>50</sub> para tratamento de 72h: (A), (B) e (C) referem-se ao tratamento com AB-NLS; (D), (E) e (F) referem-se ao tratamento com AB-DOC; e (G), (H) e (I) referem-se ao tratamento com AB-HT. (A), (D) e (G) foram incubadas por 1h com resazurina; (B), (E) e (H) foram incubadas por 12h; e (C), (F) e (I) foram incubadas por 24h.



**APÊNDICE B - Valores de CI<sub>50</sub> para promastigotas de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com formas farmacêuticas de AB-DOC**

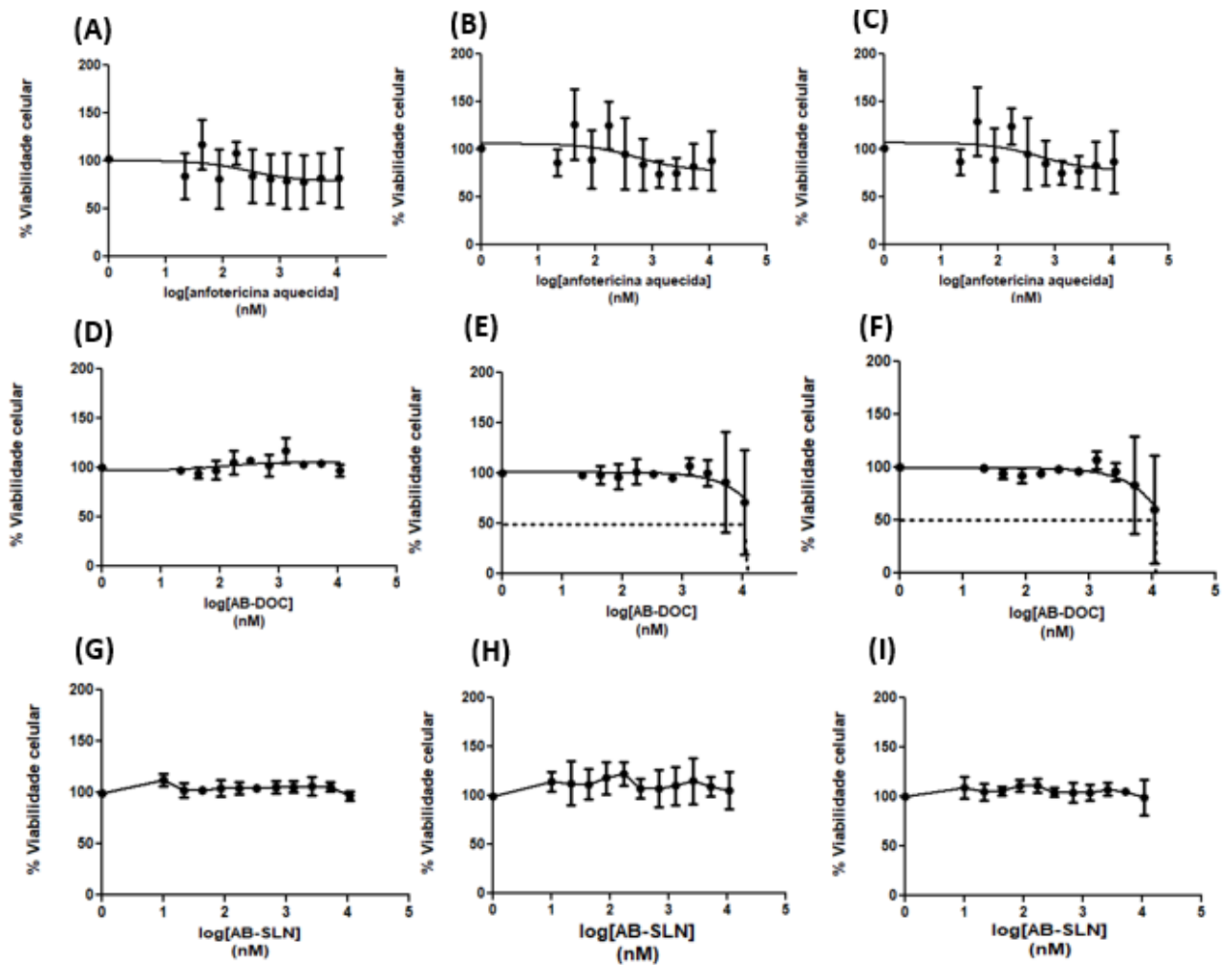
1h resazurina	TEMPO DE TRATAMENTO	CI <sub>50</sub> nM
AB-NLS	24h	412,5
	48h	1023,8
	72h	1027,8
AB-DOC	24h	199,0
	48h	505,8
	72h	1427,3
AB-HT	24h	1321
	48h	713,7
	72h	842

12h resazurina	TEMPO DE TRATAMENTO	CI <sub>50</sub> nM
AB-NLS	24h	353,4
	48h	458,75
	72h	1719,26
AB-DOC	24h	367
	48h	526
	72h	1954,8
AB-HT	24h	292
	48h	504
	72h	2051

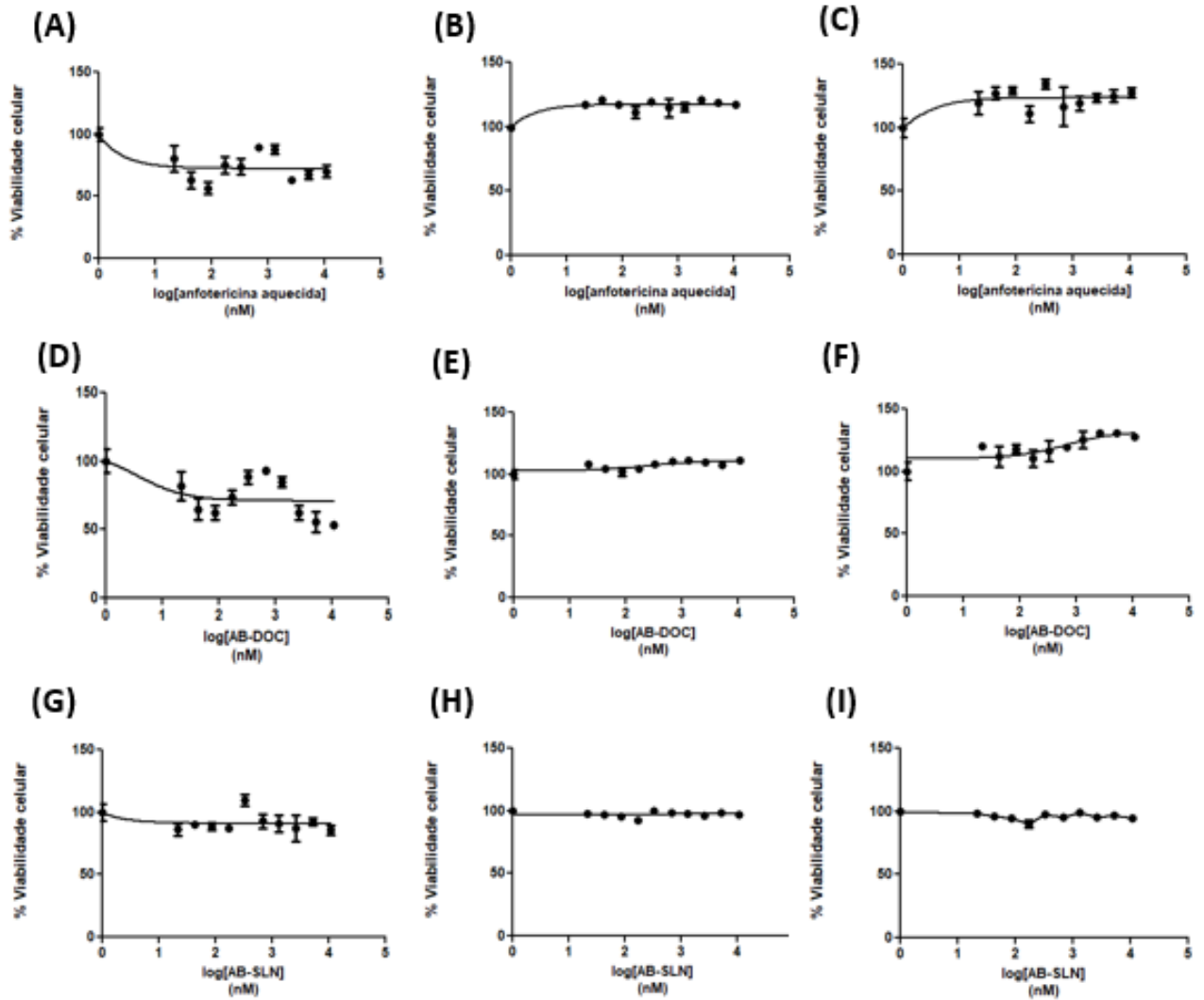
24h resazurina	TEMPO DE TRATAMENTO	CI <sub>50</sub> nM
AB-NLS	24h	626
	48h	532,16
	72h	1821,8
AB-DOC	24h	461,4
	48h	526
	72h	1905
AB-HT	24h	397
	48h	555
	72h	2110

### APÊNDICE C - Avaliação da atividade biológica das formulações de Anfotericina B frente a células de macrófagos Raw 264.7

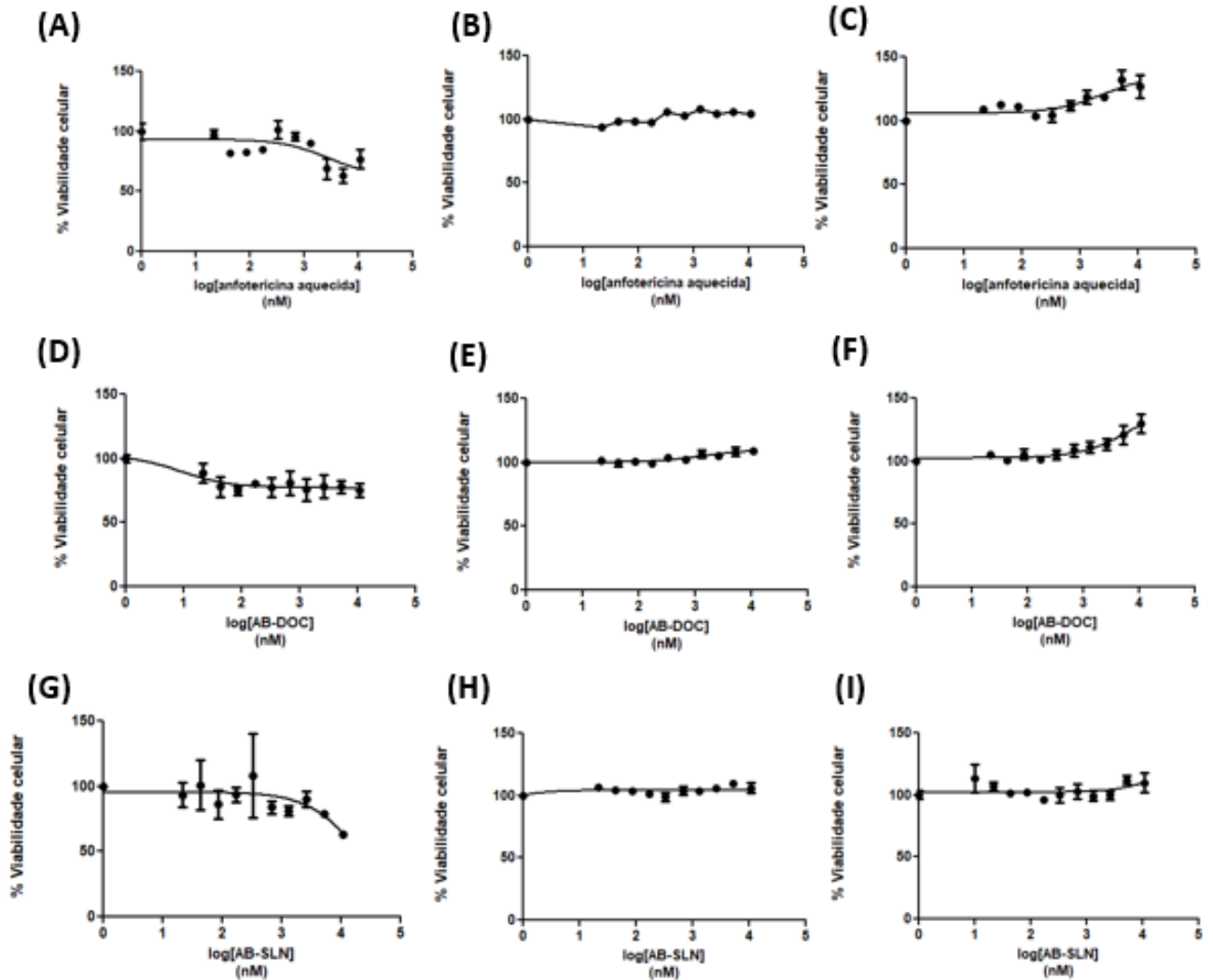
CC<sub>50</sub> para tratamento de 24h: (A), (B) e (C) referem-se ao tratamento com AB-HT; (D), (E) e (F) referem-se ao tratamento com AB-DOC; e (G), (H) e (I) referem-se ao tratamento com AB-NLS. (A), (D) e (G) foram incubadas por 1h com resazurina; (B), (E) e (H) foram incubadas por 12h; e (C), (F) e (I) foram incubadas por 24h.



CC<sub>50</sub> para tratamento de 48h: (A), (B) e (C) referem-se ao tratamento com AB-HT; (D), (E) e (F) referem-se ao tratamento com AB-DOC; e (G), (H) e (I) referem-se ao tratamento com AB-NLS. (A), (D) e (G) foram incubadas por 1h com resazurina; (B), (E) e (H) foram incubadas por 12h; e (C), (F) e (I) foram incubadas por 24h.



CC<sub>50</sub> para tratamento de 72h: (A), (B) e (C) referem-se ao tratamento com AB-HT; (D), (E) e (F) referem-se ao tratamento com AB-DOC; e (G), (H) e (I) referem-se ao tratamento com AB-NLS. (A), (D) e (G) foram incubadas por 1h com resazurina; (B), (E) e (H) foram incubadas por 12h; e (C), (F) e (I) foram incubadas por 24h.



**APÊNDICE D - Valores de CC<sub>50</sub> para macrófagos Raw 264.7 após tratamento com formas farmacêuticas de AB-DOC**

1h resazurina	TEMPO DE TRATAMENTO	CC <sub>50</sub> nM
AB-NLS	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822
AB-DOC	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822
AB-HT	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822

12h resazurina	TEMPO DE TRATAMENTO	CC <sub>50</sub> nM
AB-NLS	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822
AB-DOC	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822
AB-HT	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822

24h resazurina	TEMPO DE TRATAMENTO	CC <sub>50</sub> nM
AB-NLS	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822
AB-DOC	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822
AB-HT	24h	<10822
	48h	<10822
	72h	<10822