



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ELIZAMA SHIRLEY SILVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E  
TOXICOLÓGICA DE NANOSISTEMA DE CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA)**

**FORTALEZA**

**2020**

ELIZAMA SHIRLEY SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E  
TOXICOLÓGICA DE NANOSISTEMA DE CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

FORTALEZA

2020

ELIZAMA SHIRLEY SILVEIRA

DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E  
TOXICOLÓGICA DE NANOSISTEMA DE CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes  
Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof. Dr. Nuno Miguel De Jesus Machado  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Bianca Oliveira Louchard  
Centro Universitário Fametro

---

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S587d Silveira, Elizama Shirley.  
DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E TOXICOLÓGICA DE NANOSISTEMA DE CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA) / Elizama Shirley Silveira. – 2020.  
111 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. Cumarina. 2. Atividade leishmanicida. 3. Leishmania brasiliensis. 4. Nanofármaco. 5. Nanocápsula. I. Título.

CDD 615

---

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Manoel e Vera Neide**, pelas orações, pela confiança em mim depositada, pelo investimento em meus estudos. Muito obrigada!

Ao meu marido, **Fábio Sobrinho**, o maior incentivador nesse caminho e mais vibrante pelo meu sucesso. Obrigada pelo companheirismo. Somos uma dupla imbatível!

Ao meu filho, **Marvin Silveira**, por tantos momentos que me deu fôlego pra continuar essa caminhada, me ensinando o que realmente importa.

Aos meus irmãos, **Elvis e Karla e Daniel** pela convivência e cumplicidade. Amo vocês.

À minha avó, **Maria José**, pelas orações, pelas demonstrações de amor e carinho. Obrigada.

À minha sogra, **Maria de Fátima Sobrinho**, meu sogro, **Marcos Holanda Montenegro**, e minha cunhada, **Débora Sobrinho**, por cuidarem do meu bebê enquanto eu estudava.

À Profa. Dra. **Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal**, pelo carinho, pela orientação, pela paciência e incentivo na pesquisa.

Agradeço, em especial, **Deocélio Bezerra, Aline Alves, Raquel Paiva, Adoniram Barbosa, Germano Andrade, Odara Sena, Thiago Feitosa, Talysson Almeida**, pela amizade e pela alegre convivência confortante que me deram forças nos momentos de insegurança. Vocês são minha válvula de escape.

Agradeço, sobretudo, àqueles que trabalharam comigo e sabem quão árduo é se dedicar a pesquisa, **Naya Rodrigues, Rafael Marciano, Talysson Almeida, Talita Magalhães, Emmanuel Vinícius, Vinícius Serra, João Antônio, Thalia Lourenço, Ian Ovider, João Vitor, Lyara Barbosa, Bianca Louchard**. Vocês fazem parte dessa vitória!

A todos do CEFAC pelos momentos de descontração nas horas estressantes. É uma dádiva estar em um local de trabalho onde a convivência traz tanta alegria e leveza no dia a dia.

Agradeço a todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo ensino e exemplo de profissionalismo.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará, onde estive por tantos anos me sentindo acolhida. Você me deu muito aprendizado, experiências, parcerias, momentos e **pessoas** que enchem meu peito de carinho e saudades. Eu amo tanto essa casa!

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo no desenvolvimento da pesquisa nacional.

## RESUMO

### **DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E TOXICOLÓGICA DE NANOSISTEMA DE CUMARINA (1,2-BENZOPIRONA).**

Elizama Shirley Silveira. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Ceará, 2020.

A Cumarina (CM – 1,2-benzopiranona), encontrada em espécies vegetais da Caatinga como a *Amburana cearensis* A. C. Smith e *Justicia pectoralis* Jacq, é usada na clínica no tratamento de varizes, hemorroidas e profilaxia de trombose pré e pós-operatório e na gravidez. Estudos comprovam sua atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e anti-parasitária. No entanto, é uma molécula volátil, com baixa solubilidade em água e sua lactona é facilmente hidrolisada, o que dificulta o aproveitamento de suas propriedades farmacológicas. Por outro lado, nanosistemas têm sido empregados com sucesso visando superar ou reduzir desafios no desenvolvimento de fármacos com problemas biofarmacêuticos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um nanosistema de CM, com avaliação da toxicidade e atividade leishmanicida (*Leishmania braziliensis*) *in vitro* e *in vivo*. Para tanto, foi desenvolvido e validado método analítico para identificação e quantificação da CM por Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme resolução RE nº 166 (BRASIL, 2017). Foram produzidos dois nanocarreadores diferentes para encapsular a CM: Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de CM (CLNC) e Nanocápsulas poliméricas de CM (NCC). Os CLNC foram produzidos (homogeneização em alta pressão a quente) com diferentes concentrações de fase lipídica (5% e 10%) utilizando Precirol ATO5® e Miglyol 812®. NCC foram preparadas (deposição interfacial do polímero pré-formado) com auxílio de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) <sup>23</sup> usando o polímero Eudragit® RS100. A caracterização e avaliação da estabilidade por nove meses dos nanosistemas foi realizada em relação ao diâmetro (D), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ), teor de ativo (TA) e eficiência de encapsulação (EE). Foram realizados testes de toxicidade *in vitro* (teste do MTT - Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio em macrófagos humanos/J774) e *in vivo* (toxicidade aguda em camundongos *Swiss*). A carga parasitária (amastigotas intracelulares) em macrófagos J774 infectados com *L. braziliensis* (24 ou 48 h) foi determinada e a atividade leishmanicida foi avaliada em hamsters *Mesocricetus auratus*. Para fins de caracterização da NCC, o método analítico (277 nm) foi validado, mostrando-se

específico, linear, preciso, exato e robusto sob determinadas condições. O CLNC com 10% de fase lipídica e 5 ciclos de homogeneização (CLNC 10%5C) apresentou melhores características físico-químicas em relação as outras formulações de carreadores lipídicos, mas foi citotóxico em macrófagos (5 – 100 µg/ml), por isso foi preterido do estudo. A formulação de NCC oriunda do DCCR selecionada apresentou maior EE (58,01 ± 0,2%) em relação as outras suspensões de nanocápsulas, com D, IPD e PZ de 210,0 ± 0,24 nm; 0,13 ± 7,27; 75,9 ± 0,73 mV, respectivamente e TA de 102,5 ± 8,8%, mostrando-se estável durante o período investigado (nove meses). A NCC (100 µg/ml) não apresentou citotoxicidade em macrófagos e nos estudos de toxicidade aguda (10 - 40 mg/kg, v.o.), não provocou alterações comportamentais, bioquímica ou hematológica em roedores. A NCC (50 µg/ml) reduziu em 31,1% e 5,4 % a carga parasitária de macrófagos infectados por *L. braziliensis* após 24 e 48 h de incubação, respectivamente. O tratamento dos animais com NCC (10 mg/kg, v.o.) reduziu a carga parasitária no sítio da lesão e protegeu a disseminação dos parasitos para o linfonodo. O estudo proporcionou o desenvolvimento e caracterização de NCC, que mostrou características tecnológicas de interesse e estabilidade, não associada à toxicidade e com atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*.

Palavras chaves: Cumarina, Atividade leishmanicida, *Leishmania braziliensis*, nanofármaco, nanocápsula.

## ABSTRACT

**DEVELOPMENT, EVALUATION OF LEISHMANICIDE AND TOXICOLOGICAL ACTIVITY OF CUMARINE NANOSYSTEM (1,2-BENZOPYRONE).** Elizama Shirley Silveira. Advisor: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Doctoral thesis. Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Department of Pharmacy. Federal University of Ceará, 2020.

Coumarin (CM - 1,2-benzopyranone), found in Caatinga plant species such as *Amburana cearensis* AC Smith and *Justicia pectoralis* Jacq, is used in the clinic to treat varicose veins, hemorrhoids and pre and postoperative thrombosis prophylaxis and in pregnancy. Studies prove its anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-parasitic activity. However, it is a volatile molecule, with low solubility in water and its lactone is easily hydrolyzed, which makes it difficult to take advantage of its pharmacological properties. On the other hand, nanosystems have been successfully used to overcome or reduce challenges in the development of drugs with biopharmaceutical problems. Given the above, the objective of this work was the development of a nanosystem of CM, with evaluation of toxicity and leishmanicidal activity (*Leishmania braziliensis*) *in vitro* and *in vivo*. For this purpose, an analytical method was developed and validated for the identification and quantification of CM by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), according to Resolution No. 166 (BRASIL, 2017). Two different nanocarriers were produced to encapsulate CM: CM-loaded Nanostructured Lipid Carriers (CM-NLC) and CM-loaded polymeric Nanocapsules (CM-NC). The CM-NLCs were produced (homogenization in high pressure at heat) with different concentrations of lipid phase (5% and 10%) using Precirol ATO5® and Miglyol 812®. CM-NC were prepared (interfacial deposition of the preformed polymer) with the aid of Central Rotational Composite Design (CRCD) 2<sup>3</sup> using the polymer Eudragit® RS100. The characterization and evaluation of the nanosystems stability for nine months was carried out in relation to the size (S), polydispersion index (PDI), zeta potential (ZP), active content (AC) and encapsulation efficiency (EE). Toxicity tests were performed *in vitro* (MTT test - Bromide 3 [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium in macrophages/J774) and *in vivo* (acute toxicity in *Swiss* mice). The parasitic load (intracellular amastigotes) in J774 macrophages infected with *L. braziliensis* (24 or 48 h) was determined and the leishmanicidal activity was evaluated in *Mesocricetus auratus* hamsters. For the purposes of characterizing the CM-NC, the analytical method (277 nm) was validated, showing to be specific, linear,



precise, accurate and robust under certain conditions. CM-NLC with 10% lipid phase and 5 homogenization cycles (CM-NLC 10%5C) showed better physical-chemical characteristics compared to other formulations of lipid carriers, but it was cytotoxic in macrophages (5 - 100  $\mu\text{g/ml}$ ), therefore was passed over from the study. The CM-NC formulation from the selected CRCD showed higher EE ( $58.01 \pm 0.2\%$ ) in relation to the other nanocapsule suspensions, with S, PDI and ZP of  $210.0 \pm 0.24$  nm;  $0.13 \pm 7.27$ ;  $75.9 \pm 0.73$  mV, respectively and a AC of  $102.5 \pm 8.8\%$ , showing stability during the investigated period (nine months). CM-NC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) did not show cytotoxicity in macrophages and in acute toxicity studies (10 - 40 mg/kg, v.o.), it did not cause behavioral, biochemical or hematological changes in rodents. The CM-NC (50  $\mu\text{g/ml}$ ) reduced the parasitic load of macrophages infected by *L. braziliensis* by 31.1% and 5.4% after 24 and 48 h of incubation, respectively. The treatment of animals with CM-NC (10 mg/kg, v.o.) reduced the parasitic load at the lesion site and protected the spread of the parasites to the lymph node. The study provided the development and characterization of CM-NC, which showed technological characteristics of interest and stability, not associated with toxicity and with leishmanicidal activity *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Coumarin, Leishmanicidal activity, *Leishmania braziliensis*, nanopharmaceutical, nanocapsule.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Casos de Leishmaniose Tegumentar por Região no Brasil (2010 – 2017).	19
Figura 2	Ciclo biológico do parasita do gênero <i>Leishmania</i> .	20
Figura 3	Estrutura química da cumarina.	26
Figura 4	Representação esquemática de uma Nanopartícula Lipídica Sólida e um Carreador Lipídico Nanoestruturado.	31
Figura 5	Representação esquemática da estrutura da nanocápsula.	32
Figura 6	Desenho esquemático para produção de Nanocápsulas de cumarina.	43
Figura 7	Reação de redução do MTT.	46
Figura 8	Desenho esquemático para ensaio da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de Nanocápsulas de cumarina.	48
Figura 9	Desenho esquemático para ensaio da toxicidade aguda de Nanocápsulas de cumarina.	49
Figura 10	Desenho esquemático para ensaio da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> de Nanocápsulas de Cumarina.	51
Figura 11	Espectro de Varredura da cumarina de 200 à 400 nm gerado por CLAE – DAD.	52
Figura 12	Cromatogramas gerado por CLAE – DAD em 277 nm referentes a cumarina, Nanocápsulas de cumarina e Nancápsulas branca.	53
Figura 13	Gráfico da pureza de pico da cumarina.	54
Figura 14	Representação gráfica da curva de calibração da cumarina por CLAE-DAD com detecção em 277 nm e respectiva equação da reta e coeficiente de determinação obtidos por regressão linear.	55
Figura 15	Gráfico dos resíduos por tratamento estatístico da curva de calibração da Cumarina.	55
Figura 16	Diagrama de Pareto: efeito da variável (fluxo da fase móvel) sobre a concentração da cumarina em Nanocápsulas de cumarina.	59
Figura 17	Relação entre valores da concentração de cumarina observados versus valores previstos pelo modelo ajustado. $R^2 = 99,4 \%$ .	60

<b>Figura 18</b>	<b>Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente à NCC.</b>	<b>64</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Diagrama de Pareto: efeito das variáveis (concentração de polímero e de óleo) sobre a eficiência de encapsulação da cumarina em Nanocápsulas de cumarina.</b>	<b>68</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Relação entre valores de eficiência de encapsulação da NCC observados versus valores previstos pelo modelo. <math>R^2 = 71\%</math>.</b>	<b>69</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Curva de contorno mostrando o efeito das variáveis (óleo e polímero) sobre a Eficiência de Encapsulação da CM no nanossistema.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade de CLNC 10% 5C em macrófagos J774 24h através do teste do MTT.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 23</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade de NCCb em macrófagos J774 incubados por 24h (A) e 48h (B) através do teste do MTT.</b>	<b>76</b>
<b>Figura 24</b>	<b>Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente à NCCb após 9 meses de preparação.</b>	<b>78</b>
<b>Figura 25</b>	<b>Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente à NCCb após 9 meses de preparação.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 26</b>	<b>Carga parasitária em macrófagos J774 infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com NCCb por 24h (A) e 48h (B).</b>	<b>81</b>
<b>Figura 27</b>	<b>Fotomicrografia de macrófagos J774 infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com NCCb (48h).</b>	<b>81</b>
<b>Figura 28</b>	<b>Evolução do peso corporal de camundongos submetidos à avaliação da toxicidade aguda da NCCb.</b>	<b>83</b>
<b>Figura 29</b>	<b>Evolução do peso corporal de hamster infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com NCCb</b>	<b>88</b>
<b>Figura 30</b>	<b>Evolução da espessura da lesão em hamsters infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com NCCb.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 31</b>	<b>Fotografias dos aspectos das lesões durante o tratamento com NCCb na infecção por <i>L. braziliensis</i>.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 32</b>	<b>Carga parasitária na lesão (A) e no linfonodo drenante da lesão (B) em hamster infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com NCCb.</b>	<b>90</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação química das Cumarinas.	24
Tabela 2	Atividades farmacológicas de cumarinas e seus derivados.	25
Tabela 3	Adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizadas na pesquisa.	36
Tabela 4	Condições de realização das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de diodos.	39
Tabela 5	Planejamento Fatorial $2^2$ aplicado na avaliação da robustez do método analítico para determinação de cumarina em Nanocápsulas de cumarina.	41
Tabela 6	Quantidade de excipientes usados no preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de cumarina.	42
Tabela 7	Delineamento composto central rotacional (DCCR - $2^3$ ) aplicado ao processo de produção das Nanocápsulas de cumarina.	45
Tabela 8	Avaliação da precisão (repetibilidade e intermediária) do método analítico para quantificação de cumarina nas Nanocápsulas de cumarina (CLAE-DAD).	56
Tabela 9	Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação de cumarina nas Nanocápsulas de cumarina (CLAE-DAD).	57
Tabela 10	Avaliação da robustez do método analítico para quantificação de cumarina nas Nanocápsulas de cumarina (CLAE-DAD) através de deliamento experimental com variações no fluxo e proporção da fase móvel.	58
Tabela 11	Tabela 11 – Análise de variância.	59
Tabela 12	Caracterização das formulações de CLNC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta.	62
Tabela 13	Caracterização das formulações de NCC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação.	64
Tabela 14	Caracterização das formulações de NCC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação referente ao planejamento fatorial do processo de otimização.	66

<b>Tabela 15</b>	<b>Quantidade de excipientes usadas no preparo das NCC resultantes do planejamento fatorial do processo de otimização.</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 16</b>	<b>Caracterização das formulações de NCC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação resultantes do planejamento fatorial do processo de otimização.</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 17</b>	<b>Estudo de estabilidade da NCCb: caracterização quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsalação.</b>	<b>78</b>
<b>Tabela 18</b>	<b>NCCb sobre parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos na toxicidade aguda.</b>	<b>85</b>
<b>Tabela 19</b>	<b>NCCb sobre parâmetros hematológicos do sangue de camundongos na toxicidade aguda.</b>	<b>86</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

AGEVISA	Agência Estadual de Vigilância Sanitária
AM	Análise Macroscópica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BV	Balo Volumétrico
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
CLNB	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados Branco
CLNC	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de Cumarina
CM	Cumarina
D	Diâmetro
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DAD	Detector de Arranjo de Foto Diodos
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DL50	Dose Letal Mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMY	Dihidromicetina
DPR	Desvio Padrão Relativo
EE	Eficiência de Encapsulao
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxignio
FDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundao Oswaldo Cruz

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IP	Intraperitoneal
IPD	Índice de Polidispersão
L	Leishmaniose
LM	Leishmaniose Mucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
MΦ	Macrófagos
MTT	Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2il]-2,5-Difeniltetrazólio
NC	Nanocápsulas
NCB	Nanocapsulas Branca
NCC	Nanocápsulas de Cumarina
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NNN	Meio Mcneal, Novy & Nicolle
NP	Nanocápsulas Poliméricas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS/OMS	Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial De Saúde
PA	Padrão Analítico
PLA	Poliácido Láctico
PLGA	Poli-Lactídeo-Glicolídeo
PZ	Potencial Zeta
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro Bovino Fetal
SEC	Solução Estoque Padrão de CM
TA	Teor de Ativo
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.</b>	<b>Leishmaniose.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.</b>	<b>Cumarinas.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.</b>	<b>Nanotecnologia Farmacêutica.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.</b>	<b>Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5.</b>	<b>Nanocápsulas Poliméricas.....</b>	<b>31</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas, reagentes e padrões de trabalho.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Meios de cultura.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Parasitas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Células.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Equipamentos.....</b>	<b>38</b>
<b>5.</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.</b>	<b>Desenvolvimento e validação de método analítico.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2.</b>	<b>Desenvolvimento de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de Cumarina.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3.</b>	<b>Desenvolvimento de nanocápsulas de Cumarina.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.</b>	<b>Caracterização de CLNC e NCC.....</b>	<b>43</b>
<b>5.5.</b>	<b>Otimização da formulação de NCC.....</b>	<b>45</b>
<b>5.6.</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade do CLNC e NCC em macrófagos J774 .....</b>	<b>46</b>



5.7.	Estabilidade de NCC.....	47
5.8.	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de NCC.....	47
5.9.	Avaliação da toxicidade aguda de NCC em camundongos <i>swiss</i> .....	48
5.10.	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> de NCC.....	50
5.11.	Análise estatística.....	51
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1.	Desenvolvimento e avaliação de método analítico.....	52
6.2.	Desenvolvimento e caracterização da formulação do CLNC.....	60
6.3.	Desenvolvimento e caracterização da formulação de NCC.....	63
6.4.	Otimização da formulação de NCC.....	65
6.5.	Avaliação da citotoxicidade do CLNC10%5C e da NCCb em macrófagos J774.....	73
6.6.	Estabilidade de NCCb.....	77
6.7.	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> de NCCb.....	80
6.8.	Avaliação da toxicidade aguda de NCCb em camundongos <i>swiss</i> .....	81
6.9.	Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> de NCCb.....	87
7.	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## 1. INTRODUÇÃO

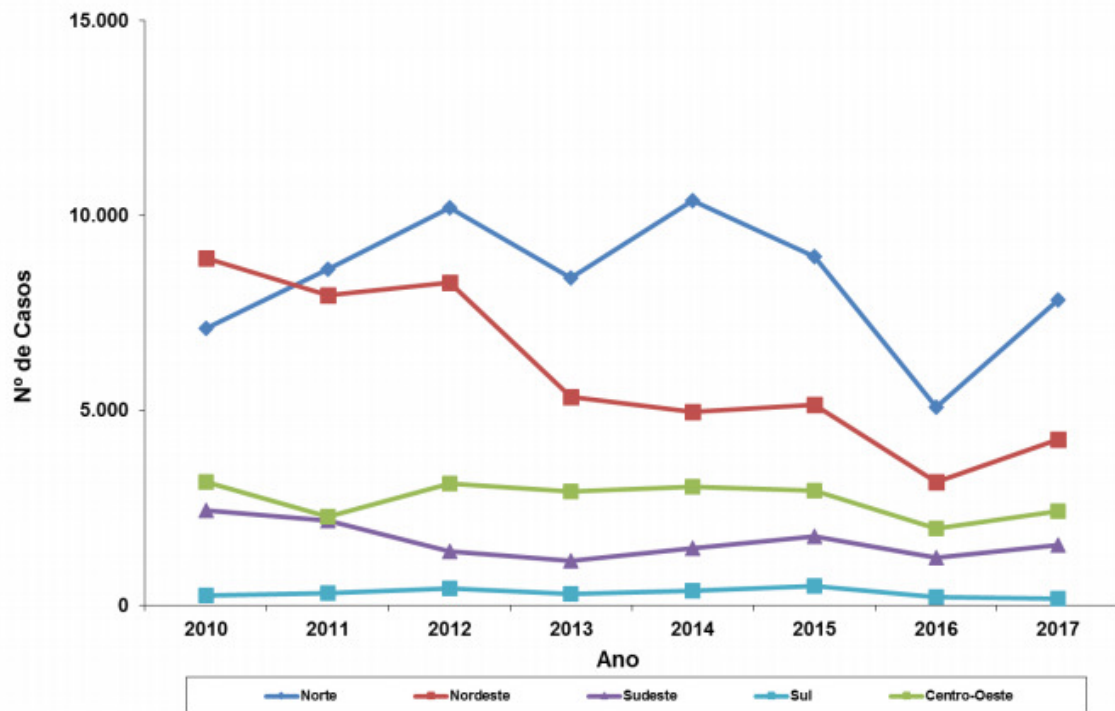
### 1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é considerada uma das doenças negligenciadas de alto impacto na saúde pública mundial, ocupando a quinta posição em prevalência no mundo. Conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma doença endêmica em 102 países, com mais de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco e 12 milhões de pessoas infectadas (AERTS *et al.*, 2018). Segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde / OMS (OPAS/OMS), no período de 2001-2017 foram reportados 940.396 novos casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose mucosa (LM) nas Américas, sendo que 2015 registrou o menor número de novos casos (46.074) na Região, devido principalmente à redução de casos na Costa Rica, Panamá e Colômbia (OPAS/OMS, 2019).

No Brasil houve um aumento de notificações no ano de 2017 (17.528 casos novos) em comparação ao ano anterior, sendo o país responsável por 72,6% dos casos reportados nas Américas naquele ano e com maior número de notificações nas regiões Norte e Nordeste (Figura 1) (OPAS/OMS, 2019; BRASIL, 2019). O estado do Ceará destaca-se devido a sua alta concentração de casos de LT, sendo considerado como área de importância epidemiológica e com microrregiões de maior incidência, em ordem decrescente: Tianguá, Baturité, Itapipoca, Sobral, Crato e Juazeiro do Norte (GUERRA, 2013; CEARÁ, 2019; BRASIL, 2019).

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por diferentes espécies de parasitas do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae) (BURZA *et al.*, 2018; OPAS/OMS, 2019). Apesar de existirem relatos dessa doença desde a época pré-colombiana em povos situados no Peru, a descoberta dos agentes etiológicos das leishmanioses só ocorreu no final do século XIX por Cunningham (1885) que descreveu formas amastigotas em casos de calazar e por Borovisky (1898) que demonstrou ser um protozoário o agente etiológico da doença denominada “botão do oriente”. Em 1903 Leishman descreveu a semelhança destas formas com o protozoário *Trypanosoma*, e Ross estabeleceu um novo gênero (*Leishmania*), depois de demonstrar que os organismos observados por Donovan e responsáveis pelo calazar não eram esporozoários (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, 1997, ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003).

**Figura 1 – Casos de Leishmaniose Tegumentar por Região no Brasil (2010 – 2017).**



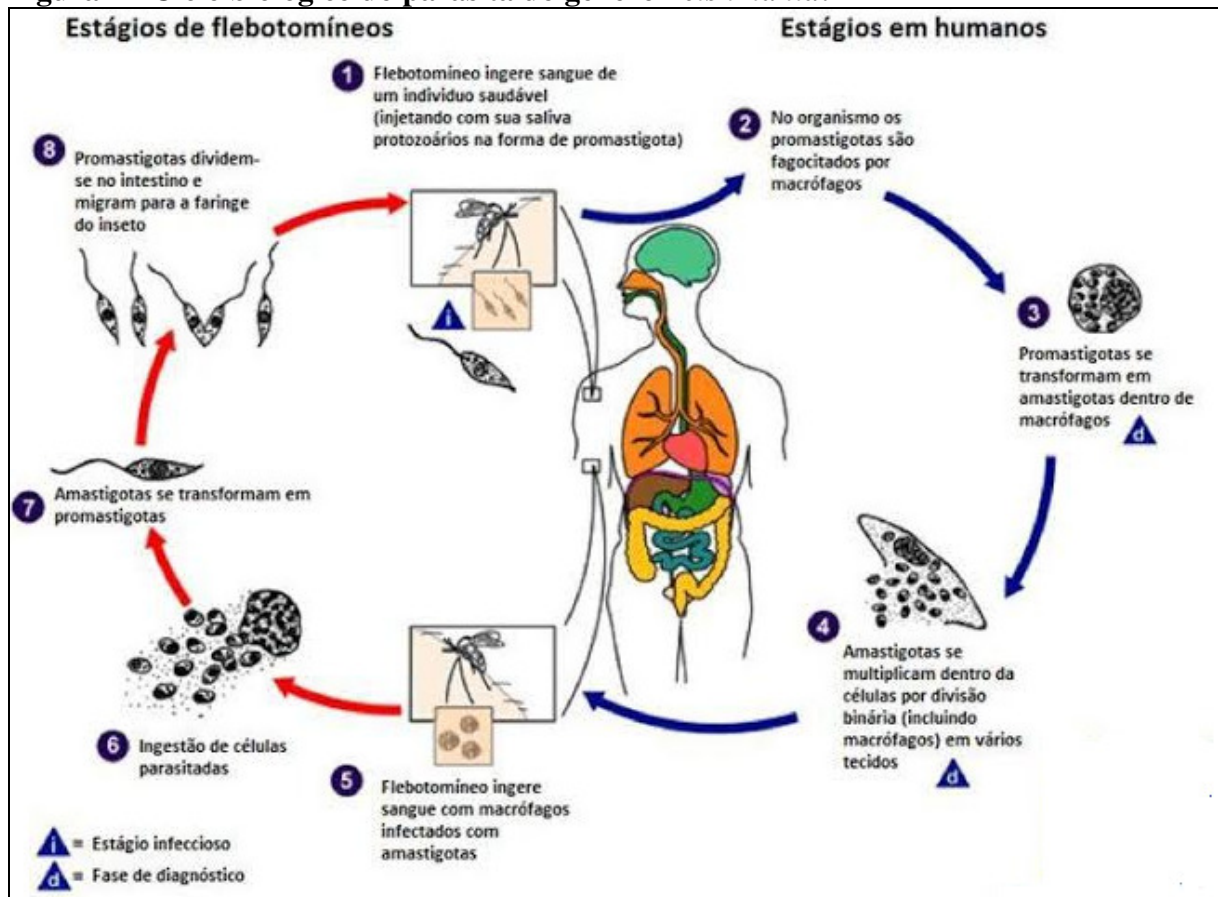
Fonte: BRASIL, 2019.

O complexo ciclo de transmissão das leishmanioses inclui vetores e hospedeiros heterogêneos. Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitas são dípteros da família Psychodidae, e pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Apenas as fêmeas são hematófagas e capazes de transmitir o parasita aos hospedeiros mamíferos. Em reservatórios silvestres (como marsupiais, roedores e primatas) a infecção tende a ser benigna, havendo um equilíbrio provavelmente por ser uma associação muito antiga entre o parasito e o hospedeiro. No caso do homem e do cão, o parasito aparece como virulento, provocando grandes danos ao hospedeiro, podendo levar à morte (KAMHAWI, 2006; FIOCRUZ, 1997).

No ciclo biológico (Figura 2), a *Leishmania* apresenta duas formas principais durante o ciclo de vida: as promastigotas, que são formas flageladas móveis presentes no flebotomíneo, e as amastigotas, formas intracelulares presentes nas células hospedeiras do mamífero e com flagelos que não se exteriorizam. Durante a picada de um vetor infectado, promastigotas metacíclicas são transmitidas para a derme do hospedeiro (1); as promastigotas de *Leishmania* interagem com as células residentes como monócitos e macrófagos dérmicos, neutrófilos, queratinócitos e células dendríticas (DCs), os quais podem fagocitar os parasitos e servir como alvos para a infecção (2); no interior dessas células, as formas promastigotas

diferenciam-se em amastigotas (3); iniciam-se então os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular, onde o aumento da carga parasitária pode induzir a apoptose das células hospedeiras infectadas, e desta forma, ocorrer liberação de amastigotas que infectarão outras células (4); macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas do vetor, durante seu repasto sanguíneo (5, 6); no intestino do vetor, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas não-infectivas (7); posteriormente diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor e estão prontas pra dar continuidade ao ciclo numa nova infecção (8).

**Figura 2 - Ciclo biológico do parasita do gênero *Leishmania*.**



Fonte: adaptado de Agência Estadual de Vigilância Sanitária - AGEVISA, 2017

A forma clínica da leishmaniose e as partes do corpo acometidas vão depender a princípio da espécie responsável pela infecção. A Leishmaniose Visceral (LV) acomete fígado, baço e medula óssea e é causada por *L. (Leishmania) donovani* e *L. infantum*. A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, espectral da pele e das mucosas, não contagiosa, de evolução crônica e causada por diferentes espécies de *Leishmania*, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido acidentalmente

(BASANO *et al.*, 2004; BEKHIT *et al.*, 2018). No Brasil, as principais espécies causadoras de LT são: *L. amazonensis* – presente em todas as regiões do país; *L. (Viannia) guyanensis* – aparentemente limitada à região Norte; *L. (Viannia) lainsoni* - identificada nos estados do Pará, Rondônia e Acre; *L. (Viannia) naiffi* - ocorre nos estados do Pará e Amazonas; *L. (Viannia) shawi* - com casos humanos encontrados no Pará e Maranhão; e a *L. (Viannia) braziliensis* – a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LT, sendo a mais importante não só no Brasil, mas em toda a América Latina com ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina (NEVES, 2005; BRASIL, 2015a).

As manifestações clínicas iniciais da LT consistem em pequenas pápulas eritematosas que aumentam lentamente de tamanho até formar nódulos, os quais evoluem para as típicas lesões. Tais lesões não são apenas um fenômeno secundário da infecção, mas um ponto crítico da doença, visto que a desestruturação do estrato córneo da pele acarreta processos inflamatórios de maior intensidade, que podem culminar na evolução para formas mais deletérias da doença (NYLÉN & EIDSMO, 2012).

O sistema imune inato do hospedeiro é ativado logo após a infecção, promovendo o recrutamento de células inflamatórias e a indução da imunidade adaptativa. O reconhecimento do parasito envolve receptores específicos e componentes do sistema complemento, além de células do sistema imunológico, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (LIU *et al.*, 2002). A interação *Leishmania*-macrófago ocorre pelos receptores celulares do hospedeiro (CR1, CR3, manose-fucose) e moléculas de superfície do parasito, principalmente os lipofosfoglicanos (ZAMBRANO *et al.*, 2002).

O diagnóstico da LT humana é dificultado pela semelhança dos sintomas clínicos com outras doenças de incidência mais comum, por exemplo, sífilis e hanseníase. Testes laboratoriais por métodos parasitológicos e imunológicos auxiliam no diagnóstico e são fundamentais, não apenas para a confirmação dos achados clínicos, mas também por fornecerem informações epidemiológicas (por meio da identificação da espécie circulante), fundamentais para o direcionamento das medidas a serem adotadas para o controle do agravo (BRASIL, 2020).

Em relação ao tratamento, a aplicação de antimoniais na terapêutica das leishmanioses foi introduzida pelo brasileiro Gaspar Vianna em 1912 a partir do tártaro emético para tratamento da leishmaniose mucocutânea (REY, 2008). Atualmente, são utilizados como fármacos de primeira escolha os antimonias pentavalentes estibogluconato de

sódio (Pentostam®), comercializado nos Estados Unidos e Europa, ou antimoniato de meglumine (Glucantime®), utilizado na América Latina e África (KALANTARI *et al.*, 2014). No entanto, a resistência ao tratamento com antimônio gerou problemas críticos de saúde na maioria das áreas endêmicas e novas drogas foram adotadas, entre elas a anfotericina B, miltefosina e pentamidina (GHOBAKHLOO *et al.*, 2017).

Esses medicamentos usados para tratar a leishmaniose, os de primeira e segunda opção, apresentam várias inconveniências, tais como: a via de aplicação (parenteral), a ocorrência de falhas terapêuticas e efeitos adversos graves como arritmias cardíacas, pancreatite, nefro e hepatotoxicidade (SINGH & SIVAKUMAR, 2004; ALCÂNTARA *et al.*, 2018). A toxicidade significativa dos fármacos, curso de tratamento muito longo, custo elevado, difícil administração, resistência de várias cepas à essas drogas e ausência de vacina eficaz justificam então a necessidade de novos tratamentos contra leishmanioses ou estratégias para melhorar a segurança e eficácia dos fármacos em uso (CROFT *et al.*, 2006).

Segundo a OMS, o reino vegetal é uma opção para o desenvolvimento de um agente terapêutico que tenha uma relativa segurança e uma boa relação custo-benefício para vários problemas de saúde. Além disso, aproximadamente 40% de todos os medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, a maioria dos quais em plantas. Dentre os ativos que possui ocorrência expressiva em várias espécies vegetais nativas ou cultivadas no bioma caatinga e com elevada quantidade de efeitos farmacológicos relacionados, podem ser citadas as cumarinas (CALIXTO *et al.*, 2001; NEWMAN & GRAGG, 2016; WHO, 2011).

## 1.2. Cumarinas

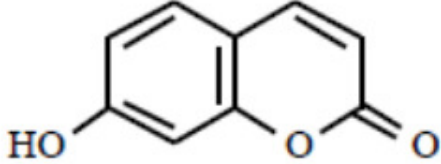
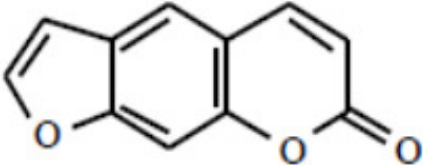
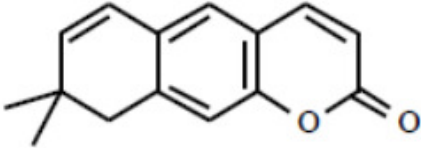
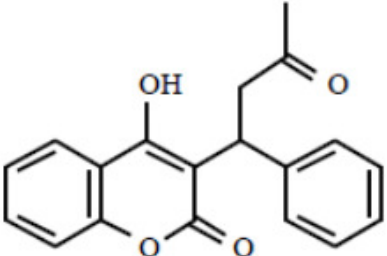
As cumarinas são constituintes naturais de muitas plantas, incluindo *Torresea cearensis* Fr. All. (*Amburana cearensis* A.C.Smith), *Justicia pectoralis* Jacq., *Eclipta alba* Hassk., *Pterodon polygaliflorus* Benth. e *Hybanthus ipecacuanha* Oken. O termo cumarina deriva da planta *Coumarouna odorata*, ou *Dipreryx odorata*, da qual foi isolada e purificada pela primeira vez em 1822 por Voleg. A primeira síntese química da molécula foi descrita em 1868 por Perkins, desde então, uma riqueza de informações tem sido gerada sobre suas propriedades e usos potenciais.

Mais de 1300 cumarinas já foram identificadas, majoritariamente como metabólitos secundários de 150 espécies de plantas pertencentes a 30 famílias diferentes, mas encontradas também em bactérias e fungos (MURRAY *et al.*, 1982; EGAN *et al.*, 1990;

BOURGAUD *et al.*, 2006; BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE - BVS, 2020). Essas substâncias fazem parte de um grupo maior de compostos, os benzopiranos, que tem anéis de benzeno fundidos a uma lactona (EGAN *et al.*, 1990). Com base nas substituições nos anéis benzeno e lactona, podem ser classificadas quimicamente em quatro grupos: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas e cumarinas substituídas no anel de lactona (Tabela 1).

As cumarinas e seus derivados exibem uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, despertando um interesse considerável devido a seus potenciais efeitos benéficos na saúde humana. Sabe-se que altos níveis de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO) podem contribuir para o desenvolvimento de doenças multifatoriais. Assim, julga-se que as várias aplicações farmacoterapêuticas tem origem no grande poder antioxidante desses compostos, pois conseguem inibir o stress oxidativo celular, juntamente com outros possíveis mecanismos. Esse poder antioxidante está diretamente relacionado com os tipos de grupos substituintes no anel benzênico, e com as posições de substituição (BUBOLS *et al.*, 2013). Algumas das atividades farmacológicas atribuídas as cumarina e seus derivados estão descritas na tabela 2.

**Tabela 1 - Classificação química das Cumarinas.**

Classificação	Exemplo
Cumarinas Simples: Hidroxilado ou alquilado no anel benzeno.	7 – Hidroxicumarina 
Furanocumarinas: Anel de furano de cinco membros ligado ao anel de benzeno.	Psoraleno 
Piranocumarinas: Anel de lactona de 6 membros ligado ao anel de benzeno.	Xantiletina 
Cumarinas substituídas no anel de lactona: Substituição no anel de lactona, maioritariamente nas posições C – 3 ou C – 4.	Varfarina 

---

Fonte: adaptada LACY & KENNEDY, 2004

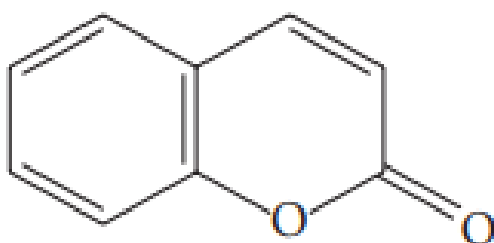


**Tabela 2 - Atividades farmacológicas de cumarinas e seus derivados.**

<b>Atividade farmacológica</b>	<b>Referências</b>
Antinociceptiva	SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2016; FIGUEREDO <i>et al.</i> , 2013; GHATE <i>et al.</i> , 2005
Antiadipogênica	SHIN <i>et al.</i> , 2010
Antibacteriana	CHAKTHONG <i>et al.</i> , 2012; BASILE <i>et al.</i> , 2009
Anticâncer	THAKUR <i>et al.</i> , 2020; KANG <i>et al.</i> , 2016; MARSHALL <i>et al.</i> , 1994
Anticoagulante	HOU <i>et al.</i> , 2020; POOLE & POOLE, 1994
Anticonvulsivante	WANG <i>et al.</i> , 2009
Antifúngico	HU <i>et al.</i> , 2017
Antihiperlipidêmico	WITACENIS <i>et al.</i> , 2010
Anti-inflamatório	ZHANG <i>et al.</i> , 2019; SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2016; FIGUEREDO <i>et al.</i> , 2013; WITACENIS <i>et al.</i> , 2010; GHATE <i>et al.</i> , 2005; LEAL <i>et al.</i> , 2003; LEAL <i>et al.</i> , 2000; LEAL <i>et al.</i> , 1997; MARSHALL <i>et al.</i> , 1994
Antinociceptivo	LEAL <i>et al.</i> , 2000
Antioxidante	BUBOLS <i>et al.</i> , 2013; BASILE <i>et al.</i> , 2009; PAYÁ <i>et al.</i> , 1994; PAYÁ <i>et al.</i> , 1992
Antidermatites	SUN <i>et al.</i> , 2018
Antiviral	NEWMAN <i>et al.</i> , 1998; MCKEE <i>et al.</i> , 1996; PATIL <i>et al.</i> , 1993; KASHMAN <i>et al.</i> , 1992
Broncodilatador	FIGUEREDO <i>et al.</i> , 2013; LEAL <i>et al.</i> , 2000
Hipotensora	HOULT & PAYÁ; 1996
Imunomoduladora	ISMAIL <i>et al.</i> , 2016
Inibição do citocromo P450	BOURGAUD <i>et al.</i> , 2006; KHARASCH <i>et al.</i> , 2000
Inibição de TNF- $\alpha$	CHENG <i>et al.</i> , 2004
Neuroprotetor	KANG <i>et al.</i> , 2005
Leishmanicida	BRAVO <i>et al.</i> , 1999
Relaxante muscular	LEAL <i>et al.</i> , 2003; NEUHAUS-CARLISLE <i>et al.</i> , 1997
Tratamento de linfedemas	GARRARD, 2014; CASLEY-SMITH & JAMAL, 1993; CLODIUS & PILLER, 1982

O representante mais simples dessa classe é chamado de cumarina (CM) e trata-se da 1,2-benzopirona (Figura 3), um composto orgânico heterocíclico que, em temperatura ambiente, se apresenta como sólido branco cristalino (BURFIELF, 2008; GARRARD, 2014). Possui odor característico semelhante ao de baunilha, ponto de fusão entre 68 e 70°C, ponto de ebulição entre 297°C – 299°C e massa molecular de 146,15 g/mol. É volátil e levemente solúvel em água, sendo livremente solúvel em álcool, cloroformio, éter dietílico e em óleos (LAKE, 1999; RODRIGUES, 2005).

**Figura 3 - Estrutura química da cumarina.**



Fonte: VENUGOPALA *et al.*, 2013.

Devido ao uso em alta escala em cosméticos e alimentos, a toxicidade da CM foi estudada pelo FDA (Food and Drug Administration) e foram observados efeitos carcinogênicos e nefropáticos em camundongos (SOUZA, 2005). No entanto, existem diferenças marcantes no metabolismo desta molécula entre as espécies, o que resulta em diferença na toxicidade. Em seres humanos a exposição diária máxima de fontes alimentares e produtos cosméticos foi calculada em 0,06 mg/kg/dia, e não foram relatados efeitos adversos em espécies suscetíveis a doses até 100 vezes superiores a esse valor, proporcionando uma margem de segurança aceitável e permitindo concluir que essas fontes não devem representar risco à saúde (LAKE, 1999).

Comprimidos de liberação prolongada e cremes contendo CM associada a troxerrutina (heparina) já estão disponíveis no mercado para tratamento de varizes, hemorróidas e profilaxia de trombose pré e pós-operatório e na gravidez, graças ao efeito anti-agregante plaquetário (CHAVES *et al.*, 2010).

Em estudo *in vitro*, CM apresentou atividade leishmanicida contra promastigostas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* na concentração de 50 mg/ml (BRAVO *et al.*, 1999). Luchini *et al.* (2008) demonstraram a atividade anti-inflamatória da CM (5 mg/kg) em modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) em intestinos de

ratos e associou parte desse efeito a uma melhora no estresse oxidativo intestinal graças a inibição da depleção da glutathiona. Esses efeitos farmacológicos, e a imunomodulação apresentada por outras cumarinas (ISMAIL *et al.*, 2016), tornam essa molécula promissora para desenvolvimento de um fármaco com efeito leishmanicida.

Considerando as propriedades já descritas da CM, a baixa solubilidade em água dessa molécula representa um desafio comum para as indústrias que estão desenvolvendo novos produtos farmacêuticos, uma vez que 40% das substâncias ativas identificadas são insolúveis ou pouco solúveis em meios aquosos. Por isso, nos últimos 10 anos, os processos de engenharia de nanopartículas foram desenvolvidos para o aprimoramento da solubilidade de medicamentos com essas características. Outro desafio para desenvolvimento de medicamento a base de CM é seu metabolismo e absorção rápidos (SAHARAN *et al.*, 2019; RODRIGUES, 2005). Dessa maneira, a sua incorporação em um sistema que possa reduzir sua volatilidade, aumentando sua estabilidade física e que possa controlar sua liberação, evitando que toda a cumarina seja metabolizada rapidamente, torna-se um ponto chave para o desenvolvimento de produtos estáveis com farmacocinética melhorada.

### **1.3. Nanotecnologia Farmacêutica**

O primeiro conceito de nanotecnologia surgiu em 1959 quando o físico Richard Feynman sugeriu que os átomos poderiam ser organizados conforme a necessidade, sem violar as leis da natureza. Fazendo isso, novas propriedades poderiam ser agregadas a materiais e novos materiais poderiam ser criados (KEIPER, 2003). A nanotecnologia possibilita compreender e manipular a matéria em seus níveis mais fundamentais daí o interesse crescente. Muitas aplicações inovadoras começaram a ser exploradas já que materiais podem ter propriedades completamente diferentes quanto a características ópticas, eletrônicas, magnéticas e/ou biológicas em tamanhos tão reduzidos. Ainda existem divergências quanto as dimensões máximas para que o material possa ser considerado em tamanho nanométrico, com teorias mais conservadoras apontando até 200 nm (JAIN *et al.*, 1998), enquanto outras teorias apontam até 500 nm (MATOS *et al.*, 2015) ou 800 nm (VIEIRA & GAMARRA, 2016).

Na área farmacêutica, a nanotecnologia tem sido alvo de investigações quanto ao desenvolvimento de sistemas estruturados de liberação de fármacos, sobretudo para aqueles com problemas biofarmacêuticos, como a baixa biodisponibilidade, a instabilidade química e baixa solubilidade aquosa (BEIJA *et al.*, 2012; JAIN *et al.*, 1998). A utilização de

nanocarreadores tem contribuído na vetorização e incremento da absorção de fármacos, direcionando-os até o sítio de ação e auxiliando-os a superar as limitações impostas pelas diversas barreiras biológicas presentes no organismo. Outra importante característica que pode ser agregada é o controle na liberação do fármaco, o que traz vantagens como: manutenção de níveis plasmáticos dentro da faixa terapêuticamente desejável, diminuição dos efeitos colaterais, redução da dose necessária ao tratamento e melhora do esquema posológico, o que contribui para maior adesão do paciente ao tratamento (ALONSO, 2004; BEIJA *et al.*, 2012; LANGER, 1998).

Alguns fármacos de liberação controlada já estão disponíveis no mercado e demonstram vantagens em relação às formulações convencionais. A doxorubicina lipossomal (Doxil®) foi um dos primeiros medicamentos baseados em nanotecnologia aprovados pelo FDA em 1995 para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado à AIDS (VIEIRA & GAMARRA, 2016). Em um estudo realizado em pacientes com este tipo de câncer observou-se que o encapsulamento em lipossomas limita significativamente a distribuição e a eliminação da doxorubicina, provocando um acúmulo do medicamento nas lesões de até 11,4 vezes maior quanto comparado a doxorubicina padrão, ocasionando uma maior eficácia do medicamento (NORTHFELT *et al.*, 1996). A Anfotericina B lipossomal apresenta menor toxicidade tanto aguda como crônica, pois possibilita a infusão rápida e uso seguro de doses de até 5 mg/kg/dia, além de atingir menores concentrações no rim, diminuindo a nefrotoxicidade que é alta na formulação convencional (MARTINEZ, 2006).

Outro exemplo de produto no mercado é o Abraxane®, no qual o quimioterápico paclitaxel encontra-se eficientemente associado à nanopartícula de albumina, e foi liberado pelo FDA para tratamento de câncer de mama, câncer de pulmão e câncer de pâncreas em 2005, 2012 e 2013, respectivamente (VIEIRA & GAMARRA, 2016; ASLAN *et al.*, 2013). A formulação do paclitaxel associado a essas nanopartículas difere das formulações convencionais que usam solventes potencialmente tóxicos como veículos, permitindo administração de doses mais altas, com menor tempo de infusão e sem a necessidade de pré-medicação (GRADISHAR, 2006).

As desvantagens que devem ser monitoradas e contornadas no desenvolvimento de nanosistemas são: possível toxicidade dos produtos (necessário ensaios que atestem sua biossegurança), custo elevado (dependendo do material e do processo utilizado) e estabilidade dos sistemas (JÄGER *et al.*, 2007; ABDELWAHED *et al.*, 2006a).

A leishmaniose é uma doença particularmente interessante a ser tratada com nanocarreadores, uma vez que os parasitas têm como suas células hospedeiras os macrófagos, células altamente fagocíticas. Dessa maneira, os macrófagos absorvem o nanocarreador devido ao seu tamanho reduzido, onde podem atuar diretamente sobre os parasitas (SALEEM *et al.*, 2019). Vários grupos de pesquisa (RODRIGUES *et al.*, 1994; DURAND *et al.*, 1997; TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; VAN DE VEM *et al.*, 2011) têm mostrado os benefícios da utilização da nanotecnologia como estratégia para o tratamento dessa doença e, de um modo geral, tem sido observado que ao ser incorporado a uma nanoestrutura o agente apresenta maior atividade leishmanicida quando comparado à molécula livre.

O efeito leishmanicida da primaquina foi avaliado em amastigotas de *L. donovani* e observou-se que a associação dessa molécula com nanopartículas de ácido poli-láctico (PLA) demonstrou eficácia 3,3 vezes maior quando comparado ao medicamento livre. Ainda, a dose de 30 mg administrada via intravenosa em camundongos BALB/c de primaquina nanoencapsulada foi bem tolerada e nenhum sinal de toxicidade aguda foi observado, enquanto a mesma dose do medicamento livre resultou em 15% de perda de peso (RODRIGUES *et al.*, 1994).

A incorporação de uma chalcona (2,6-di-hidroxi-4- metoxichalcona), isolada de *Piper aduncun*, em nanocápsulas de PLA (poliácido láctico) foi capaz de reduzir a carga parasitária de roedores infectados com *L. amazonensis* em até 90%, enquanto a mesma dose da biomolécula livre não apresentou atividade (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999). Em outro estudo, nanopartículas de ácido poli-lactídeo-glicolídico (PLGA) contendo  $\beta$ -easina, uma saponina isolada de *Aesculus hippocastanum* com atividade leishmanicida, foram mais efetivas tanto para formas amastigotas quanto promastigotas em modelo *ex vivo* em relação a  $\beta$ -aescina livre e não apresentou citotoxicidade frente a macrófagos (VAN DE VEM *et al.*, 2011).

A quercetina, um flavonoide amplamente distribuído no reino vegetal, apresentou relecante atividade leishmanicida *in vitro* (BISCHOFF, 2008; MUZITANO *et al.*, 2006; SILVA, MAQUIAVELI, MAGALHÃES, 2012; FONSECA-SILVA *et al.*, 2011; TASDEMIR, 2010), contudo sua baixa biodisponibilidade em humanos (1%) limita a sua utilização. Para atenuar o problema, nanopartículas lipídicas sólidas foram usadas na inclusão dessa molécula e foi verificado aumento significativo (>500%) da sua biodisponibilidade após administração oral (HOULI *et al.*, 2009). Em mais um exemplo, um estudo que avaliou a infecção causada por *L. infantum* em camundongos BALB/c tratados pela veia caudal, a dose

efetiva (DE50) da pentamidina ligada a nanopartículas de polimetacrilato mostrou-se seis vezes menor que o da pentamidina livre (0,17 mg/kg vs 1,06 mg/kg) (DURAND *et al.*, 1997).

Em suma, vários tipos de nanocarreadores de natureza lipídica (lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados) ou polimérica (micelas poliméricas, nanoesferas, nanocápsulas, etc) já foram usados para entrega eficiente de drogas aos locais alvo para o tratamento da leishmaniose (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009; SALEEM *et al.*, 2019).

#### 1.4. Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

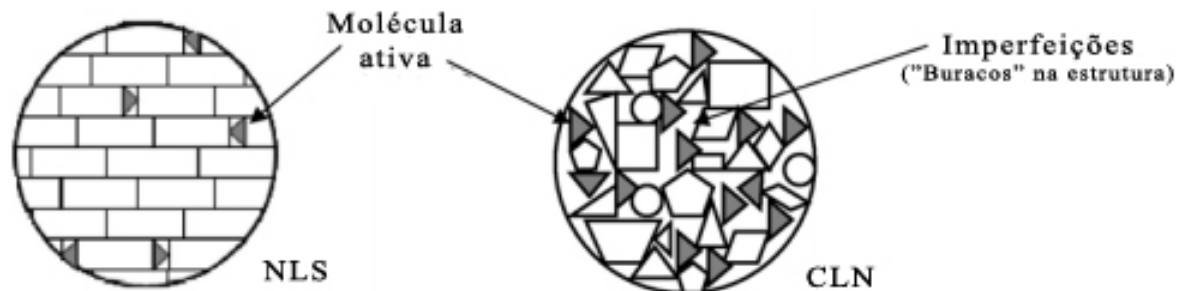
Nanopartículas sólidas à base de lipídios são uma classe relativamente nova de nanocarreadores e possuem a vantagem econômica pois são feitas de lipídeos triglicéridos cuja escala de produção é mais barata que os fosfolipídeos. O Carreador Lipídico Nanoestruturado (CLN) pertence a esta classe e é um sistema nanoestruturado com núcleo ou matriz constituído de uma combinação de lipídios que se apresentam sólidos em temperatura ambiente no qual o princípio ativo fica aprisionado. Esse nanossistema é chamado de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) de segunda geração, sendo a principal diferença existente entre os dois sistemas os excipientes utilizados para a formação da matriz lipídica, que é formada apenas por lipídios sólidos à temperatura ambiente nas NLS enquanto que a dos CLN é formada por uma combinação de lipídios líquidos e sólidos (MÜLLER *et al.*, 2002; YOUSEFI *et al.*, 2019; SALEEM *et al.*, 2019).

O emprego de lipídios líquidos na produção dos CLN traz vantagens, pois a utilização dos mesmos provoca alterações na matriz inteiramente cristalina encontrada nas NLS, gerando uma matriz com imperfeições e com maior capacidade de incorporação de ativos (Figura 4), aumentando a eficiência de encapsulação e a estabilidade do produto (MÜLLER *et al.*, 2007).

Os métodos de preparação de CLN podem ser classificados em três grupos: aqueles que usam alta energia, baixa energia ou solventes orgânicos. Os métodos que usam alta energia são aqueles que requerem a utilização de equipamentos capazes de gerar altas forças de cisalhamento para alcançar a redução do tamanho da partícula. Na homogeneização a alta pressão, um desses métodos que tem sido usado em cerca de 50% das investigações relatadas, os lipídios sólidos são mantidos a uma temperatura acima de seu ponto de fusão, onde subsequentemente, o ingrediente ativo e o lipídeo líquido são adicionados. Esta mistura fundida é adicionada a uma solução aquosa do agente de estabilização à mesma temperatura.

Posteriormente, com a ajuda de um misturador de alto cisalhamento, uma emulsão é obtida que é então homogeneizada em alta pressão (400-800 bar) por vários ciclos para obter partículas com tamanhos médios entre 50 nm e 400 nm (GORDILLO-GALEANO *et al.*, 2018).

**Figura 4 - Representação esquemática de uma Nanopartícula Lipídica Sólida e um Carreador Lipídico Nanoestruturado.**



Fonte: Adaptado de MÜLLER *et al.*, 2007. NLS - Nanopartícula Lipídica Sólida; CLN - Carreador Lipídico Nanoestruturado.

### 1.5. Nanocápsulas Poliméricas

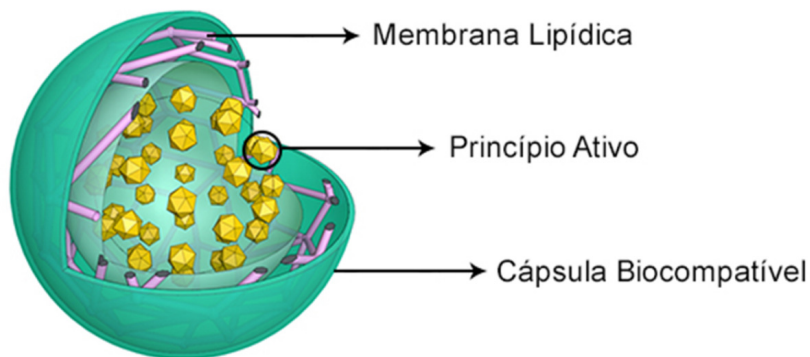
Entre as nanopartículas tradicionais, lipossomas e as nanopartículas poliméricas são especialmente viáveis contra a leishmaniose, porque são mais facilmente capturados pelo sistema fagocítico mononuclear, o que se torna uma vantagem adicional no tratamento dessa patologia (SOUTO *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2019; SALEEM *et al.*, 2019). No entanto, a parede polimérica presente nas nanopartículas é um benefício em relação aos lipossomas pois confere maior estabilidade a esse nanosistema (ABDELWAHED *et al.*, 2006b)

A nanocápsula polimérica (NC) é um sistema sólido vesicular com parede polimérica ao redor de um núcleo oleoso e surfactantes lipofílicos ou hidrofílicos na interface (Figura 5). Entre as vantagens das nanocápsulas, está o baixo conteúdo polimérico e a elevada capacidade de carregamento de fármacos lipofílicos, devido ao núcleo oleoso interno. Outro benefício de confinar o fármaco dentro de uma cavidade central é que um efeito de explosão pode ser evitado, pois o fármaco não está em contato direto com tecidos, além de o fármaco poder ser protegido de degradação durante o armazenamento e após administração, conferindo maior estabilidade à formulação farmacêutica (BENITA *et al.*, 1996; ABDELWAHED *et al.*, 2006b; BLOUZA *et al.*, 2006; MAKADIA *et al.*, 2011).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanocápsulas poliméricas, que podem ser classificados em métodos baseados na polimerização de

monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados. A preparação de nanocápsulas por deslocamento do solvente (ou nanoprecipitação) consiste na precipitação das partículas de polímero por difusão entre a fase orgânica e aquosa, especificamente, na interface das duas fases. Nesta técnica a fase orgânica, composta pelo polímero, óleo e fármaco, é adicionada sob agitação à fase aquosa contendo surfactante. O fármaco é imediatamente aprisionado ao polímero durante a precipitação produzindo nanopartículas de tamanho até 500 nm (ALONSO, 1996; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; BRASIL, 2015b).

**Figura 5 – Representação esquemática da estrutura da nanocápsula.**



Fonte: Adaptado de STEICHEN, CALDORERA-MOORE e PEPPAS, 2013.

Diante do exposto, CLN e NC parecem ser nanocarreadores adequados para resolver os problemas apresentados no desenvolvimento de medicamentos à base de compostos pouco solúveis em água como a CM, um composto orgânico de estrutura aromática solúvel em óleos e gorduras, apta para o carregamento na matriz lipídica dos CLN e no núcleo oleoso das NP.



## 2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença endêmica em mais de 102 países, transmitida por vetores e causada por mais de 30 espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* (ODDONE *et al.*, 2017). É uma doença infecciosa negligenciada que ocorre em países subdesenvolvidos entre as populações mais vulneráveis, o que restringe o acesso aos serviços de saúde. A maioria dos casos ocorre na África, Ásia e Américas, onde a alta incidência e ampla distribuição geográfica é um desafio para os programas nacionais e regionais (PAHO – WHO, 2019).

Embora não haja terapias universalmente aplicáveis para a leishmaniose, algumas opções de tratamento estão disponíveis: estibogluconato de sódio, comercializado nos Estados Unidos e Europa, e o antimoniato de meglumine, utilizado na América Latina e África. No entanto, na maioria das áreas endêmicas o uso de medicamentos de primeira escolha fez surgir resistência ao tratamento e o uso de outras drogas (anfotericina B, miltefosina e pentamidina) foi adotado, mas apenas como medicamentos de segunda linha, devido a efeitos adversos excessivos e toxicidade (KALANTARI *et al.*, 2014; GALVÃO *et al.*, 2017; GHOBAKHLOO *et al.*, 2017). Esse cenário comprova a urgência de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos que possuam vantagens em relação à farmacoterapia atual para o tratamento da leishmaniose, e os ativos presentes na flora da caatinga têm-se mostrado fontes em potencial de fármacos leishmanicidas.

A cumarina – CM é uma benzopirona encontrada em diversas plantas da Caatinga, incluindo *Amburana cearensis* A.C.Smith, *Justicia pectoralis* Jacq., *Eclipta alba* Hassk. e *Pterodon polygaliflorus* Benth. É usada na clínica para tratamento de varizes, hemorróidas e profilaxia de trombose pré e pós-operatório e na gravidez. Tem comprovada ação anti-inflamatória, imunomoduladora e antiparasitária, tornando-a uma molécula interessante para o tratamento da leishmaniose (BRAVO *et al.*, 1999; VENUGOPALA *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2010). Contudo, a volatilidade e baixa solubilidade em água são desafios a serem superados na sua incorporação em uma formulação farmacêutica.

O uso de nanosistemas é uma alternativa para o aprimoramento da solubilidade de medicamentos pouco solúveis em meios aquosos, incluindo a possibilidade de acrescentar vantagens como aumentar a estabilidade e eficiência terapêutica da CM (LAKE, 1999; RODRIGUES, 2005; FERREIRA e NUNES, 2019). Estudos tem mostrado que fármacos como a primaquina, anfotericina B, chalcona e quercetina associados a nanocarreadores têm

sua ação leishmanicida melhorada devido a captação das partículas na faixa nanométrica pelos macrófagos (RODRIGUES *et al.*, 1994; ESPUELAS *et al.*, 2002; TORRES-SANTOS *et al.*, 1999; HOULI *et al.*, 2009).

Diante do exposto e considerando a fisiopatologia da Leishmaniose, onde a inflamação e o sistema imune possuem um papel importante, percebe-se a necessidade de se investir no desenvolvimento de medicamentos a partir de moléculas bioativas, como a CM, com tecnologia agregada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver nanosistema de cumarina (1,2-benzopirona) e avaliar a toxicidade e seu efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico para quantificação da cumarina no nanosistema por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos;
- Investigar dois tipos de nanosistemas - Carreador Lipídico Nanoestruturado de cumarina e Nanocápsulas poliméricas de cumarina – e realizar seleção com base em parâmetros físico-químicos (diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação) e toxicidade;
  - Avaliar estabilidade dos nanosistemas monitorando os parâmetros: diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação;
  - Investigar a toxicidade dos nanosistemas em macrófagos J774 e em camundongos;
  - Investigar o efeito leishmanicida dos nanosistemas *in vitro* em amastigotas e *in vivo* em hamster frente à *Leishmania braziliensis*.

## 4. MATERIAIS

### 4.1. Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob os protocolos 914.3261.119 (Ensaio de toxicidade aguda) e 5687261119 (Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo*).

### 4.2. Drogas, reagentes e padrões de trabalho

A CM, molécula de estudo, foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich® (EUA), pureza 99,5 %. Os adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizados no desenvolvimento da pesquisa estão listados na Tabela 3 com respectivo fornecedor. A água foi purificada por uma sequência de destilação (Destilador Tecnal®, TE 178, Brasil) e deionização (DeionizadorPermutation®, Brasil).

**Tabela 3 - Adjuvantes farmacêuticos, reagentes e substâncias químicas de referência utilizadas na pesquisa.**

<b>Adjuvantes farmacêuticos e reagentes</b>	<b>Fornecedor</b>
Acetona (PA)	Dinâmica®, Brasil
Acetonitrila (HPLC)	J.T.Baker, EUA
DMSO (dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich®, EUA
Etanol (PA)	Vetec, Brasil
Eudragit RS100	Evonik®, Alemanha
Metanol (HPLC)	Tédia; JT Baker, EUA
Metanol (PA)	Vetec, Brasil
Miglyol® 812	DEG®, Brasil
MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio)	Sigma-Aldrich®, EUA
Poloxamer® P188	Sigma-Aldrich®, EUA
Precirol® ATO5	Gattefossé®, França
Triton X-100	Sigma-Aldrich®, EUA
Twen 80	Sigma-Aldrich®, EUA

#### 4.3. Meios de cultura

**Meio Schneider** (Sigma-Aldrich, St Louis, MO): O meio Schneider foi suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF – Gibco, Grand Island, NY, E.U.A.), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). Será mencionado como Schneider suplementado o meio contendo os componentes conforme descrito acima e como Schneider aquele utilizado sem suplementos.

**Meio RPMI 1640** (Sigma-Aldrich): Suplementado com 20% de SBF, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina). Será mencionado como RPMI suplementado o meio contendo todos os componentes acima e como RPMI aquele utilizado sem suplementos.

**Meio McNeal, Novy & Nicolle** (N.N.N): Meio ágar sangue a 10%, foi suplementado com meio Schneider e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina).

#### 4.4. Parasitos

Promastigotas de *L. braziliensis* conhecida como THOR (MCAN/BR/98/R619), foi isolada de cão com LT e gentilmente cedida pela professora Alda Cruz da FIOCRUZ/Rio de Janeiro. Os parasitos foram cultivados *in vitro* a 25°C em tubos de ensaio com meio N.N.N. e meio Schneider suplementado. Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas até a 5ª passagem de cultivo. As promastigotas foram submetidas a três ciclos de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 3.000 RPM (875,39 RCF), por 15 min a 4°C e ajustadas com meio Schneider ou RPMI para as concentrações desejadas em cada experimento. A viabilidade dos parasitos foi analisada pela motilidade dos mesmos ao microscópio óptico.

#### 4.5. Células

**Macrófagos J774**: Os macrófagos da linhagem J774 foram obtidos no banco de células do Rio de Janeiro/BCRJ-UFRJ e, gentilmente, cedidos pela Dra Maria Jânia Teixeira do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal/ UFC. As células foram preservadas em nitrogênio líquido (criopreservação) em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino (SFB).

#### **4.6. Equipamentos**

O aparelho utilizado para a quantificação da CM foi o cromatógrafo Waters (Milford USA) modelo Alliance 2695 com detector de arranjo de diodos (DAD) modelo 2696. No preparo e caracterização do carreador lipídico nanoestruturado e das nanocápsulas poliméricas foram utilizados os seguintes equipamentos: banho-maria (modelo ALB 250C, ALBRAS<sup>®</sup>, Brasil); homogeneizador de alta pressão (modelo Nano DeBee, Bee international<sup>®</sup>, EUA); deionizador (modelo simplicity 185, MILLIPORE<sup>®</sup>, Brasil); ZetasizerNano- ZS (MalvernInstruments, UK); Pipetas automáticas (Gilson<sup>®</sup>, França); agitador magnético (modelo Mag-multi, Marte<sup>®</sup>, Brasil), balança (modelo HR200, A&D, Japão) e centrífuga (modelo Universal 320R, Hettich, Alemanha).

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Desenvolvimento e validação de método analítico

Para identificação e quantificação da CM nas Nanocápsulas de Cumarina (produzida conforme item 5.3.), foi validado método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos (CLAE – DAD) sob as condições descritas na tabela 4, conforme preconizado na resolução RE nº 166 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2017). Nesse sentido, foram determinados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade e intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

**Tabela 4 – Condições de realização das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de diodos.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Condições</b>
<b>Fluxo</b>	1 ml/min
<b>Fase móvel</b>	Metanol 30%
<b>Volume de injeção</b>	10 µl
<b>Coluna</b>	Kinetex 5v EVO C18 100A (150 x 4,6 mm, 5 µm)
<b>Pré-coluna</b>	C18
<b>Forno</b>	32 °C
<b>Comprimento de onda</b>	277 nm

**Seletividade:** A seletividade do método foi testada através da avaliação da influência das nanocápsulas (NC), objeto de estudo desse trabalho a ser descrita posteriormente, na análise do CM por CLAE - DAD. Para tanto, foram preparadas soluções de CM, Nanocápsula Branca (sem o ativo) e Nanocápsula de Cumarina, conforme detalhado a seguir.

**Solução padrão:** preparou-se uma Solução Estoque Padrão de CM (SEC) na concentração teórica de 1 mg/ml. Para isso, 10,7 mg de CM padrão foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 ml com 2 ml de acetonitrila para completa solubilização do analito e o volume completado com água ultra pura. Posteriormente, foram transferidos 500 µl da SEC para Balão Volumétrico (BV) 10 ml, acrescentando dois ml de acetonitrila e o volume completado com água ultra pura, obtendo uma solução padrão de 53,5 µg/ml.

*Solução de Nanocápsula Branca (NCB):* foi preparada transferindo-se 500 µl de NCB para BV 10 ml. Adicionaram-se 2 ml de acetonitrila e agitou-se para completa dissolução da NCB. O volume foi completado com água ultra pura.

*Solução de Nanocápsula de Cumarina (NCC):* foi preparada semelhante a solução de NCB, descrita no item anterior.

Foi realizada a determinação da pureza de pico com auxílio do programa Empower 2® empregando para análise faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm e "threshold" calculado com ruído (calculado entre 0.1-0.6 min) mais a influência do solvente (ajustado como 0,125°).

***Linearidade e intervalo:*** A linearidade pode ser definida como a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para realização do ensaio de linearidade, uma SEC foi preparada conforme descrito anteriormente e utilizada para obtenção de cinco soluções mais diluídas com concentrações de 10,7; 32,1; 53,5; 74,9; 96,3 e 107 µg/ml, contemplando o intervalo de 20 – 200% (considerando 50 µg/ml de CM como 100%). As soluções foram preparadas em duplicata, em três dias seguidos. A linearidade da média das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas pela concentração de CM foi estimada pelo método dos mínimos quadrados. Também foi realizada a análise de resíduos dos resultados obtidos para as concentrações citadas.

***Precisão:*** A precisão foi avaliada através do cálculo do DPR (Desvio padrão relativo) de seis determinações da formulação de nanocápsulas contendo CM. As soluções foram preparadas transferindo-se 500 µl das NCC para balão volumétrico de 10 ml, tendo uma concentração teórica aproximada de 50 µg/ml. A precisão foi avaliada pela repetibilidade do resultado das seis determinações da amostra de NCC e pela precisão intermediária através da análise do resultado de seis determinações da amostra de NCC de dois dias e dois analistas diferentes (BRASIL - ANVISA, 2017; ICH, 2014). Os resultados são expressos pelo DPR das seis análises.

***Exatidão:*** Para o ensaio de exatidão, foi avaliada a recuperação através da adição de solução padrão de CM em concentrações conhecidas em amostras de NCB. Sendo avaliadas três concentrações em triplicata contemplando o intervalo linear do método (10,7; 53,5 e 107 µg/ml). Os valores de recuperação foram calculados conforme a equação 1 e expressos em porcentagem.



$$R (\%) = \frac{C_{exp}}{C_{teórica}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: R (%) é o percentual de recuperação do CM; C exp é a concentração de CM encontrada experimentalmente; C teórica é a concentração de CM teoricamente adicionada à solução de nanocápsulas.

**Robustez:** A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal. A robustez do método foi avaliada através de um planejamento experimental  $2^2$  empregando delineamento composto central rotacional (DCCR) avaliando o efeito de duas variáveis independentes, incluindo quatro pontos axiais e três repetições no ponto central resultando em 11 ensaios. Os fatores considerados críticos foram o fluxo (x1) e a composição da fase móvel (x2) e os níveis selecionados encontram-se na Tabela 5. As amostras foram preparadas a partir das nanocápsulas como descrito no item Precisão, exceto pelas variações estabelecidas e já descritas na Tabela 5. Os resultados foram expressos como percentual de CM encontrado para as diferentes condições testadas em relação a concentração de CM encontrada na formulação determinada em condições nominais.

**Tabela 5 - Planejamento Fatorial  $2^2$  aplicado na avaliação da robustez do método analítico para determinação de cumarina em Nanocápsulas de cumarina.**

Ensaio	Fluxo (ml/mim)	MeOH (%)
1	0,46	13,5
2	1,14	13,5
3	0,46	46,5
4	1,14	46,5
5	0,32	30
6	1,22	30
7	0,8	6,67
8	0,8	53,33
9	0,8	30
10	0,8	30
11	0,8	30

## 5.2. Desenvolvimento de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de cumarina

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de cumarina (CLNC) foram preparados por meio da técnica de homogeneização em alta pressão a quente, uma das mais utilizadas na produção destes carreadores (FANG *et al.*, 2013). Seguindo a técnica, a fase lipídica contendo o lipídio sólido (Precirol ATO5), o lipídio líquido (Miglyol® 812) e o fármaco (CM) foram aquecidos a uma temperatura de 85°C e agitação magnética constante (300 rpm) até a completa dissolução. Em seguida, a fase aquosa constituída de água ultrapura (37,58 g) e tensoativo (Poloxamer 188) foi aquecida à mesma temperatura (85°C) e vertida sobre a fase oleosa, ainda sob aquecimento e agitação. A temperatura, escolhida de modo que todos os componentes do carreador estejam líquidos na mistura das fases, é superior em 15°C à temperatura de fusão da CM (componente do carreador com mais alta temperatura de fusão). A suspensão obtida foi então levada ao homogeneizador de alta pressão no qual foi submetida a cinco ciclos de homogeneização e então acondicionada em frasco vedado em geladeira ( $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Em relação à concentração da fase lipídica, foram preparadas duas suspensões (5 e 10% de fase lipídica – Tabela 6) e uma alíquota de amostra foi coletada nos ciclos 1, 3 e 5 de cada formulação para análise posterior. Ainda uma formulação branca (CLNB) foi preparada de modo semelhante sem a adição do fármaco para fins de comparação.

**Tabela 6 – Quantidade de excipientes usados no preparo dos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de cumarina.**

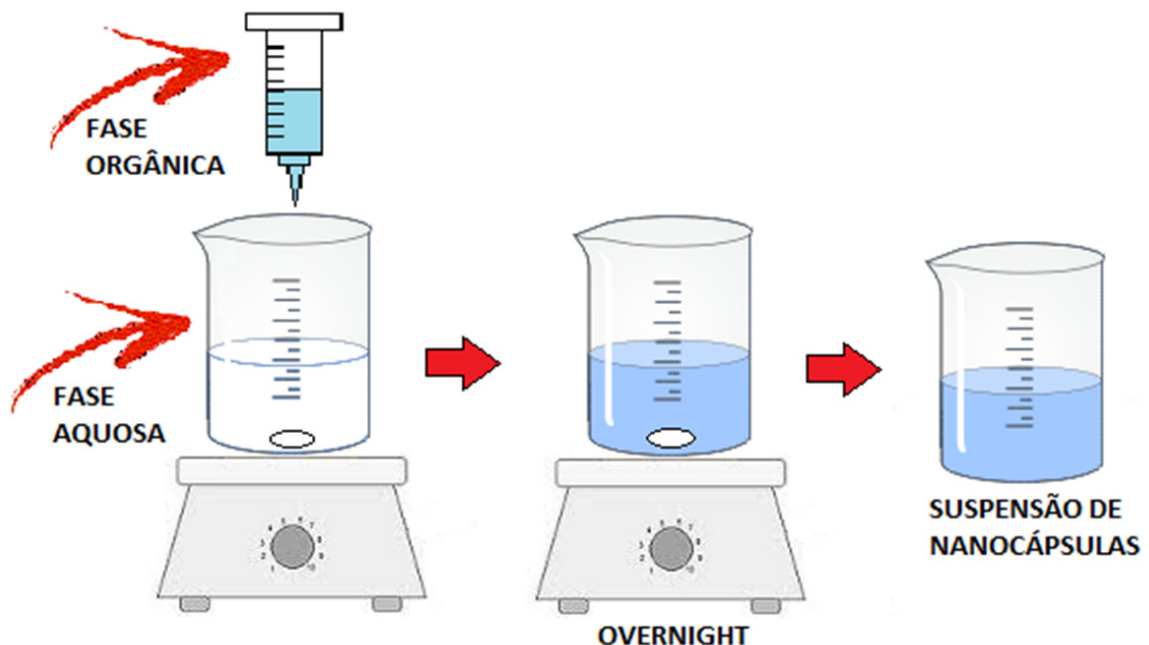
FORMULAÇÃO	PRECIROL (g)	MIGLYOL (g)	CUMARINA (mg)	POLOXAMER (mg)
CLNC 5%	1	1	20	400
CLNB 5%	1	1	-	400
CLNC 10%	2	2	40	800
CLNB 10%	2	2	-	800

## 5.3. Desenvolvimento de Nanocápsulas de cumarina

A preparação das Nanocápsulas de cumarina (NCC) foi realizada pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, seguido do deslocamento do solvente, método também conhecido como nanoprecipitação, descrito anteriormente por Fessi *et al.*, (1989). Neste caso, a fase orgânica contendo o polímero (Eudragit RS 100® - 40 mg), o óleo

(Miglyol<sup>®</sup> 812 - 64 mg) e o fármaco (CM - 10mg) dissolvidos em 5,6 ml de acetona, foi vertida, com auxílio de uma seringa, sobre a fase aquosa (10 ml) contendo tensoativo (tween 80 - 30,8 mg) sob agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida, o solvente orgânico foi removido deixando a preparação a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) *overnight* (Figura 6). A suspensão de nanocápsulas contendo o fármaco foi acondicionada em frasco de vidro e mantida em geladeira ( $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Uma formulação sem adição de ativo (formulação branco - NCB) foi preparada de modo semelhante sem a adição do fármaco na fase orgânica para fins de comparação.

**Figura 6 – Desenho esquemático para produção de Nanocápsulas de cumarina.**



Fonte: Elaborado pela autora.

#### 5.4. Caracterização de CLNC e NCC

As formulações foram caracterizadas quanto à análise macroscópica (AM), diâmetro (D), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ), teor de ativo (TA) e eficiência de encapsulação (EE).

**Avaliação macroscópica:** Foi realizada a avaliação organoléptica das formulações onde características como aparência geral da formulação, coloração e presença de sinais de instabilidade como cremeação, precipitação ou separação de fases foram observadas.

**Distribuição do Tamanho e índice de polidispersão:** A análise do D das partículas e o IPD das amostras foram determinados por espectroscopia de correlação de

fótons, utilizando um equipamento Zetasizer Nano- ZS (MalvernInstruments®, UK). Esse equipamento usa um feixe de luz sobre a amostra e a intensidade da luz espalhada oscila a um ritmo dependente do diâmetro das partículas que constituem o sistema fluido tornando possível a determinação do mesmo. O IPD, calculado pelo próprio aparelho, indica o grau de homogeneidade do diâmetro das partículas (PATTY e FRISKEN, 2006).

Para realização das análises, foi feita a diluição da formulação (1:100) em água ultrapura. As medidas foram efetuadas à uma temperatura de 25°C, utilizando-se um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 90°. Os valores obtidos foram calculados como à média  $\pm$  desvio padrão de três medidas de cada formulação.

**Potencial zeta:** O PZ foi determinado seguindo-se o protocolo experimental semelhante ao descrito anteriormente. Entretanto, o equipamento foi ajustado para módulo de obtenção de potencial de membrana. Todas as medidas foram realizadas com n estatístico igual a 3, sendo os resultados avaliados por um teste algorítmico do próprio software da Malvern a fim de aprovação e adequação dentro dos critérios do equipamento (MALVERN, 2013; PATTY & FRISKEN, 2006).

**Teor de Ativo das NCC:** O TA foi realizado por CLAE-DAD, através de método previamente desenvolvido e validado nesse estudo. Quinhentos microlitros das suspensões de nanocápsulas foram diluídos em 2 ml de acetonitrila em BV 10 ml, completando o volume com água ultrapura. Os resultados foram expressos como percentual da concentração de CM adicionada a suspensão no início da preparação.

**Eficiência de Encapsulação das NCC:** A EE visa determinar a concentração do fármaco associado intimamente à nanopartícula em relação ao total de fármaco adicionado à preparação. A técnica de separação da parte livre e da encapsulada utilizada foi a ultrafiltração-centrifugação (MARCHAL-HEUSSLER *et al.*, 1990). Alíquotas de dois ml da suspensão de nanocápsulas foram adicionadas ao sistema de ultrafiltração da Microcon (10.000 Da, Millipore) e submetido à centrifugação (10.000 RPM = 9726,56 RCF) por 15 min à 25 °C. As nanocápsulas ficaram retidas no filtro enquanto a CM livre na suspensão foi filtrada, passando para o ultrafiltrado. Mil microlitros deste ultrafiltrado foi retirado e diluídos em 2 ml de acetonitrila em BV 10 ml, completando o volume com água ultrapura. Em seguida foi realizado o doseamento da CM conforme descrito anteriormente por CLAE-DAD. A determinação do fármaco total foi realizada conforme descrito no item “Teor das nanocápsulas de Cumarina”. A Eficiência de encapsulação (EE) foi determinada empregando-se a equação 02 (Eq. 02).

$$EE (\%) = \frac{CT-CL}{CT} \times 100 \text{ (Eq. 02)}$$

Onde: EE (%) é a eficiência de encapsulação, em porcentagem; CT é a concentração total de CM na formulação de NC; CL é a concentração de CM no filtrado, equivalente a CM livre.

### 5.5. Otimização da formulação de NCC

A partir da formulação piloto, foi desenvolvido um estudo visando reduzir custos e incrementar as características físicas e químicas da NCC. Para tanto, foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  empregando DCCR resultando em 17 formulações (Tabela 7).

**Tabela 7 - Delineamento composto central rotacional (DCCR -  $2^3$ ) aplicado ao processo de produção das Nanocápsulas de cumarina.**

FORMULAÇÃO	EUDRAGIT (mg)	MIGLYOL (mg)	TWEEN 80 (mg)
NCC 1	40	64	30
NCC 2	80	64	30
NCC 3	40	128	30
NCC 4	80	128	30
NCC 5	40	64	60
NCC 6	80	64	60
NCC 7	40	128	60
NCC 8	80	128	60
NCC 9	26,36	96	45
NCC 10	93,64	96	45
NCC 11	60	42,18	45
NCC 12	60	149,82	45
NCC 13	60	96	19,77
NCC 14	60	96	70,23
NCC 15	60	96	45
NCC 16	60	96	45
NCC 17	60	96	45

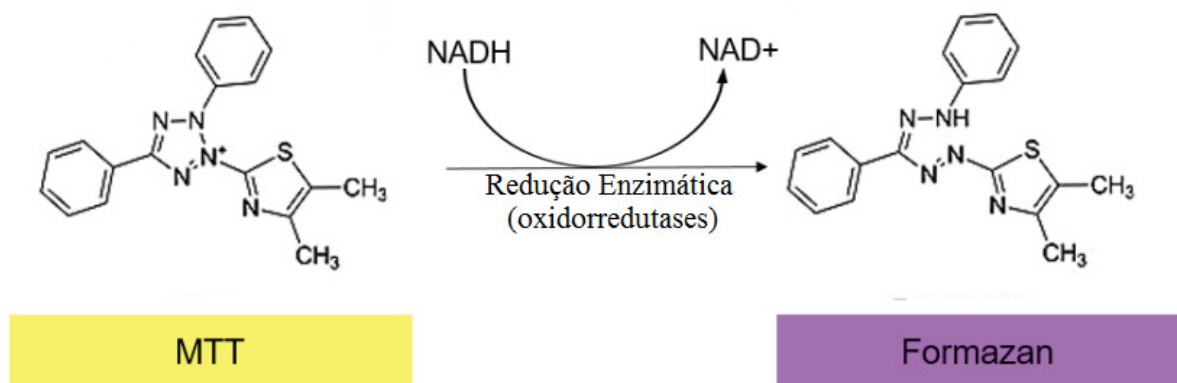
NCC = Nanocápsulas de cumarina.

Nesse contexto, com base na natureza química do ativo (CM) e em estudos prévios (STANGARLIN, 2014; SOUZA *et al.*, 2012), foi investigada a influência de três fatores nas características: quantidade de polímero/Eudragit, de óleo/ Miglyol e de tensoativo/Tween 80) empregando como resposta o D, IPD, PZ, TA e EE conforme metodologia descrita anteriormente. No preparo das nanocápsulas poliméricas mantiveram-se fixos os volumes de água (10 ml) e acetona (5,6 ml) e a quantidade de ativo (10 mg de CM).

### 5.6. Avaliação da citotoxicidade do CLNC e NCC em macrófagos J774

A avaliação da citotoxicidade das células se deu pelo ensaio do MTT, um método colorimétrico que quantifica de forma indireta o número de células viáveis, baseando-se na atividade das desidrogenases mitocondriais que convertem o sal amarelo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazan (composto de coloração púrpura e insolúvel em água) (Figura 7). A ausência da redução do MTT é indicativa de diminuição da atividade metabólica celular, ou seja, da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

**Figura 7 – Reação de redução do MTT.**



Fonte: adaptado de RIBEIRO et al 2014. MTT = Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio.

**Macrófagos J774:** Macrófagos foram adicionados em placas de 96 poços ( $5 \times 10^5$  células/ml; 180  $\mu$ l/ poço) com soluções controle (DMSO 10% - padrão citotóxico; RPMI suplementado- células não tratadas; NCB – veículo do NCC ou CLNB – veículo do CLNC) e NCC (10, 25, 50 e 100  $\mu$ g/ml) ou CLNC (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu$ g/ml). Em seguida, foram incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 e 48 horas. Decorrido este tempo cada poço foi lavado duas vezes com 200  $\mu$ l de PBS estéril, adicionado 200  $\mu$ l de meio RPMI suplementado e as placas incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 90 minutos. Posteriormente, 100  $\mu$ l do meio de

cultura foram removidos em todos os poços e adicionados 100 µl da solução de MTT (1 mg/ml de meio), sendo a placa reincubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 4 horas. Encerrado o tempo de incubação, o meio foi removido e foram adicionados 150 µl de DMSO puro. Em seguida, a placa foi submetida a agitação pelo período de 10 min. A absorbância foi medida em leitor de microplaca em comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três dias diferentes. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual onde foi considerada 100% de viabilidade as células não tratadas.

### 5.7. Estabilidade de NCC

Para realização do estudo de estabilidade, as nanocápsulas poliméricas foram acondicionadas em frascos de vidro incolor, e mantida em geladeira ( $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Foi realizada a AM das suspensões onde a aparência geral das formulações como coloração e presença de sinais de instabilidade foram observados, além de avaliação de características físico-químicas como D, PDI, PZ, TA e EE seguindo as técnicas descritas anteriormente, nos tempos inicial (1º dia) e 30 dias após a preparação dos nanossistemas.

### 5.8. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de NCC

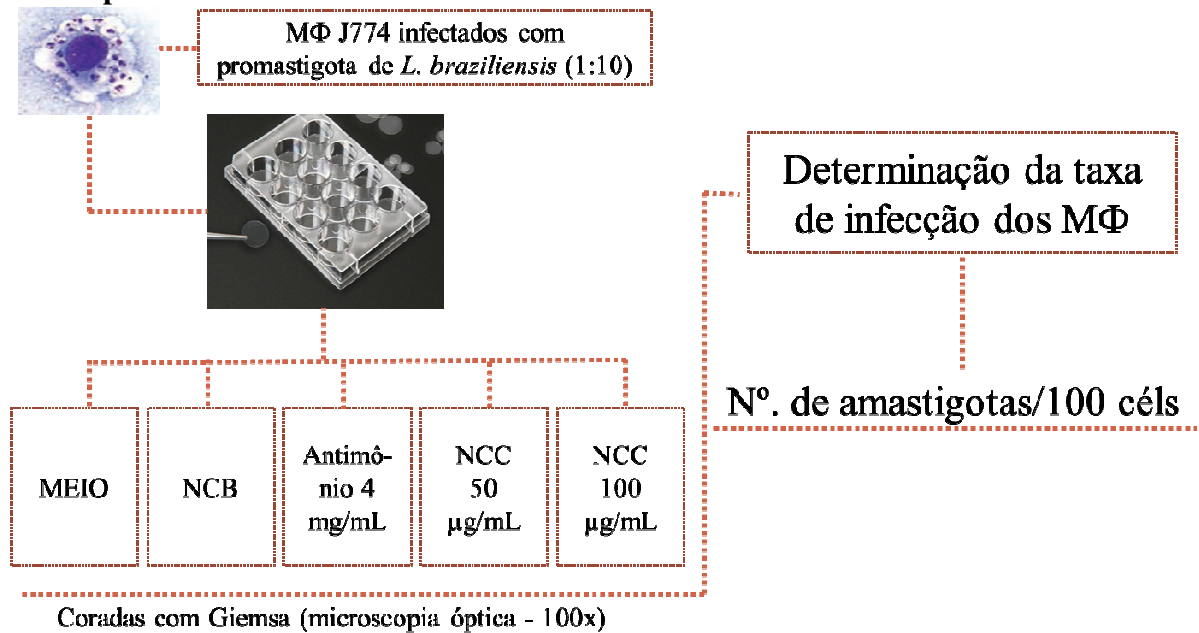
**Cultura, infecção e tratamento de macrófagos J774:** Para a realização dos ensaios *in vitro*, as células foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em garrafas estéreis de cultura celular contendo meio de cultura RPMI suplementado, em estufa de CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) a 37° C. Após atingirem a confluência, as células aderidas à superfície da garrafa de cultivo foram destacadas por meio de raspagem com “cell scraper” (TPP). A suspensão contendo as células foi coletada e centrifugada a 1500 RPM (218,85 RCF) por 15 min a 5°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspenso com RPMI suplementado, em seguida foi realizada a contagem total de macrófagos em câmara de Neubauer e o ajuste da população em meio RPMI suplementado. A suspensão de macrófagos foi distribuída em placas de 24 poços, cada poço contendo uma lamínula de vidro redonda de 23 milímetros ( $10^6$  células / lamínula).

Após 18h, as células não aderidas foram removidas por lavagem com RPMI e as células aderidas foram cultivadas com meio RPMI suplementado na ausência ou presença de *L. braziliensis* ( $10^7$  promastigotas / ml), numa proporção de 10 parasitas para 1 célula (10:1) por 24h, tempo suficiente para que ocorresse a infecção. Os parasitos extracelulares foram removidos por lavagem com RPMI (KARMAKAR *et al.*, 2011). Após esse período foi

adicionado às células RPMI suplementado (células não tratadas), Glucantime (GLU - 4 mg/ml – controle positivo) e NCC (50 e 100 µg/ml), sendo incubadas durante 24h e 48h (37<sup>o</sup> C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) (Figura 8).

**Carga parasitária em macrófago *in vitro*:** Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina, e em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscopia óptica a uma ampliação de 100x em óleo de imersão. Áreas de 100 células foram examinadas e o número de amastigotas/ 100 células foi determinado.

**Figura 8 – Desenho esquemático para ensaio da atividade leishmanicida *in vitro* de Nanocápsulas de cumarina.**



Fonte: Elaborado pela autora. MΦ = Macrófagos.

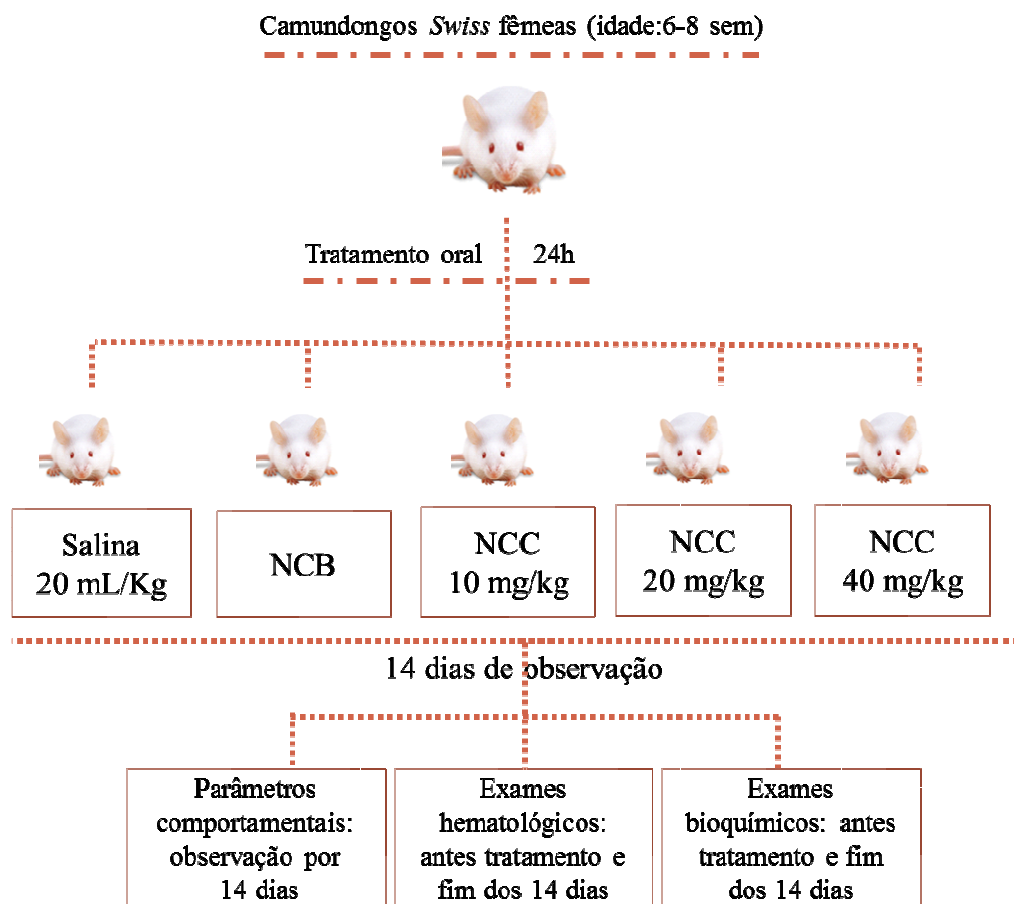
### 5.9. Avaliação da toxicidade aguda de NCC em camundongos *swiss*

O estudo toxicológico agudo (Figura 9) seguiu os padrões estabelecidos no Guia N°22/2019 da ANVISA (Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos). Grupo de camundongos *swiss* fêmeas, adultos jovens, foram tratados (6 animais/dose do produto; volume de administração: 20 ml/kg) por via oral (gavagem) durante um período não superior a 24 horas com a NCC 10, 20 e 40 mg/kg/dia animal. Dois grupos (6 animais/solução salina; volume de administração: 20 ml/kg e 6 animais/nanocápsula sem ativo – NCB; volume de administração:



20 ml/kg ) foram utilizados como controles, estando sujeitos às mesmas condições do grupo experimental. Os animais foram observados durante 14 dias quanto à ocorrência de algum sinal tóxico: mortalidade e sinais clínicos (motilidade, frequência respiratória, sedação, catatonia, ptose palpebral, resposta ao tato, diarreia, contorção, agressividade, grunhidos, ereção cauda e convulsão). O registro do peso corporal dos animais foi realizado antes do tratamento (dia 0), no sétimo e décimo quarto dia após o tratamento para observar possíveis variações.

**Figura 9 – Desenho esquemático para ensaio da toxicidade aguda de Nanocápsulas de cumarina.**



Fonte: Elaborado pela autora. sem = semanas

**Exames hematológicos e bioquímicos:** Antes e ao final do tratamento o sangue dos animais (aproximadamente 300 µl) foi coletado em ambiente asséptico através do plexo periorbital, utilizando a combinação cetamina/xilazina (90 mg de cetamina + 10 mg de xilazina, ambas /kg via IP) para realização de exames hematológicos e bioquímicos. As amostras de sangue dos animais em estudo foram coletadas em tubos vacutainer com gel separador para obtenção do soro. Foram realizados exames hematológicos: Eritrograma,

Leucograma e Plaquetas. Os exames bioquímicos foram determinados através de kits comerciais baseados em métodos enzimáticos e colorimétricos, seguindo as orientações do fabricante. Os estudos foram realizados para monitorar as funções do metabolismo dos carboidratos, lipídios, renal, hepático, cardíaco e muscular.

### **5.10. Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* de NCC**

#### ***Infecção dos animais, tratamento e acompanhamento da espessura das lesões:***

Grupos de hamsters *Mesocricetus auratus* fêmeas e machos adultos jovens foram inoculados com promastigotas de *L. braziliensis* na concentração de  $10^6$  em 10  $\mu$ l de salina estéril, na derme da orelha direita (DE MOURA *et al.*, 2005). A espessura das lesões foi mesurada a cada 5 dias com paquímetro de escala circular (Mitutoyo, Japão) por 8 semanas. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a orelha infectada e a contralateral não infectada. Após três semanas de infecção, quando as lesões começarem a aparecer (COSTA *et al.*, 2011), os animais foram divididos em grupos (4 animais/ grupo) e tratados da seguinte maneira:

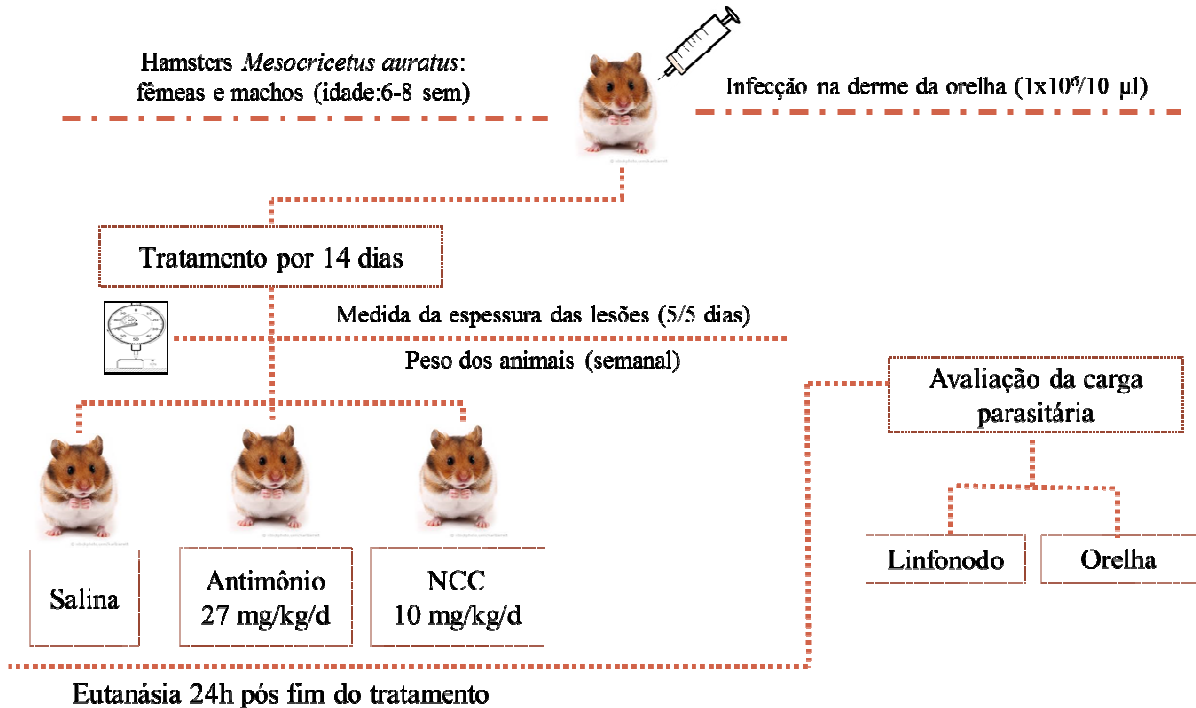
1. Grupo recebeu apenas salina (Controle infectado e não tratado);
2. Grupo tratado com GLU® (100 mg/kg/dia/I.M., correspondendo a 27mg/kg/dia de antimônio de meglumina).
3. Grupo tratado com NCC (por via oral) na concentração de 10 mg/kg/dia animal.

O tratamento foi realizado por 14 dias seguidos. No dia seguinte ao fim do tratamento, os animais foram eutanasiados para a avaliação da carga parasitária (linfonodo de drenagem e orelha) (Figura 10).

***Determinação da carga parasitária:*** Os animais foram eutanasiados utilizando inalação por halotano e o linfonodo de drenagem da lesão (retromaxilar) e a orelha infectada foram coletados de maneira asséptica para a determinação da carga parasitária, que foi quantificada através da técnica de diluição limitante (TITUS *et al.*, 1985). Brevemente, os linfonodos retromaxilares e a orelha infectada foram isolados assepticamente, macerados em 2ml de meio Schneider e deixados em repouso por 5 min. A partir dessa suspensão de células, foram feitas 8 diluições (10, 50, 100, 500,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) em Schneider suplementado (SBF 10% + urina humana estéril 2% e antibióticos). Cem microlitros destas diluições foram distribuídos em placas de 96 poços, fundo chato, 6 poços/diluição. As placas foram seladas e incubadas a 25<sup>0</sup>C, por 3 semanas, e foram observadas em microscópio óptico invertido (AusJena, Alemanha) a cada 3 dias para o registro das diluições que continham promastigotas.

O resultado da leitura das placas foi registrado no software ELIDA (TASWELL, 1984) para o cálculo final do número de parasitos presentes nas amostras utilizadas.

**Figura 10 – Desenho esquemático para ensaio da atividade leishmanicida *in vivo* de Nanocápsulas de Cumarina.**



Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.11. Análise estatística

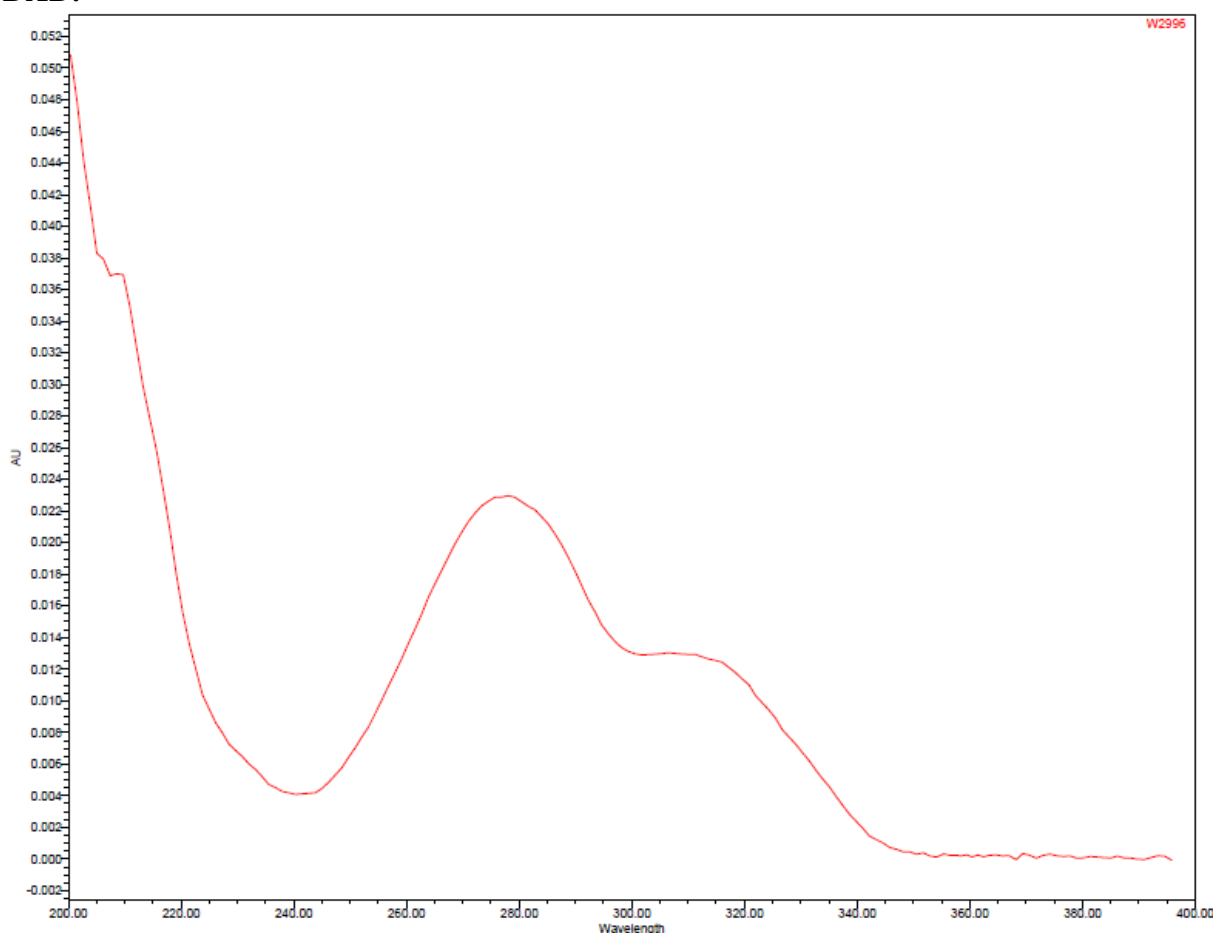
A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPadPrism versão 5.0. Em todos os testes os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey com significância mínima aceita de  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Desenvolvimento e avaliação de método analítico

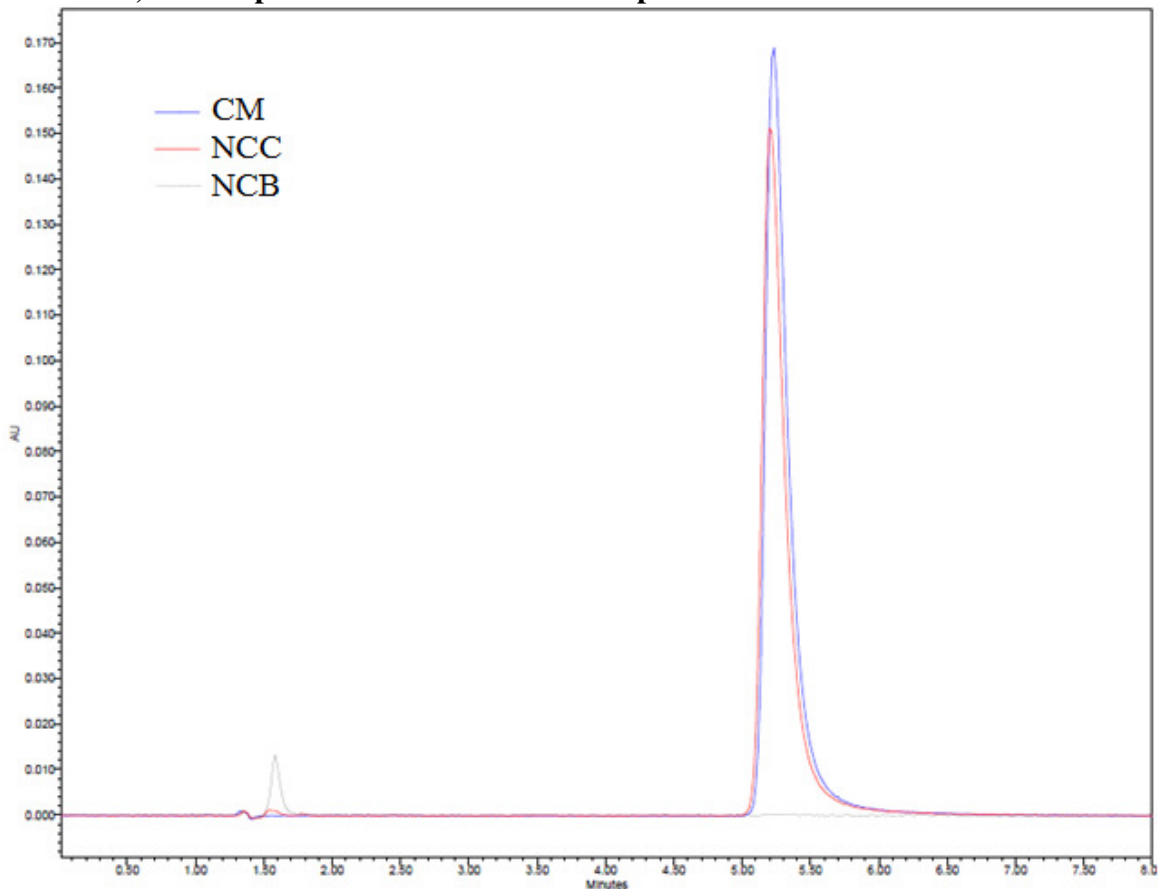
Seletividade é a capacidade do método de medir exatamente um composto na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra em análise, como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz (BRASIL, 2017; USP, 2011). A seletividade da metodologia relacionada ao teste mostrou que o método é capaz de identificar a CM em NCC no tempo de retenção de 5,6 min, confirmado pela obtenção do espectro do pico obtido (Figura 11), e a manutenção da linha de base no cromatograma de NCB nesse tempo de retenção reitera que não há interferência nessa quantificação (Figura 12).

**Figura 11 – Espectro de Varredura da cumarina de 200 à 400 nm gerado por CLAE – DAD.**



Condições: coluna C18 Kinetex® 5 v EVO (150 x 4.6 mm x 5 µm); fase móvel (metanol 30%) e eluição isocrático a 32°C; , fluxo 1 mL/min.

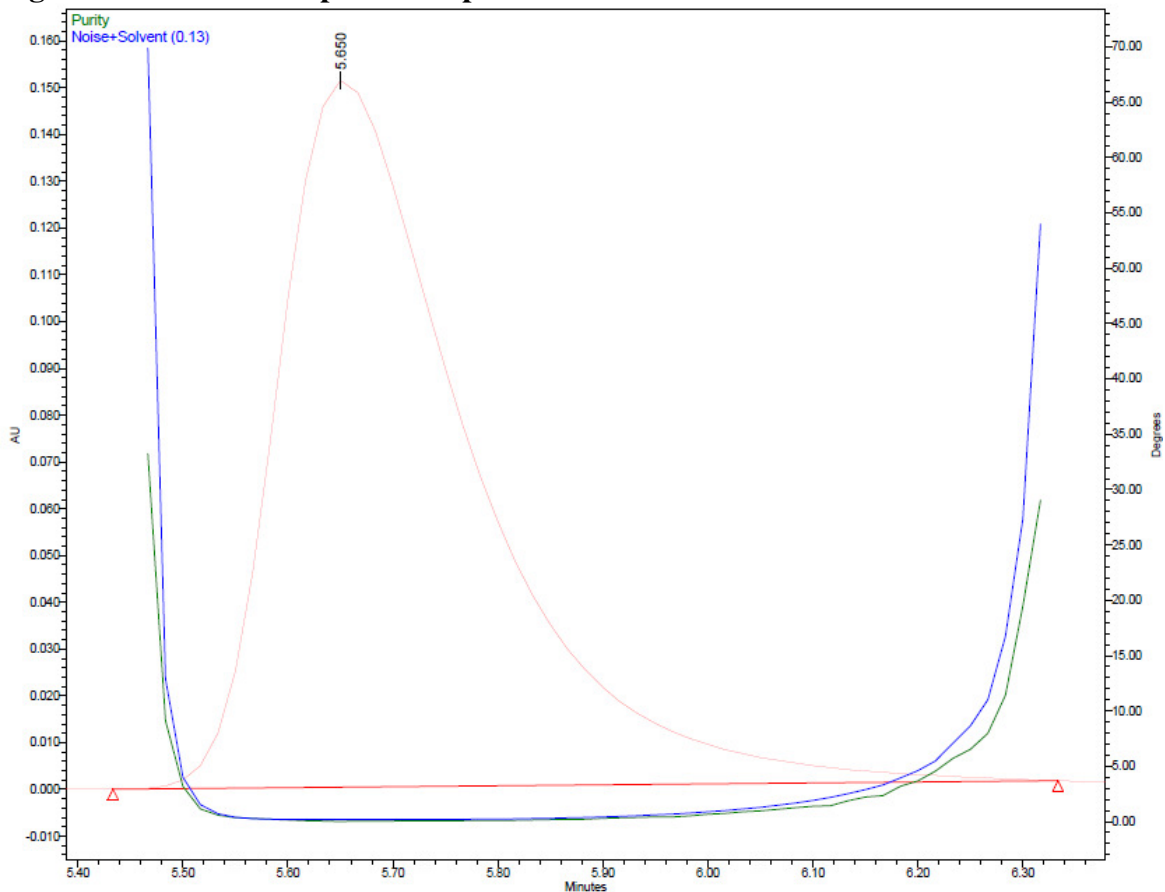
**Figura 12 – Cromatogramas gerado por CLAE – DAD em 277 nm referentes a cumarina, Nanocápsulas de cumarina e Nancápsulas branca.**



Condições: coluna C18 Kinetex® 5 v EVO (150 x 4.6 mm x 5 µm); fase móvel (metanol 30%) e eluição isocrático a 32°C; , fluxo 1 mL/min. CM = cumarina; NCC = Nanocápsulas de cumarina; NBC = Nancápsulas branca.

A ausência de um ombro ou vale no cromatograma não significa que ele esteja livre de impurezas, é possível que a resolução cromatográfica ou a concentração de impurezas seja muito baixa e, portanto, não seja “vista”. A pureza do pico, usada para indicar quando dois ou mais componentes estão presentes, analisa os espectros de absorção no pico e baseia-se na exclusividade espectral de cada composto. A presença de espectros diferentes pode indicar que mais de um composto está se acumulando ao mesmo tempo de retenção. Um pico é considerado puro se seu “purity angle” for menor que “purity threshold” (WATERS CORPORATION, 1998; GHOLAP *et al.*, 2018). A pureza do pico cromatográfico foi determinada após varredura espectrofotométrica da CM e da NCC empregando DAD. Verificou-se que o pico de CM passou nos critérios de pureza do pico (“purity angle” 0.126; “purity threshold” 0.264) e o gráfico de pureza corroboram com a especificidade do método como sendo um indicativo da não co-eluição de outros constituintes (Figura 13).

**Figura 13 – Gráfico da pureza de pico da cumarina.**



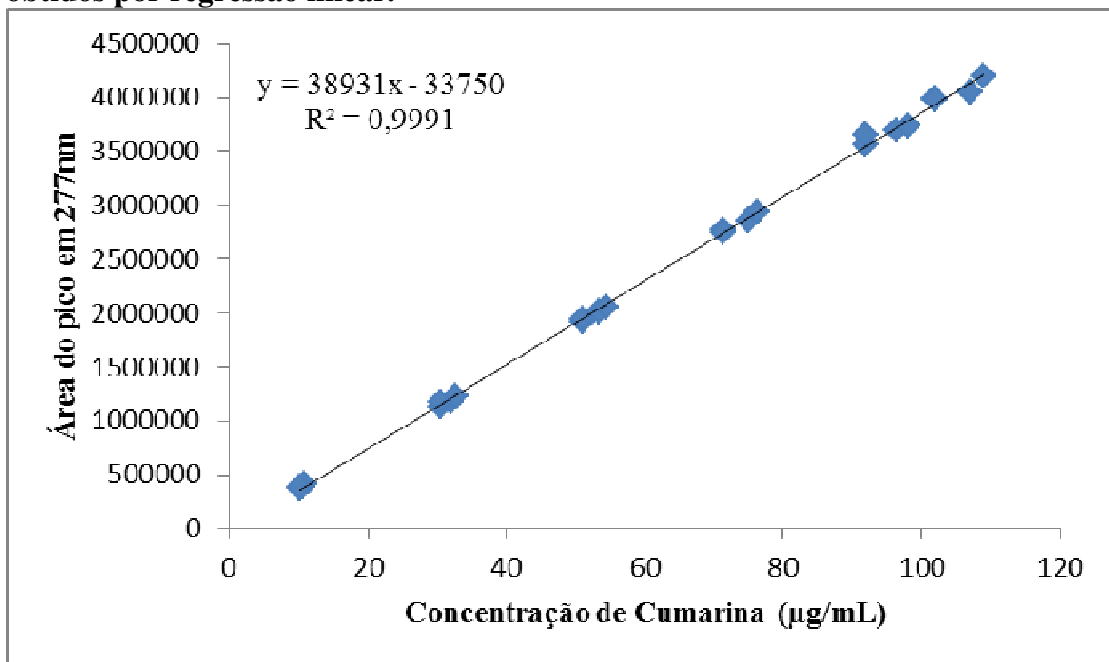
Condições: coluna C18 Kinetex® 5 v EVO (150 x 4.6 mm x 5 µm); fase móvel (metanol 30%) e eluição isocrático a 32°C; , fluxo 1 mL/min, detecção em 277 nm.

A linearidade de um método analítico deve ser demonstrada por sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra (BRASIL, 2017). A linearidade foi estudada por análise de variância, calculando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, usando uma curva composta por seis concentrações padrão de CM, mostrando que a equação da reta obtida foi do tipo  $y = a \cdot x + b$  onde a resposta instrumental (área do pico)  $y$  está linearmente relacionada à concentração da substância “ $x$ ”. A Figura 14 demonstra graficamente a curva analítica da CM e a equação correspondente  $y = 38931x - 33750$ . O coeficiente de correlação ( $R$ ) foi de 0,9996, acima do mínimo estabelecido (0,990) e, portanto, não é considerado estatisticamente diferente da unidade (MUKAKA, 2012).

O valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. A análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico permitirá detectar se a curva está bem ajustada, apresentando erros com distribuição uniforme, média zero, variação constante (homocedastidade) e ausência de amostras atípicas

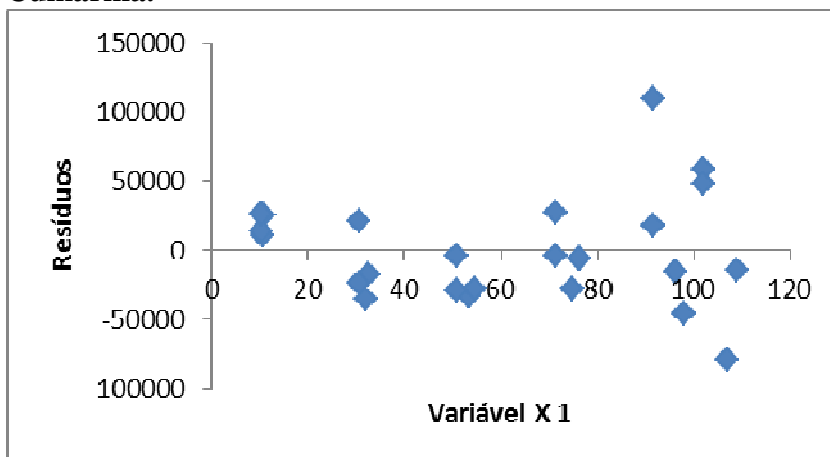
(RIBEIRO *et al.*, 2008). O gráfico de resíduos mostrou-se normal e distribuído independentemente em torno de zero, demonstrando a ausência de tendência de resíduos (Figura 15). A análise de variância (ANOVA) realizada para a curva de calibração da CM ( $P = 0,06$ ) demonstrou que o presente método não apresenta um desvio de linearidade significativo. Assim, podemos inferir que o método desenvolvido tem resposta linear ao na faixa de 10 – 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

**Figura 14 – Representação gráfica da curva de calibração da cumarina por CLAE-DAD com detecção em 277 nm e respectiva equação da reta e coeficiente de determinação obtidos por regressão linear.**



Foram preparadas 3 curvas em 3 dias seguidos, com 5 concentrações de solução padrão de cumarina (10,7 - 107  $\mu\text{g/ml}$ ) por curva. Cada ponto representa a média de uma duplicata.

**Figura 15 – Gráfico dos resíduos por tratamento estatístico da curva de calibração da Cumarina.**



O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas feitas na mesma amostra é a precisão do método analítico. A repetibilidade expressa precisão nas mesmas condições de operação em um curto período de tempo e a precisão intermediária expressa as variações no mesmo laboratório que envolvem dias diferentes, analistas diferentes e equipamentos diferentes, entre outros (BRITO *et al.*, 2003). O teste apresentou valores de DPR máximos de 0,89 e 1,86, respectivamente, para precisão por repetibilidade e intermediária (Tabela 8), valores satisfatórios e bem abaixo dos 5% estabelecidos (BRASIL, 2017).

**Tabela 8 – Avaliação da precisão (repetibilidade e intermediária) do método analítico para quantificação de cumarina nas Nanocápsulas de cumarina (CLAE-DAD).**

	Analista 1 / Dia 1	Analista 2 / Dia 1	Analista 2 / Dia 2
<b>Concentração de CM nas nanocápsulas (µg/ml)</b>	52,59	52,78	52,52
	52,35	53,46	51,12
	52,73	53,74	51,91
	53,06	53,63	51,88
	52,65	54,18	51,83
	52,09	53,73	52,17
<b>Média (µg/ml)</b>	52,58	53,59	51,91
<b>DPR (%)</b>	0,63	0,86	0,89
<b>Média geral (µg/ml)</b>		53,08 <sup>a</sup>	52,75 <sup>b</sup>
<b>DPR (%)</b>		1,23 <sup>a</sup>	1,86 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Analista 1 / Dia 1 vs Analista 2 / Dia 1; <sup>b</sup> Analista 2 / Dia 1 vs Analista 2 / Dia 2. Resultados expressos em concentração de cumarina nas NCC. Análises realizadas em sextuplicata. DPR = desvio padrão relativo. NCC = Nanocápsulas de cumarina.

A exatidão de um método analítico é definida como o grau de concordância entre os resultados individuais obtidos pelo método em estudo, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro. Para determinar a exatidão a abordagem mais apropriada deve ser usada, de acordo com a finalidade do método analítico. Para análise do produto acabado, aplica-se o método proposto na análise da quantidade conhecida do padrão adicionado à matriz e calcula-se o percentual de recuperação do analito (BRASIL, 2017). A exatidão dos resultados da análise realizada em três níveis de concentração está expressa na Tabela 9. Como pode ser visto, o método teve uma recuperação de 106,98% com DPR de 2,63 para a quantificação de cumarina no NCC.



**Tabela 9 – Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação de cumarina nas Nanocápsulas de cumarina (CLAE-DAD).**

Concentração adicionada (µg/ml)	Concentração experimental (µg/ml)	Recuperação (%)	Média (%) ± DP	DPR (%)
10,7	12,04	112,48	110,32 ± 1,88	1,71
	11,71	109,42		
	11,67	109,06		
53,5	55,92	104,53	105,91 ± 1,23	1,16
	56,87	106,30		
	57,19	106,89		
107	111,36	104,07	104,70 ± 0,55	0,53
	112,49	105,13		
	112,23	104,89		
<b>Total</b>			106,98 ± 2,81	2,63

<sup>a</sup> Analista 1 / Dia 1 vs Analista 2 / Dia 1; <sup>b</sup> Analista 2 / Dia 1 vs Analista 2 / Dia 2. Resultados expressos em concentração de cumarina nas NCC. Análises realizadas em triplicata. DP = desvio padrão. DPR = desvio padrão relativo. NCC = Nanocápsulas de cumarina.

Para avaliar a robustez do método (CLAE-DAD) na análise do teor de CM na nanocápsula, foi utilizando DCCR 2<sup>2</sup> avaliando o efeito de duas variáveis independentes: fluxo (x1) e MeOH:H<sub>2</sub>O (x2). Na Tabela 10 estão apresentadas as concentrações de CM obtidas por ensaio. Como pode ser observado as concentrações de CM estiveram entre 41 e 150,5 µg/ml. É importante observar que a variação na concentração de CM para a condição do ponto central, onde se avalia a repetibilidade das análises, foi de 63,2 a 63,4 µg/ml, ou seja, valores muito próximos, refletindo a precisão das análises.

**Tabela 10 – Avaliação da robustez do método analítico para quantificação de cumarina nas Nanocápsulas de cumarina (CLAE-DAD) através de deliamento experimental com variações no fluxo e proporção da fase móvel.**

Ensaio	x1 (ml/mim)	x2 (%)	CM (µg/ml) ± DP
1	0,46	13,5	111,9 ± 0,4
2	1,14	13,5	45,8 ± 0,4
3	0,46	46,5	113,0 ± 1,3
4	1,14	46,5	46,0 ± 0,8
5	0,32	30	150,5 ± 2,8
6	1,22	30	41,1 ± 0,8
7	0,8	6,67	65,8 ± 2,8
8	0,8	53,33	66,6 ± 0,2
9	0,8	30	63,2 ± 0,7
10	0,8	30	63,4 ± 1,2
11	0,8	30	63,4 ± 1,4

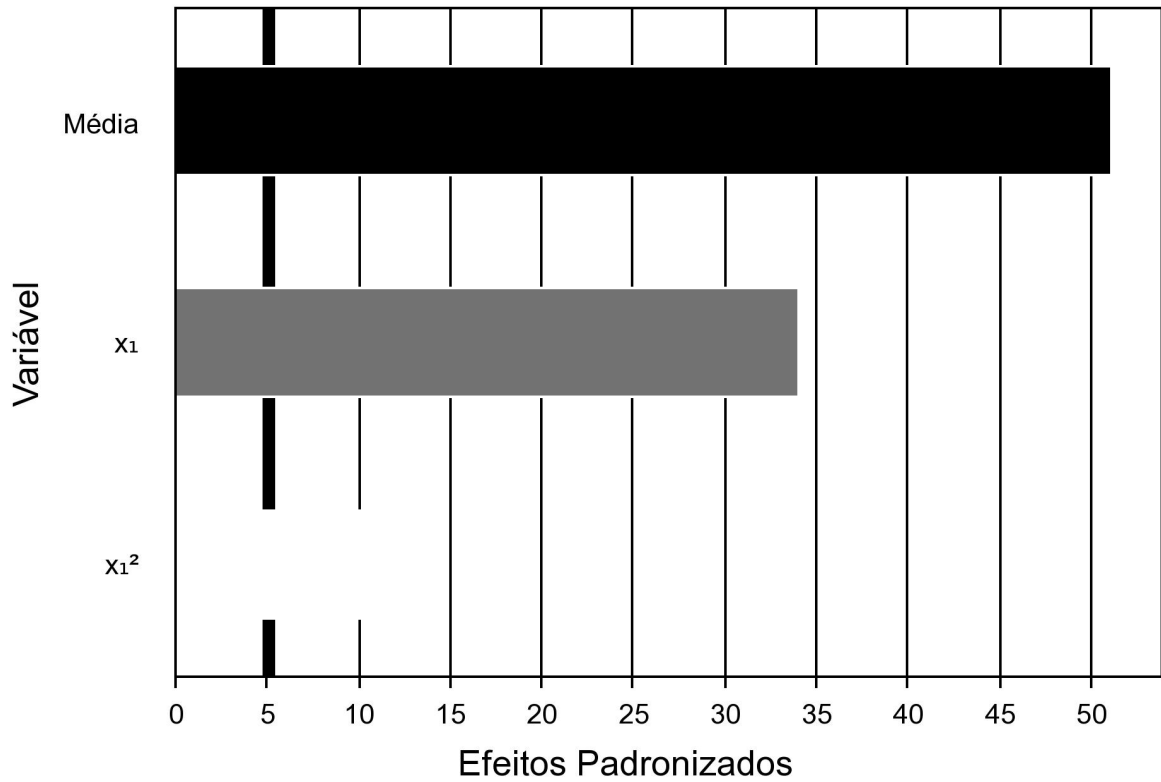
Resultados representam a média ± DP expressos em concentração de cumarina nas NCC. Análises realizadas em triplicata. x1 = fluxo da fase móvel. x2 = proporção de metanol em água. DP = desvio padrão. DPR = desvio padrão relativo. NCC = Nanocápsulas de cumarina.

A análise estatística dos dados revelou que as proporções de MeOH:H<sub>2</sub>O dentro da faixa estudada (13,5 a 53,3 %) não foram estatisticamente significativas e não afetou a concentração de CM. Por outro lado, as variações realizadas no fluxo da fase móvel afetaram significativamente a resposta (Figura 16). A diminuição do fluxo provou um alargamento na base do pico de CM no cromatograma, provocando uma variação na concentração da CM. Não houve interação entre as variáveis independentes. O modelo com as variáveis codificadas considerando os parâmetros significativos ( $p < 0,01$ ) compreendeu:

$$Y_1 = 64,25 - 35,98 x_1 + 15,49 x_1^2$$

O teste de ANOVA mostra que os resultados estão bem explicados pela regressão (99,4 %) e o F calculado foi altamente significativo (Tabela 11). Ao analisar a resposta da concentração de CM, houve correspondência de 99,4% (R<sup>2</sup>) entre valores observados versus valores previstos pelo modelo (Figura 17). Os resultados demonstraram que o método CLAE-DAD para análise de CM é sensível a variação do fluxo da fase móvel, e robusto em relação da proporção MeOH:H<sub>2</sub>O, dentro dos intervalos investigados.

**Figura 16 – Diagrama de Pareto: efeito da variável (fluxo da fase móvel) sobre a concentração da cumarina em Nanocápsulas de cumarina.**



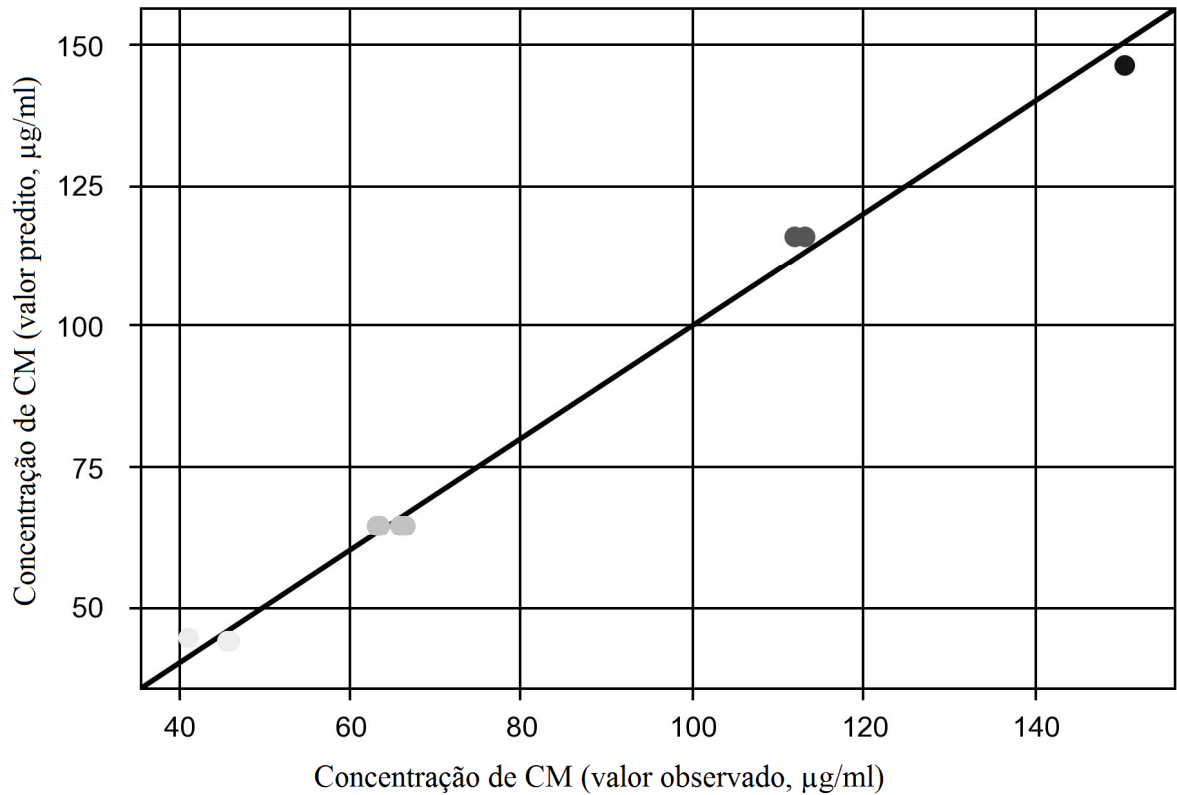
x<sub>1</sub> = fluxo da fase móvel.

**Tabela 11 – Análise de variância.**

Fonte de variação	Soma do quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F <sub>calculado</sub>	p-valor
Regressão	11837,8	2	5918,9	662,9	1,2e <sup>-9</sup>
Resíduos	71,4	8	8,9		0,0011
Total	11909,3	10			

% variação explicada (R<sup>2</sup>) = 99,4

**Figura 17 – Relação entre valores da concentração de cumarina observados versus valores previstos pelo modelo ajustado.  $R^2 = 99,4\%$ .**



CM = cumarina

## 6.2. Desenvolvimento e caracterização da formulação do CLNC

Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de Cumarina (CLNC) foram preparados pelo método de homogeneização em alta pressão a quente de maneira inédita neste estudo, sendo posteriormente caracterizados quanto ao D, IPD e PZ. Diferentes concentrações da fase lipídica foram testadas durante o processo de desenvolvimento, objetivando obter uma formulação estável e que comportasse maior quantidade de ativo. Ainda, quantidades diferentes de ciclos de homogeneização foram avaliados na tentativa de determinar o mínimo necessário para que a formulação se apresentasse estável, tendo em vista que um maior número de ciclos resulta em um maior tempo e custo de produção (WISSING *et al.*, 2004).

Na avaliação macroscópica logo após a preparação, todas as formulações do carreador lipídico mostraram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso com reflexo azulado quando produzidas, independente do ciclo (1C, 3C e 5C), concentração da fase lipídica (5 e 10%) ou presença do ativo (CLNB e CLNC). Esse aspecto é decorrente do efeito Tyndall, ou movimento browniano das partículas, que resulta da dispersão da luz incidente através do

meio, gerando um reflexo azulado característico que ocorre em suspensões coloidais com partículas em tamanho nanométrico (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Nos primeiros cinco dias após a preparação dos CLNs (armazenado em geladeira  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ ), observou-se que a formulação de CLNC 5% submetida a 1C de homogeneização e as formulações de CLNC 10% submetidas a 1C e 3C apresentaram sinais de instabilidade, caracterizada pela formação de precipitados. Assim, apenas um ciclo de homogeneização não foi suficiente para a estabilização das formulações, enquanto três ciclos também não foram suficientes para a formulação com maior porcentagem lipídica. O número de ciclos representa um fator importante para a estabilidade de formulações de CLN, algumas delas exigem uma grande quantidade de ciclos, como visto em Tang *et al.* (2013) que empregou até 15 ciclos no desenvolvimento de sua formulação, logo a obtenção de formulações estáveis com cinco ciclos é um resultado bastante favorável.

A análise do D de nanosistemas produzidos é indispensável para caracterização dos mesmos já que a definição de nanopartículas baseia-se essencialmente no seu tamanho. Em um CLN, esse parâmetro pode ser afetado por diversos fatores como método de produção, surfactante utilizado, características químicas dos lipídios e números de ciclos de homogeneização e outros (ÜNER, 2006; HAN *et al.*, 2008). No presente estudo o diâmetro das partículas dos nanocarreadores foi determinado por Espectroscopia de Correlação de Fótons, um método que mede o movimento Browniano das partículas e constitui um procedimento adequado e eficiente, além de prático já que não necessita de preparo prévio da amostra para análise, como isolamento ou secagem (ALONSO, 1996). Nos valores de D encontrados para os CLNC e CLNB (Tabela 12), podemos observar uma variação de cerca de 10% entre a amostra com maior e menor diâmetro (faixa de  $164,5 \pm 0,0$  a  $180,9 \pm 1,3$  nm). Esses valores estão de acordo com a descrição alguns autores que estipulam uma margem mais estreita (até 200 nm) para o tamanho para uma nanopartícula (JAIN *et al.*, 1998).

O IPD é o parâmetro indicativo da homogeneidade na distribuição do tamanho de partículas e valores menores que 0,2 são ideais por representarem que o diâmetro das partículas se encontra em uma estreita faixa (ALVES *et al.*, 2007). Neste estudo, os valores encontrados estão na faixa de  $0,115 \pm 0,015$  (CLNB 10% 5C) à  $0,181 \pm 0,015$  (CLNC 10% 5C) (Tabela 12). Assim pode-se concluir que o número de ciclos de homogeneização, a porcentagem de fase lipídica e a presença da CM não provocaram grandes alterações no D e IDP.

**Tabela 12 – Caracterização das formulações de CLNC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão e potencial zeta.**

<b>Formulação</b>	<b>D (nm) ± DPR</b>	<b>IPD ± DPR</b>	<b>PZ (mV) ± DPR</b>
CLNC 5% 3C	177,8 ± 0,3	0,144 ± 0,018	-37,9 ± 0,9
CLNB 5% 3C	173,1 ± 2,5	0,121 ± 0,009	-43,1 ± 2,4
CLNC 5% 5C	178,1 ± 2,2	0,132 ± 0,023	-40,7 ± 1,7
CLNB 5% 5C	164,5 ± 0,0	0,138 ± 0,027	-35,7 ± 1,0
CLNC 10% 5C	176,9 ± 2,0	0,181 ± 0,015	-39,7 ± 1,8
CLNB 10% 5C	180,9 ± 1,3	0,115 ± 0,015	-38,6 ± 3,5

Resultados representam a média ± DPR. Análises realizadas em triplicata. CLNC = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados de cumarina. CLNB = Carreadores Lipídicos Nanoestruturados branco. DPR = desvio padrão relativo. D = diâmetro. IPD = índice de polidispersão, PZ = potencial zeta.

Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com nanopartículas de Q39, uma droga antitumoral ainda em testes, onde se observou mudanças negligenciáveis no D e IPD após 15 ciclos de homogeneização (TANG *et al.*, 2013). Também, apesar da regra geral dizer que o aumento da porcentagem de fase lipídica pode resultar numa redução da eficiência de homogeneização e consequente aumento do tamanho (HANY e EL GAZAYERLY, 2011), o aumento da mesma de 20 para 30% em NLS com o lipídio Precifac ATO apresentou pouca diferença em relação ao D e IPD, com valores em torno de 200 nm e menores que 0,3 respectivamente (LIPPACHER *et al.*, 2001).

O PZ pode ser definido como uma medida da carga da partícula e trata-se de outro importante parâmetro de caracterização das dispersões coloidais, pois além de sua importância na estabilidade, também exerce grande influência na interação das partículas com o organismo, provocando alterações na farmacocinética. Nanopartículas carregadas negativamente, por exemplo, tendem a manter-se por mais tempo na corrente sanguínea e apresentar menos citotoxicidade, enquanto as carregadas positivamente podem ser utilizadas como um sistema mucoadesivo graças a sua capacidade de interação com a mucosa que é normalmente negativa (HAN *et al.* 2008; HONARY e ZAHIR, 2013a, 2013b).

Todas as formulações analisadas apresentaram PZ maior que |30| mv (Tabela 12), o que lhes confere maior estabilidade e menor possibilidade de agregação das partículas devido a existência de uma grande repulsão elétrica entre as mesmas (HAN *et al.*, 2008; HONARY e ZAHIR, 2013b). Sabe-se que as formulações constituídas de tensoativos não

iônicos, como o poloxamer 188 usado neste estudo, geralmente apresentaram valores de PZ baixos, com partículas estabilizadas por repulsão estérica (GALVÃO, 2015). No entanto, o valor negativo elevado observado neste estudo pode ser atribuído à formação de pontes de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, como exemplificado por Santos *et al.* (2012), que observaram valores até de -66,4 mV no PZ de Nanopartículas Lipídicas com os tensoativos mono-oleato de sorbitano, polissorbato 188 e polissorbato 80.

Nos resultados da caracterização físico-química dos CLN, observou-se pequenas variações entre as formulações que foram aprovadas após AM, e todas mantiveram-se dentro do intervalo das especificações para um nanossistema com características tecnológicas desejáveis. Assim, prosseguimos o estudo com a CLNC 10% 5C, considerando a maior concentração de lipídios desta formulação em comparação as outras, o que possibilita a incorporação de uma maior quantidade de ativo.

### **6.3. Desenvolvimento e caracterização da formulação de NCC**

As suspensões de nanocápsula de CM (NCC) foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, seguido da evaporação do solvente (FESSI *et al.*, 1989), um método simples, reprodutível e rápido. Na avaliação organoléptica pôde ser observado que as formulações (NCB e NCC) mostraram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso com reflexo azulado. A obtenção de um sistema homogêneo é importante, pois é um indicativo de estabilidade já que a instabilidade física promove mudança considerável na aparência e na consistência em um sistema disperso, tais como a floculação ou a coalescência, promovendo separação de fases (AZZINI, 1999). O aspecto leitoso com reflexo azulado observado nas NCs é devido ao movimento Browniano das partículas, característica amplamente descrita na literatura para diferentes sistemas de nanocápsulas preparadas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O tamanho das partículas das NCs, assim como nos CLNC, também foi determinado por Espectroscopia de Correlação de Fótons (ALONSO, 1996). Os diâmetros médios encontrados para as NCC e NCB (Tabela 13) determinados no presente estudo estão de acordo com a técnica de nanoprecipitação empregada, que em geral apresenta valores na faixa entre 100 e 500 nm (ALONSO, 1996). Ainda, o tamanho de partículas encontrado para NCB foi maior, mas não significativamente diferente de NCC, sugerindo que a presença da CM parece não influenciar no tamanho das partículas. Em relação a curva de distribuição de

partícula, NCC apresentou característica unimodal (apenas um pico) e simétrica, indicando que a amostra possui majoritariamente uma única população de partículas (Figura 18).

**Tabela 13 – Caracterização das formulações de NCC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação.**

Formulação	D (nm)	IPD	PZ (mV)	TA (%)	EE (%)
	± DPR	± DPR	± DPR	± DPR	± DPR
NCC	160,9 ± 2,4	0,162 ± 0,003	51,03 ± 3,2	91,89 ± 2,3	39,39 ± 1,4
NCB	187,3 ± 0,5	0,142 ± 0,005	40,83 ± 1,7	-	-

Resultados representam a média ± DPR. Análises realizadas em triplicata. NCC = Nanocápsulas de cumarina. NCB = Nanocápsulas Branca. DPR = desvio padrão relativo. D = diâmetro. IPD = índice de polidispersão, PZ = potencial zeta. TA = teor de ativo. EE = eficiência de encapsulação.

**Figura 18 – Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente à NCC.**

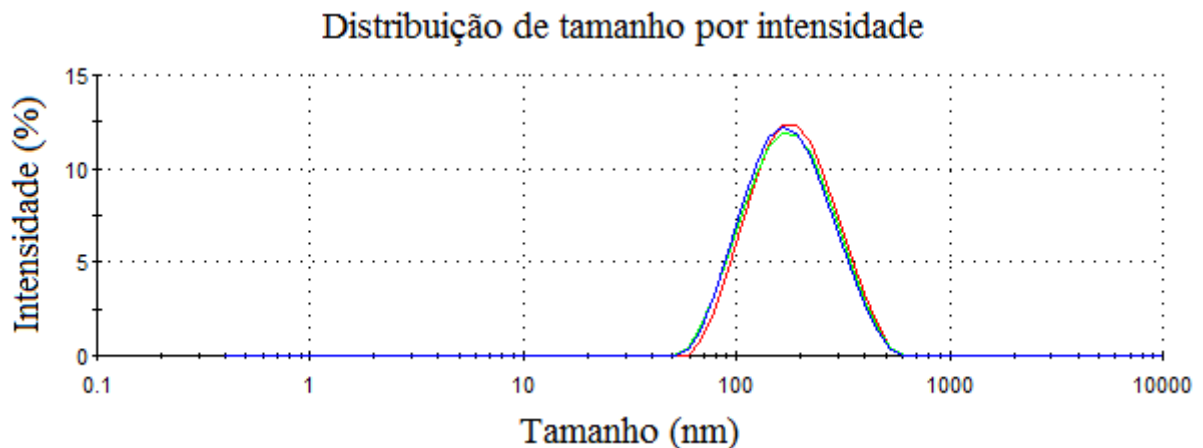


Gráfico referente à análise em triplicata de NCC gerado pelo equipamento Zetasizer Nano ZS. NCC = Nanocápsulas de cumarina.

Os índices de polidispersão das NCs são descritos na Tabela 13, com valor máximo de  $0,162 \pm 0,003$ , mostrando que as formulações apresentaram boa homogeneidade e estreita faixa de distribuição de tamanhos. A partir destes resultados pode-se assegurar que os dados de D e IPD estão válidos, visto que em medidas com polidispersividade maior que 0,5 não se é prudente confiar no tamanho obtido pelo espalhamento dinâmico de luz (MALVERN, 2013).

O Potencial Zeta, que reflete a carga de superfície das nanopartículas e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, apresentou valores acima de  $|30|$  mV (Tabela 13), indicando que a suspensão se mantém estável por repulsão de cargas



(SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Nesse caso o valor positivo é atribuído a carga dos grupamentos amônio quartenário presentes no polímero Eudragit RS 100, e corrobora com resultados descritos por outros autores em formulações de nanocápsulas usando o mesmo polímero (UBRICH *et al.*, 2005; DOMINGUES, 2006).

Análise por CLAE – DAD da NCC para determinação do teor de CM mostrou perda de quase 10% do ativo durante o processo de produção da nanocápsula (Tabela 13). Essa perda pode ter acontecido durante a evaporação do solvente orgânico, visto que a CM trata-se de uma molécula volátil e, como será descrito adiante, a maior parte dela está fora do nanosistema. Estudo relacionado ao desenvolvimento de nanocápsulas contendo o monoterpene Cinamato de Metila e utilizando a mesma técnica do presente estudo reporta uma perda do ativo semelhante durante o processo (SILVEIRA, 2015).

A avaliação do conteúdo do fármaco intimamente ligado às nanopartículas (EE) é uma tarefa especialmente complicada, pois a separação do fármaco livre e do incorporado é difícil pela natureza coloidal do sistema carreador. As técnicas de separação da parte livre e da encapsulada mais utilizadas são ultracentrifugação e ultrafiltração-centrifugação, sendo essa última usada no presente estudo e mostrando-se eficiente para determinar a EE. No presente estudo, a EE da CM encapsulada foi em torno de 40 % (Tabela 13), um valor que esteve abaixo dos encontrados em outros estudos utilizando também a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, como o encapsulamento do cinamato de metila que obteve uma EE de 87,03 % (SILVEIRA, 2015) e da atrazina, que variou entre 89,4 e 94,3% (SOUZA *et al.*, 2012). Assim, estudos adicionais foram necessários a fim de aumentar a EE.

#### **6.4. Otimização da formulação de NCC**

A necessidade de otimização de produtos tem levado a uma enorme busca por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. O DCCR, uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, é uma ferramenta extensivamente empregada no desenvolvimento de novos produtos, otimizando tempo e recursos. Foi introduzida por Box e Wilson (1951) e sua metodologia consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes) (BARROS NETO *et al.*, 1996; MENDONÇA, 2012). Na área farmacêutica, o planejamento de experimentos vem sendo adotado na preparação de nanosistemas, já que com a realização de

poucos experimentos é possível otimizar os parâmetros de produção das formulações (PROFIRIO, 2018).

No presente estudo o DCCR 2<sup>3</sup> foi empregado para investigar a influência de três variáveis independentes (quantidade de polímero, quantidade de óleo e a quantidade de tensoativo) sobre o D, IPD, PZ, TA e EE das formulações de NCC. As dezessete formulações resultantes do DCCR foram preparadas seguindo as proporções descritas anteriormente (Tabela 6) e os resultados obtidos expressos na Tabela 14 foram analisados utilizando o programa Protimiza Experimental Design (Brasil).

**Tabela 14 - Caracterização das formulações de NCC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação referente ao planejamento fatorial do processo de otimização.**

Formulação	D (nm) ± DPR	IPD ± DPR	PZ (mV) ± DPR	TA (%) ± DPR	EE (%) ± DPR
NCC 1	133,4 ± 0,88	0,11 ± 4,81	14,4 ± 1,06	98,2 ± 1,85	35,0 ± 2,12
NCC 2	140,0 ± 0,85	0,16 ± 6,48	58,8 ± 3,38	99,7 ± 1,31	37,3 ± 0,14
NCC 3	189,3 ± 0,84	0,10 ± 3,55	54,9 ± 1,10	104,6 ± 1,93	40,0 ± 0,90
NCC 4	183,4 ± 0,27	0,09 ± 5,86	61,8 ± 0,61	101,0 ± 2,41	46,3 ± 1,04
NCC 5	121,2 ± 1,24	0,10 ± 4,24	9,5 ± 3,22	108,0 ± 0,91	37,0 ± 0,93
NCC 7	154,7 ± 0,69	0,14 ± 3,78	39,6 ± 1,19	103,6 ± 1,09	40,2 ± 0,26
NCC 8	201,6 ± 0,70	0,16 ± 5,27	58,9 ± 1,04	95,8 ± 0,53	44,5 ± 1,51
NCC 9	233,2 ± 3,54	0,27 ± 7,13	13,4 ± 2,27	107,7 ± 4,10	34,7 ± 5,50
NCC 10	185,0 ± 1,20	0,22 ± 5,12	59,3 ± 4,28	102,7 ± 2,08	49,1 ± 1,86
NCC 11	164,8 ± 2,02	0,26 ± 3,65	64,0 ± 0,92	104,9 ± 1,92	37,5 ± 0,39
NCC 12	194,6 ± 0,75	0,14 ± 3,57	48,8 ± 1,94	101,3 ± 3,89	49,9 ± 2,48
NCC 13	180,1 ± 0,45	0,08 ± 8,54	65,6 ± 0,65	99,9 ± 0,92	37,8 ± 3,08
NCC 14	140,2 ± 0,21	0,14 ± 5,13	50,2 ± 1,62	100,4 ± 1,24	45,9 ± 1,46
NCC 15	166,2 ± 1,29	0,14 ± 9,44	57,6 ± 0,66	98,8 ± 4,07	41,5 ± 5,79
NCC 16	173,7 ± 1,38	0,14 ± 1,59	54,0 ± 0,93	103,6 ± 0,12	40,9 ± 1,96
NCC 17	181,4 ± 1,10	0,20 ± 6,74	54,2 ± 2,76	104,3 ± 1,12	44,5 ± 0,20

Resultados representam a média ± DPR de 3 réplicas das formulações de NCC. Análises realizadas em triplicata. NCC = Nanocápsulas de cumarina. DPR = desvio padrão relativo. D = diâmetro. IPD = índice de polidispersão, PZ = potencial zeta. TA = teor de ativo. EE = eficiência de encapsulação.

Com exceção da NCC 6, que apresentou precipitado e separação de fase logo após a produção por isso não foi caracterizada, as formulações mostraram aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente com reflexo azulado, características comuns a sistemas de nanocápsulas (SANTOS & BARBOZA, 2013).

A maior parte das formulações apresentou tamanho de nanopartículas inferior a 200 nm, sendo a formulação NCC9 a que apresentou maior D ( $233,2 \pm 3,54$  nm). Apesar de o aumento da concentração do tensoativo na fase externa conduzir, em regra, à redução das dimensões das nanocápsulas (SOUTO *et al.*, 2012) e o aumento da concentração de polímero estar amplamente relacionado ao aumento do tamanho das partículas (O'DONNELL & MCGINITY, 1997; RIEUX *et al.*, 2006), esse estudo não detectou uma relação ( $p < 0,05$ , ANOVA) entre as variáveis estudadas e o D das NCC.

Na polidispersividade das amostras, também não houve influência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) de nenhuma das variáveis avaliadas. Apenas 3 formulações, NCC9, NCC10 e NCC11, apresentaram IPD superior a 0,2 ( $0,27 \pm 7,13$ ;  $0,22 \pm 5,12$ ;  $0,26 \pm 3,65$ , respectivamente), sendo esse um dado positivo visto que um IPD elevado sugere uma ampla distribuição de tamanho ou existência de várias populações (ALVES *et al.*, 2007; GAUMET *et al.*, 2008).

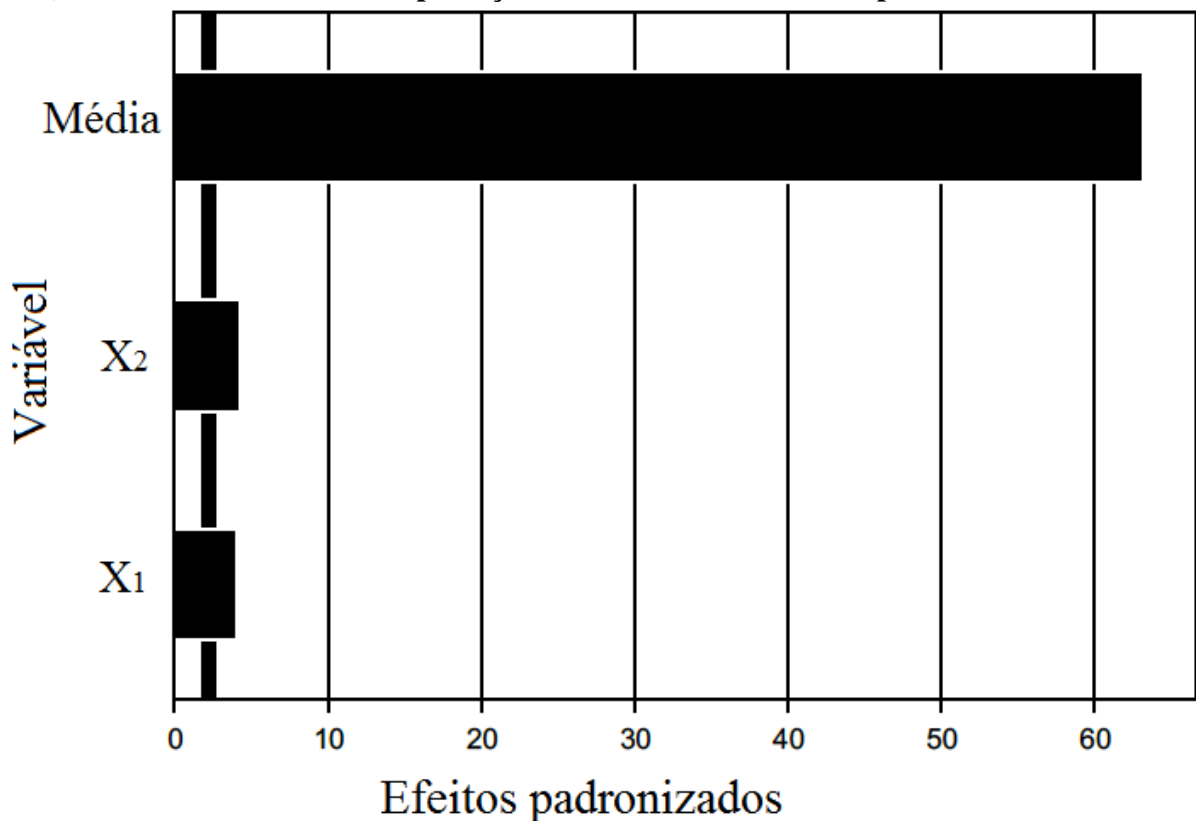
O PZ apresentou ampla variação, sendo o menor valor observado na formulação NCC5 ( $9,5 \pm 3,22$  mV) e o maior valor na formulação NCC13 ( $65,6 \pm 0,65$  mV) (Tabela 14). Apesar disso, na análise de efeito não houve influência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) da concentração do polímero, do óleo ou do tensoativo. Em estudo com nanocápsulas de Eudragit RL100 / óleo linhaça e nanocápsulas de Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) / óleo de argan contendo Ubiquinona, substância de ampla distribuição nas membranas dos tecidos que atua como coenzima, a redução da concentração dos óleos de 3 para 1,5 % causou diminuição do diâmetro médio e do IPD no nanossistema, diferindo do resultado obtido neste estudo, enquanto que no PZ não foi observado mudanças para diferentes quantidades dos óleos, sendo esse resultado semelhante ao obtido nesta pesquisa (STANGARLIN, 2014).

Outro estudo, com nanocápsulas de PCL contendo o herbicida atrazina, avaliou a influência da mudança nas quantidades do polímero PCL, do tensoativo Span® 60 e do óleo Miritol sobre o D, IPD, PZ e EE da nanossistema. Nenhum dos fatores avaliados foi estatisticamente significativo sobre IPD, PZ e EE, no momento imediatamente após o preparo. Dois fatores apresentam influência estatisticamente significativa sobre o D das nanocápsulas:

Miritol, que apresentou influência positiva, e a interação PCL: Miritol, que apresenta influência negativa sobre o tamanho (SOUZA *et al.*, 2012).

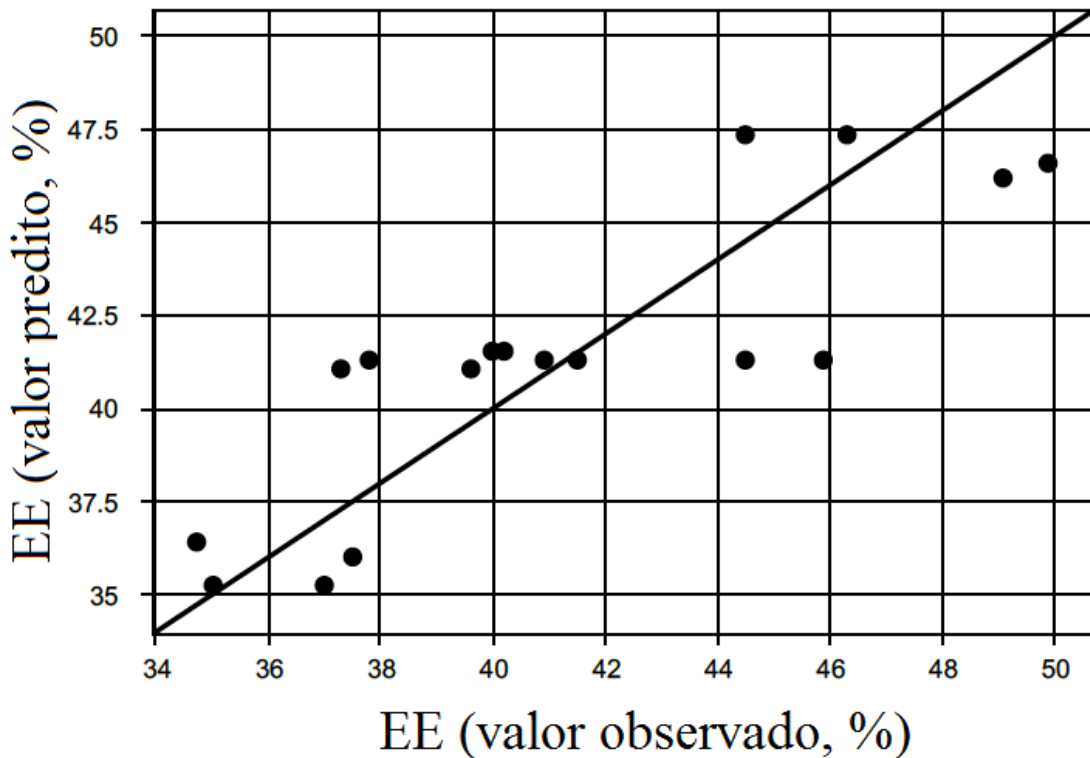
Em relação ao TA, os valores ficaram próximos de 100 % em todas as formulações, enquanto a EE variou entre  $34,7 \pm 5,50$  % (NCC9) e  $49,1 \pm 1,86$  % (NCC10). Neste último parâmetro, não houve influência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) da quantidade de tensoativo, enquanto as quantidades de polímero e de óleo empregados na NCC influenciaram significativamente de forma positiva, sem efeito na interação dessas variáveis. Essa resposta pode ser vista no gráfico de Pareto (Figura 19), onde os fatores ( $x_1$  = quantidade de polímero;  $x_2$  = quantidade de óleo) cruzam além da linha vertical (paralela à yaxis), indicando que o efeito principal é significativo (GOMES *et al.*, 2017). Ao analisar a resposta da EE, houve correspondência de 71% ( $R^2$ ) entre valores observados versus valores previstos pelo modelo (Figura 20).

**Figura 19 - Diagrama de Pareto: efeito das variáveis (concentração de polímero e de óleo) sobre a eficiência de encapsulação da cumarina em Nanocápsulas de cumarina.**



\* $x_1$  = concentração de polímero.  $x_2$  = concentração de óleo.

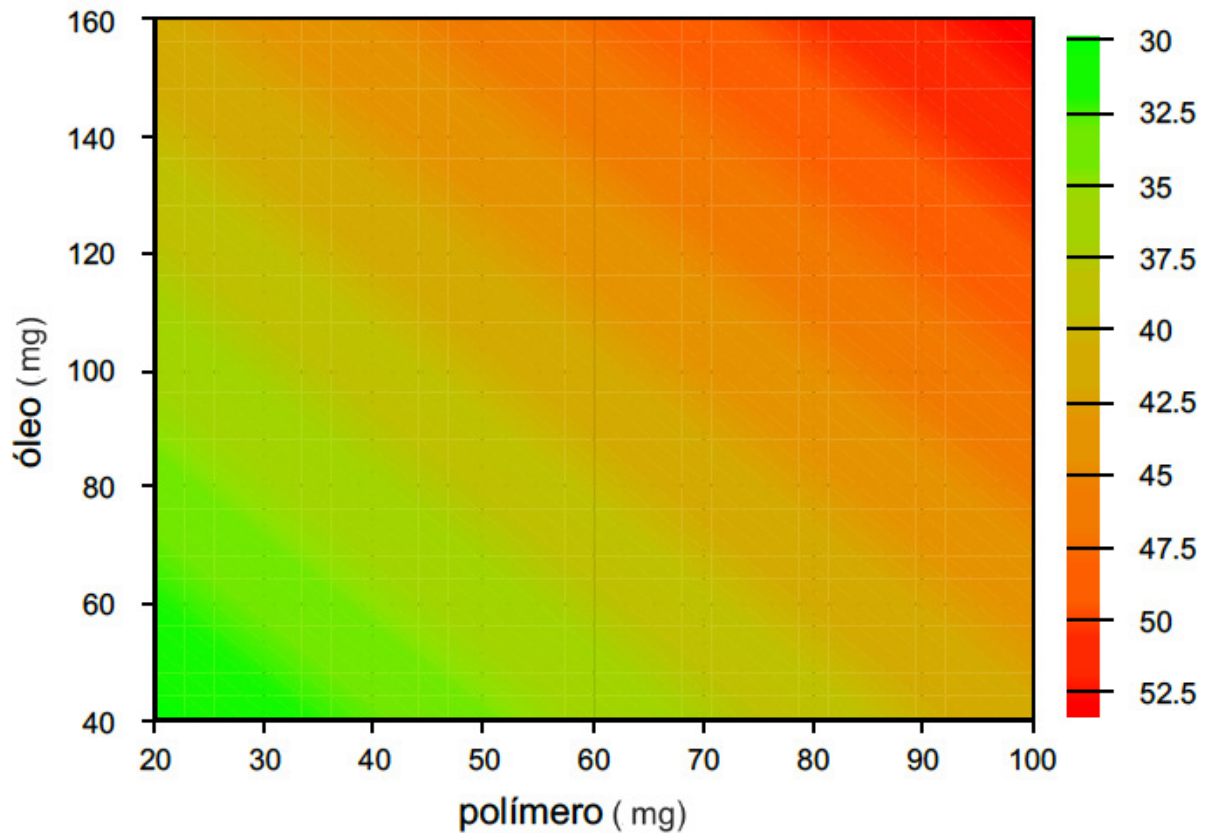
**Figura 20 - Relação entre valores de eficiência de encapsulação da NCC observados versus valores previstos pelo modelo.  $R^2 = 71\%$ .**



EE = eficiência de encapsulação.

A Figura 21 mostra a curva de contorno de resposta para a eficiência do aprisionamento do fármaco, o que indica um aumento na EE de CM a medida que ocorreu um aumento na concentração de polímero e de óleo. Saharan e colaboradores (2019) obtiveram efeito similar em um estudo com nanocápsulas de Glipizida usando o mesmo polímero, onde o aprisionamento do fármaco foi favorecido pelo aumento da concentração do polímero. Já Wadhwa e colaboradores (2014) observaram um aumento na EE com o aumento da concentração de óleo (Capryol 90) em nanocápsulas de curcumina, no entanto, a EE diminuiu com o aumento da concentração de polímero (Hydroxy propyl methyl cellulose acetate succinate) e adsorvente, segundo os autores provavelmente devido ao aumento da viscosidade da formulação.

**Figura 21 - Curva de contorno mostrando o efeito das variáveis (óleo e polímero) sobre a Eficiência de Encapsulação da CM no nanosistema.**



A curva de contorno permitiu estimar concentrações do polímero e do óleo na NCC para produção de uma nanocápsula com maior taxa de encapsulamento da CM, essa formulação foi chamada de NCCa e as concentrações dos excipientes estão descritas na Tabela 15. A partir desta, duas outras formulações com incremento na quantidade de óleo (variável que influenciou a EE economicamente mais viável) da ordem de 10 (NCCb) e 20% (NCCc) também foram produzidas com o intuito de aumentar ainda mais a EE (Tabela 15). No preparo das nanocápsulas poliméricas mantiveram-se fixos os volumes de água (10 ml) e acetona (5,6 ml) e a quantidade de ativo (10 mg de CM).

Na Tabela 16 estão descritos os resultados obtidos na caracterização das novas formulações (NCCa, NCCb e NCCc), os quais não foram observadas diferenças significativas (ANOVA, Tukey) quanto ao D, IPD, PZ e TA. Em relação ao tamanho, as nanopartículas apresentaram valores bem próximos, variando de 210 à 216,7 nm. Embora existam autores que definem nanopartículas com D inferior a 100 nm (FALQUEIRO *et al.*, 2011), alguns autores defendem valores até 300 nm (DOMINGUES *et al.*, 2008) e nanopartículas preparadas por nanoprecipitação, em geral, apresentam valores até 500 nm (ALONSO, 1996). Ainda,

pesquisas indicam que as nanopartículas maiores que 200 nm podem ser capturadas por fagocitose pelos macrófagos, sendo sua internalização mais eficiente que partículas menores onde processos como endocitose estão envolvidos (LI *et al.*, 2014). O IPD das formulações apresentou valor máximo de  $0,16 \pm 5,69$ , sendo abaixo do estipulado como máximo aceito, que é de 0,2 (MALVERN, 2013).

**Tabela 15 – Quantidade de excipientes usadas no preparo das NCC resultantes do planejamento fatorial do processo de otimização.**

FORMULAÇÃO	EUDRAGIT (mg)	MIGLYOL (mg)	TWEEN 80 (mg)
NCCa	100	175	45
NCCb	100	192,5	45
NCCc	100	210	45

NCCa = Nanocápsulas de cumarina com concentrações dos excipientes estimada pela curva de contorno. NCCb = Nanocápsulas de cumarina com incremento de 10% de óleo em relação a NCCa. NCCc = Nanocápsulas de cumarina com incremento de 20% de óleo em relação a NCCa.

**Tabela 16 - Caracterização das formulações de NCC quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação resultantes do planejamento fatorial do processo de otimização.**

Formulação	D (nm) ± DPR	IPD ± DPR	PZ (mV) ± DPR	TA (%) ± DPR	EE (%) ± DPR
NCCa	$211,6 \pm 0,95$	$0,16 \pm 5,69$	$70,2 \pm 1,00$	$98,2 \pm 2,89$	$53,12 \pm 0,7$
NCCb	$210,0 \pm 0,24$	$0,13 \pm 7,27$	$75,9 \pm 0,73$	$102,5 \pm 8,86$	$58,01 \pm 0,2$
NCCc	$216,7 \pm 0,53$	$0,13 \pm 1,12$	$79,1 \pm 0,58$	$99,7 \pm 4,67$	$57,98 \pm 0,5$
NCBb*	$204,1 \pm 1,12$	$0,17 \pm 2,47$	$73,5 \pm 0,2$	-	-

\*NCBb: nanocápsulas branca e com os excipientes na mesma proporção de NCCb. NCCa = Nanocápsulas de cumarina com concentrações dos excipientes estimada pela curva de contorno. NCCb = Nanocápsulas de cumarina com incremento de 10% de óleo em relação a NCCa. NCCc = Nanocápsulas de cumarina com incremento de 20% de óleo em relação a NCCa. Análises realizadas em triplicata. Os resultados estão expressos como Média ± DPR. DPR = desvio padrão relativo.

Corroborando os resultados obtidos, nanocápsulas poliméricas de p, p'-metoxil-difenil diseleneto preparadas por nanoprecipitação apresentaram D e IPD de  $236 \pm 4$  nm e 0,16, respectivamente (SARI *et al.*, 2017). Ainda, outro estudo empregando a mesma técnica,

obteve nanocápsulas poliméricas contendo o herbicida atrazina com tamanho entre 256,4 à 327,9 nm e IPD máximo de 0,184 (SOUZA *et al.*, 2012).

Os valores positivos encontrados para o PZ, entre 70 e 79 mV, eram esperados visto que essa é uma característica das nanocápsulas que depende principalmente da natureza química do polímero (RIEUX *et al.*, 2006). Esse resultado também foi observado em outros estudos com nanopartículas que foram preparadas pelo método de nanoprecipitação e utilizaram o polímero Eudragit® RS100, como relatado por Santos e colaboradores (2013), que ao avaliarem o PZ de nanocápsulas contendo Clotrimazol, verificaram valor positivo (+12 mV) e por Yenilmez (2017), onde nanocápsulas contendo desloratadina apresentaram PZ de  $22,5 \pm 2,01$  à  $28,8 \pm 0,56$  mV.

O teor de ativo na nanocápsula apresentou valores próximos a 100%, mostrando que não houve perda do fármaco na preparação da formulação. Outros autores (DALCIN *et al.*, 2019; SILVEIRA, 2015; STANGARLIN, 2014) utilizando a mesma técnica de preparo de nanocápsulas também mostraram ausência ou mínima perda de ativo em suas formulações.

A suspensão de nanocápsulas obtida com concentrações de polímero e óleo sugeridas pela curva de contorno (NCCa) apresentou EE de  $53,12 \pm 0,7$  %, enquanto NCCb e NCCc apresentaram valores de  $58,01 \pm 0,2$  e  $57,98 \pm 0,5$  %, respectivamente. A adição de óleo acima de 10% parece não agregar mais vantagens visto que a EE não aumentou na formulação NCCc quanto comparada a formulação NCCb. Em relação a primeira suspensão de NCC desenvolvida, que apresentou  $40,83 \pm 1,7$  % de aprisionamento do fármaco, observou um incremento em NCCb em torno de 42 % na EE. Estudos demonstram que as taxas de associação de fármacos a nanopartículas são variáveis, e diversos fatores são capazes de influenciar, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do fármaco utilizado, o pH do meio, a natureza do polímero e as características da superfície das partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; VILA *et al.*, 2002).

Apesar da EE de NCCb apresentar valor inferior a outros estudos citados anteriormente (DALCIN *et al.*, 2019; SILVEIRA, 2015; SOUZA *et al.*, 2012), foi alcançada uma diminuição na volatilidade do ativo dentro da formulação visto que o TA observado foi de  $102,5 \pm 8,86$  %, enquanto que na primeira formulação desenvolvida houve perda de quase 10 % do ativo. Resultado parecido foi observado na encapsulação do óleo essencial de *Curcuma longa* (Açafrão), veiculado em nanocápsulas de alginato (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2008) e em nanocápsulas de alginato combinado com quitosana (LERTSUTTHIWONG *et al.*, 2009) e, apesar da baixa taxa de encapsulação nos dois estudos (60% e 68,5%,



respectivamente), foi alcançada uma diminuição na volatilidade. Além disso, pode ser interessante ter parte da droga livre para que o efeito tenha início logo após a administração da droga e seja mantido conforme a liberação do nanosistema aconteça.

A formulação NCCb foi selecionada para prosseguir com o estudo e uma suspensão de nanocápsulas branca (sem o ativo - NCBb) com as mesmas proporções de excipientes da formulação escolhida foi preparada para fins de comparação. A formulação sem CM apresentou D ( $204,1 \pm 1,12$  nm) bem próximo daquela com ativo, IPD dentro dos valores aceitáveis ( $0,17 \pm 2,47$ ) e PZ positivo ( $55,9 \pm 1,56$  mV) (Tabela 16). Diante dos resultados obtidos, o estudo prosseguiu avaliando a toxicidade da NCCb em células da resposta imune inata e adaptativa que possuem um papel estratégico na fisiopatologia da leishmaniose.

#### **6.5. Avaliação da citotoxicidade do CLNC10% 5C e da NCCb em macrófagos J774**

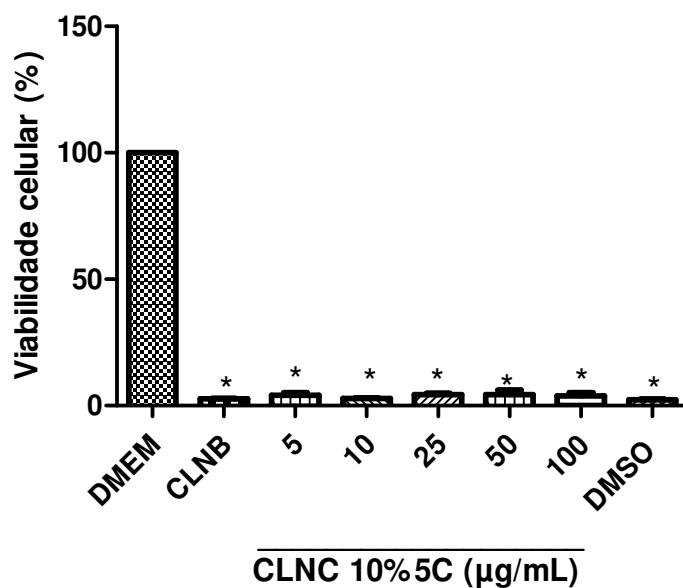
A avaliação da toxicidade dos nanosistemas sobre o metabolismo celular foi realizada em macrófagos J774 através do teste do MTT, um ensaio colorimétrico, baseado no uso do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis (MOSMANN, 1983).

Os macrófagos foram escolhidos para o ensaio de toxicidade por serem as células hospedeiras da *Leishmania* e, portanto, a célula alvo para o tratamento. Na determinação da atividade leishmanicida *in vitro*, dois tempos diferentes de incubação (24 e 48 h) da droga teste na presença de macrófagos infectados com amastigotas foram avaliados, seguindo o período aproximado do primeiro ciclo de replicação do parasita (TRAHAMANE, 2015). Logo, faz sentido que a citotoxicidade seja avaliada nos mesmos intervalos de tempo.

A citotoxicidade do ativo livre não foi estudada, pois em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a CM não alterou a viabilidade celular (teste do MTT: 5 - 100 µg/ml) após 24 e 48 horas de incubação em macrófagos RAW 267.4, sugerindo assim que esta molécula não provoca nenhuma alteração no metabolismo mitocondrial de macrófagos nas condições investigadas (PINHEIRO, 2016). Ademais, outro estudo realizado com o Extrato Seco Padronizado de *Amburana Cearensis* Cultivada, cujo marcador majoritário é a CM (14,25 mg/g de droga vegetal), mostrou que a adição de concentrações crescentes (1 - 100 µg/ml) à suspensão de neutrófilos também não diminuiu a viabilidade celular quando avaliada a citotoxicidade através do teste do MTT (AMARAL, 2017).

A Figura 22 mostra o resultado do estudo de citotoxicidade do CLNC 10% 5C, onde observa-se a redução significativa da viabilidade celular do carreador lipídico em todas as concentrações estudadas quando comparado ao grupo controle (DMEM – grupo não tratado (100%). O carreador lipídico sem ativo (CLNB) também reduziu significativamente a viabilidade celular ( $2,86 \pm 0,12$  %), com valor próximo ao apresentado pelo padrão citotóxico (DMSO 10% -  $2,47 \pm 0,16$  %).

**Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade de CLNC 10% 5C em macrófagos J774 24h através do teste do MTT.**



Macrófagos J774 ( $1 \times 10^5$  células/poço – incubados por 24h) na presença de CLNC 10% 5C (5 - 100 µg/ml) para avaliar a viabilidade celular através do teste do MTT. Grupo não tratado: DMEM; Controle da CLNC : CLNB = CLNB 10%5C– equivalente a diluição de 100 µg/ml do CLNC 10% 5C; Padrão citotóxico: DMSO 10%. Análises realizadas em triplicata. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. Significância estatística vs DMEM (\* $p < 0.001$ ). E.P.M. = erro padrão da média.

Os lipídios empregados para preparar nanopartículas lipídicas são geralmente lipídios fisiológicos (biocompatíveis e biodegradáveis) com baixa toxicidade aguda e crônica. Mesmo concentrações superiores a 10% de lipídios gerou perda de viabilidade celular em granulócitos humanos de apenas 20 % (MULLER *et al.*, 1996). Pesquisas mais recentes têm demonstrado as vantagens no uso de CLN (RASHIDZADEH *et al.*, 2019; CZAJKOWSKA-KOŚNIK *et al.*, 2019; KHOSA *et al.*, 2018; RIZWANULLAH *et al.*, 2016), no entanto, pouco se tem estudado sobre a toxicidade dessas formulações. De fato, mesmo com o uso de lipídios fisiológicos, a toxicidade da formulação deve ser avaliada devido ao uso de

emulsificantes e por se tratar de um sistema coloidal, cujas interações com o organismo podem ser imprevisíveis (MEHNERT e MADER, 2001).

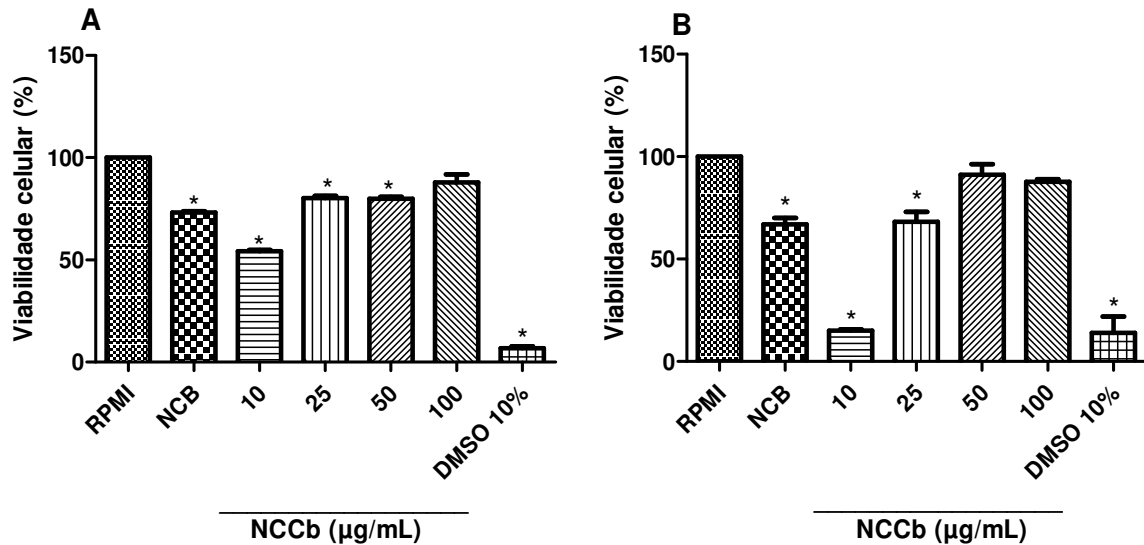
Neste estudo, apesar do CLNC 10% 5C apresentar características tecnológicas favoráveis, a citotoxicidade comparável ao padrão citotóxico provocou alterações metabólicas nas células estudadas e inviabilizou o uso, já que não seria possível avaliar a carga parasitária em macrófagos.

Na Figura 23A, pode ser observado que a adição NCBb, nanocápsulas sem o ativo e controle da formulação, em macrófagos J774 provocou diminuição ( $73,22 \pm 3,32 \%$ ) da viabilidade celular quando comparada ao grupo não tratado – RPMI (100%). Na presença de NCC em concentrações crescentes (10, 25 e 50  $\mu\text{g/ml}$ ), também houve redução significativa da viabilidade celular avaliada pelo teste do MTT ( $54,23 \pm 0,62\%$ ,  $80,23 \pm 1,04\%$  e  $79,97 \pm 0,83\%$ , respectivamente). No entanto, NCCb quando adicionado ao meio na concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$  não reduziu significativamente a viabilidade celular ( $87,84 \pm 3,94\%$ ) quando comparado ao grupo não tratado. O DMSO 10%, padrão citotóxico, apresentou diminuição da viabilidade celular para  $6,86 \pm 0,84\%$ .

O efeito demonstrado pelo sistema contendo ativo de sobrepor-se a relativa toxicidade apresentada pelos componentes da formulação, também pode ser notado com o aumento do tempo de incubação da NCCb em macrófagos. Houve redução significativa na viabilidade celular apenas nas menores concentrações (10 e 25  $\mu\text{g/ml}$ ), com redução máxima de  $68,36 \pm 4,64 \%$  (Figura 23B). A NCBb apresentou redução da viabilidade celular para  $66,89 \pm 3,31\%$ .

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, foi avaliada a citotoxicidade de nanocápsulas de Cinamato de Metila através do teste do MTT em queratinócitos humanos. Nesta formulação de nanocápsulas, utilizando o mesmo polímero, óleo e tensoativo em proporções diferentes, também foi observada uma reversão da toxicidade dos componentes do nanosistema pela presença do ativo (SILVEIRA, 2015).

**Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade de NCCb em macrófagos J774 incubados por 24h (A) e 48h (B) através do teste do MTT.**



Macrófagos J774 ( $1 \times 10^5$  células/poço – incubados por 24h e 48h) na presença de NCCb (10 - 100  $\mu\text{g/ml}$ ) para avaliar a viabilidade celular através do teste do MTT. Grupo não tratado: RPMI; Controle da NCCb: NCBb – equivalente a diluição de 100  $\mu\text{g/ml}$  de NCCb; Padrão citotóxico: Triton x-100 0,05% ou DMSO 10%. Análises realizadas em triplicata. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. Significância estatística vs RPMI (\* $p < 0,001$ ). E.P.M. = erro padrão da média.

Dalcin e colaboradores (2019) realizaram um estudo onde avaliaram a influência da nanoencapsulação da dihidromicetina flavonóide (DMY) na redução citotoxicidade induzidas por nanocápsulas catiônicas produzidas com Eudragit RS100. O ensaio de citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico demonstrou que nem o ativo livre e nem o encapsulado foram citotóxicos, enquanto a suspensão de nanocápsulas mostrou diminuição significativa da viabilidade celular quando avaliada na ausência do fármaco. Os autores atribuíram essa proteção ao potencial antioxidante da DMY. Sendo as cumarinas e seus derivados amplamente relacionados na literatura ao efeito antioxidante (BUBOLS *et al.*, 2013; BASILE *et al.*, 2009; PAYÁ *et al.*, 1994; PAYÁ *et al.*, 1992), essa parece ser uma explicação possível pelo efeito demonstrado por NCC de sobrepor-se a relativa toxicidade apresentada pelos componentes da formulação.

A partir dos resultados de citotoxicidade das duas formulações estudadas até o momento (CLN 10% 5C e NCCb), decidimos continuar o estudo com a formulação de nanocápsulas poliméricas, avaliando sua estabilidade e respeitando as concentrações que não apresentaram alterações no metabolismo celular (50 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ) na determinação da atividade leishmanicida *in vitro*.

## 6.6. Estabilidade de NCCb

A estabilidade de nanossistemas tem-se apresentado como desafio no desenvolvimento dessas formulações. Em função de sua natureza coloidal e da complexidade dos constituintes que compõem as nanocápsulas, os estudos de estabilidade são essenciais e têm sido investigados com base em alguns parâmetros como a distribuição do tamanho das partículas, determinação do potencial zeta, determinação do pH e determinação da concentração do fármaco em função do tempo de armazenamento (LEGRAND *et al.*, 1999; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A estabilidade dos carreadores poliméricos coloidais depende da temperatura, pH do meio e da exata composição da formulação, além de sofrer influência de outros fatores como a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Conseqüentemente, para cada formulação específica, um estudo de estabilidade correspondente deve ser realizado para garantir a qualidade do produto (ABDELWAHED *et al.*, 2006b, SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Diante do exposto, foi avaliada a estabilidade de NCCb até nove meses após sua preparação, caracterizando os seguintes parâmetros: AM, D, IPD, PZ, TA e EE.

Nas análises realizadas, após um e nove meses, a preparação mostrou aspecto macroscópico homogêneo e leitoso com reflexo azulado e não apresentou alterações macroscópicas tais como cremagem, sedimentação ou floculação, fenômenos esses que são indicativos de instabilidade (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A análise do tamanho de nanossistemas tem sido extensivamente empregada para monitorar se existe na formulação tendência à agregação ou sedimentação das partículas dispersas em função do tempo, visualizada através da observação do aumento do D (MÜLLER-GOYMANN, 2004). Na presente pesquisa, a análise do tamanho em função do tempo de preparação da NCCb e NCBb apresentaram valores com baixa variação durante o estudo, estando na faixa de  $204,1 \pm 1,12$  a  $219,3 \pm 1,12$  nm (Tabela 17). As curvas de distribuição de partículas permaneceram com característica unimodal e simétrica mesmo após 9 meses (Figuras 24 e 25), indicando que a suspensão manteve-se estável durante o estudo.

**Tabela 17 – Estudo de estabilidade da NCCb: caracterização quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de ativo e eficiência de encapsulação.**

Formulação	Mês	D (nm) ± DPR	IPD ± DPR	PZ (mV) ± DPR	TA (%) ± DPR	EE (%) ± DPR
NCCb	0	210,0 ± 0,24	0,13 ± 7,27	75,9 ± 0,73	102,5 ± 8,86	58,01 ± 0,2
	1	209,5 ± 1,99	0,12 ± 15,75	76,5 ± 8,46	93,10 ± 1,85	54,80 ± 4,6
	9	214,4 ± 3,58	0,13 ± 6,86	69,3 ± 5,22	90,53 ± 2,04	54,15 ± 4,3
NCBb	0	204,1 ± 1,12	0,17 ± 2,47	73,5 ± 0,2	-	-
	1	217,7 ± 1,12	0,13 ± 12,11	79,0 ± 0,1	-	-
	9	219,3 ± 1,12	0,13 ± 8,00	73,6 ± 2,1	-	-

NCBb: nanocápsulas branca e com os excipientes na mesma proporção de NCCb. NCCb = Nanocápsulas de cumarina com incremento de 10% de óleo. Análises realizadas em triplicata. Os resultados estão expressos como Média ± DPR. DPR = desvio padrão relativo. D = diâmetro. IPD = índice de polidispersão, PZ = potencial zeta. TA = teor de ativo. EE = eficiência de encapsulação.

**Figura 24 – Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente à NCBb após 9 meses de preparação.**

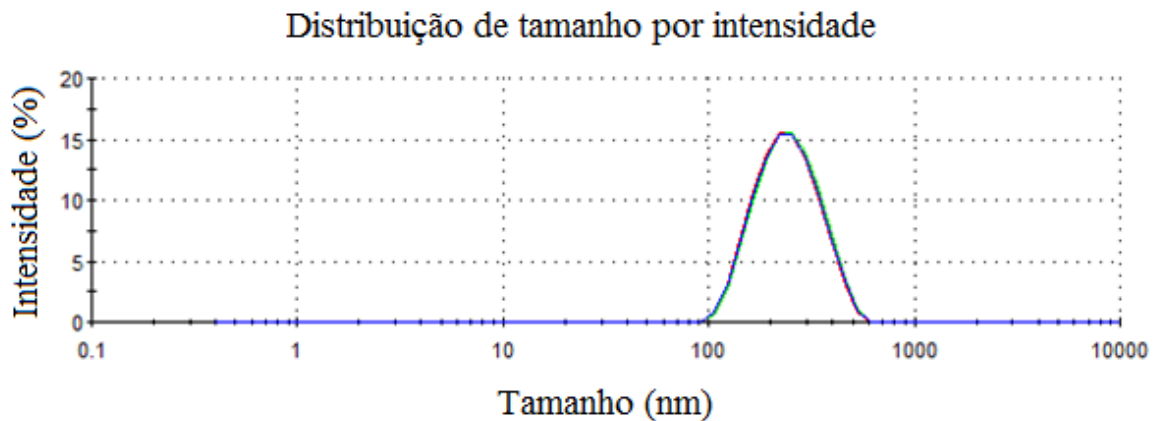


Gráfico referente à análise em triplicata de NCBb gerado pelo equipamento Zetasizer Nano ZS. NCBb: nanocápsulas branca e com os excipientes na mesma proporção de NCCb. NCCb = Nanocápsulas de cumarina com incremento de 10% de óleo.

**Figura 25 – Gráfico de distribuição de tamanho de partícula (diâmetro nm) por intensidade referente à NCCb após 9 meses de preparação.**

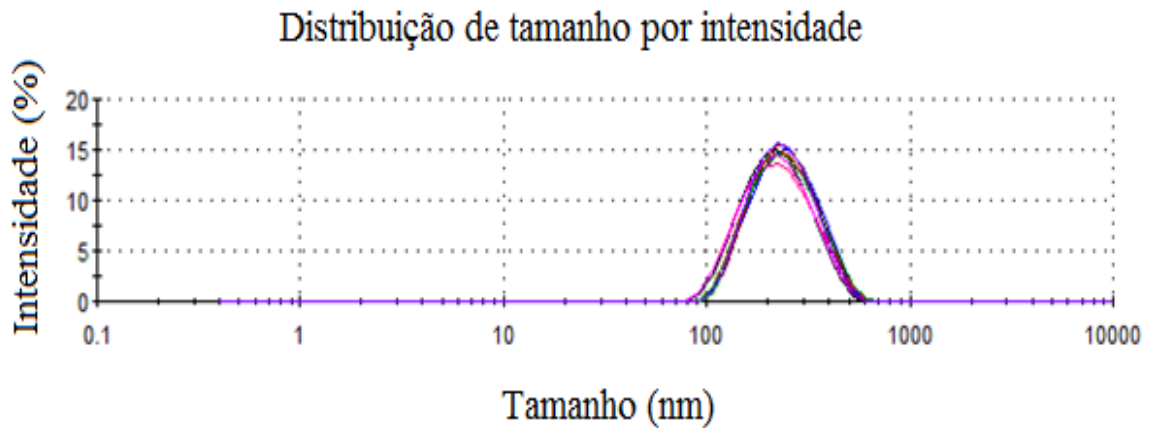


Gráfico referente à análise em triplicata de três formulações de NCCb gerado pelo equipamento Zetasizer Nano ZS. NCC = Nanocápsulas de cumarina.

É importante avaliar a distribuição do tamanho das partículas em função do tempo pois, assim como no D, o aumento do IPD pode indicar uma tendência à agregação e sedimentação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Neste estudo, o IPD apresentou valor máximo de 0,13 e 0,17 para NCCb e NCBb, respectivamente, indicando que o diâmetro das partículas se manteve em estreita faixa (ALVES *et al.*, 2007).

Alterações no Potencial Zeta são atribuídas a mudanças na interface com o meio dispersante, o que o torna um parâmetro importante para a avaliação da estabilidade. A variação dessa característica em relação ao tempo de armazenamento pode ser consequência da adsorção de estruturas iônicas da suspensão ou, da dissociação de grupamentos do polímero (MAGENHEIM e BENITA, 1991) e por isso os seus valores foram acompanhados. As análises de potencial zeta da NCCb mostraram que até o 30º dia não houve diferença significativa dos valores. Mesmo após nove meses que a formulação foi produzida, o potencial zeta reduziu apenas 8,7 %, chegando a  $69,3 \pm 5,22$  mV.

O nanoencapsulamento da CM foi proposto como alternativa para viabilizar o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica devido a sua baixa solubilidade em água. As análises mostraram que NCCb apresentou redução máxima de 10 % no TA, com valores de 93,10 e 90,53 % após o 1º e 9º mês de estudo, respectivamente. Já a EE reduziu em torno de 5 % no primeiro mês, permanecendo estável pelos próximos 8 meses.

### 6.7. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de NCCb

Para avaliar se NCCb era capaz de induzir uma diminuição da infecção dos macrófagos *in vitro*, macrófagos J774 foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e tratados com NCCb (50 e 100 µg / ml), NCBb e Glucantime (GLU – 4 mg / ml) por até 48h. Dentro dos macrófagos os parasitos evoluem para a forma amastigota, que é o estágio de vida do parasito responsável pelas diferentes manifestações clínicas no homem, tornando esse modelo preferível para relatar a atividade leishmanicida *in vitro* em relação a modelos que usam as formas promastigostas (CARVALHO *et al.*, 2017).

A observação das lâminas obtidas mostrou que, após 24 h, o tratamento com NCCb nas duas concentrações utilizadas resultou em uma redução estatisticamente significativa da carga parasitária que variou entre 31,1 e 60 %, quando comparado com o controle não tratado - MΦ (100%) (Figura 26A). No segundo tempo avaliado (48 h), os resultados mostraram que NCCb manteve a redução no número de parasitas intracelulares (5,4 % - 50 µg / ml) e (34,5 % - 100 µg / ml), mostrando-se mais uma vez estatisticamente diferente do controle - MΦ (100%) (Figura 26B). O tratamento com GLU apresentou redução na carga parasitária de 42,2 e 15,7 % após incubação por 24 e 48 h, respectivamente (Figura 26). Nos dois tempos avaliados NCCb (50 µg / ml) provocou diminuição maior no número de parasitas intracelulares quando comparado ao GLU. Nas fotomicrografias das lâminas é possível observar a diferença na quantidade de *leishmanias* entre o grupo não tratado (Figura 27A) e após tratamento por 48h com NCCb 50 µg/ml (Figura 27B).

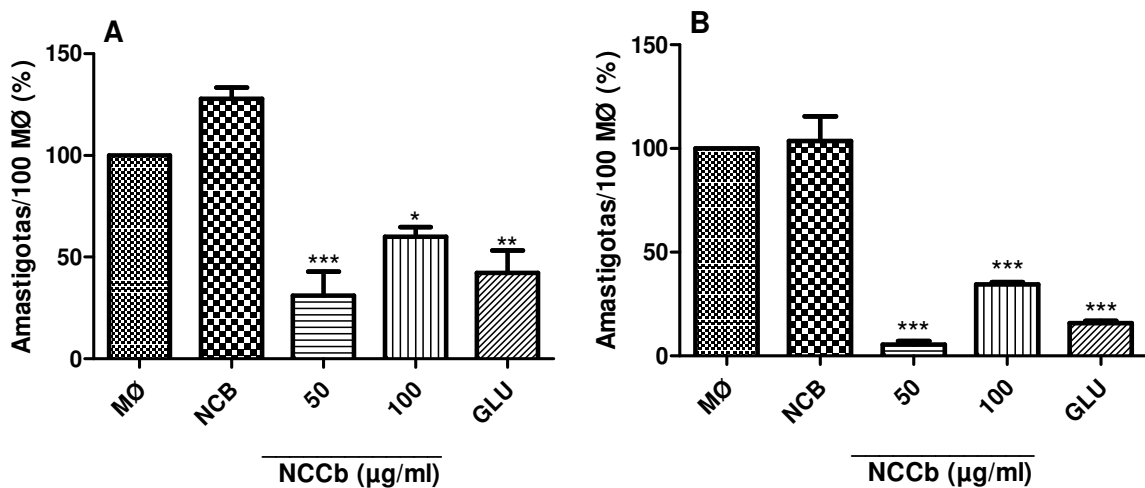
A atividade leishmanicida do ativo livre foi avaliada em estudo anterior realizado em nosso laboratório e foi observado que CM (50 µg/ml), após 24h de incubação, reduziu de maneira significativa em  $49 \pm 2,5\%$  a carga parasitária de *L. braziliensis* de macrófagos RAW 267.4, enquanto que na concentração de 100 µg /ml não houve diferença significativa do grupo não tratado. Após 48h do tratamento com CM, houve redução significativa da carga parasitária nas concentrações de 50 µg/ml ( $23,75\% \pm 1,73\%$ ) e 100 µg/ml ( $31,03\% \pm 2,18\%$ ) (dados ainda não publicados).

Assim, ao comparar os resultados obtidos entre os dois estudos realizados, é possível observar que a CM encapsulada (50 µg / ml) teve sua capacidade de reduzir a infecção dos macrófagos melhorada, apresentando atividade cerca de 18 % maior em relação a CM livre. Resultado semelhante foi encontrado na inibição do crescimento de amastigotas de *Leishmania donovani* em macrófagos por doxorrubicina. No fármaco encapsulado com



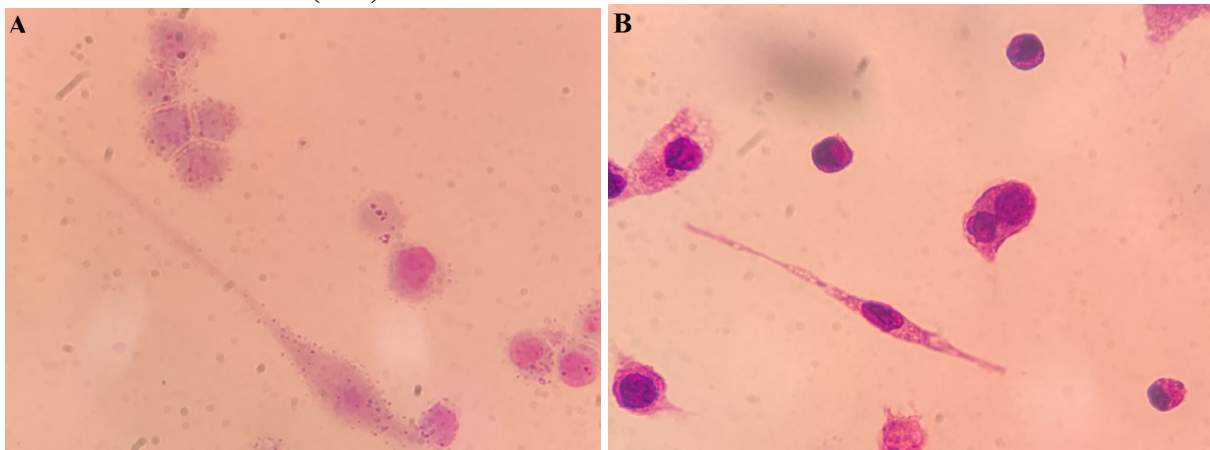
sulfato de protamina e Alginato de sódio a IC50 (0,36 mg/ml) foi 1,9 vezes menor do que o fármaco livre (0,69 mg / ml) (KANSAL *et al.*, 2013).

**Figura 26 - Carga parasitária em macrófagos J774 infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com NCCb por 24h (A) e 48h (B).**



Macrófagos J774 foram incubados com NCCb (50 e 100 µg/ml) por 24 e 48 horas e avaliada a carga parasitária. Controle: Macrófagos infectados e não tratados (MΦ); Controle Positivo: Glucantime (GLU – 4 mg/ml). Análises realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. Significância estatística vs MΦ (\*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001). E.P.M. = erro padrão da média.

**Figura 27 - Fotomicrografia de macrófagos J774 infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com NCCb (48h).**



Microscopia óptica - ampliação de 100x. A- Macrófagos (MΦ) + *L. braziliensis* (Lb) sem tratamento; B - MΦ + *L. braziliensis* + NCCb 50 µg/mL.

### 6.8. Avaliação da toxicidade aguda de NCCb em camundongos swiss

A utilização de nanocápsulas apresenta diversas vantagens já discutidas anteriormente nesse estudo, como o transporte de fármacos insolúveis em água, proteção do

ativo da degradação *in vivo* e controle na liberação de fármacos (ABDELWAHED *et al.*, 2006b). No entanto, as nanocápsulas também apresentam desvantagens, dentre elas o fato de serem derivadas de solventes orgânicos, os quais são necessários na sua preparação, e ainda a possível toxicidade do polímero utilizado como invólucro do fármaco (JÄGER *et al.*, 2007; ABDELWAHED *et al.*, 2006a; FESSI *et al.*, 1989).

Mesmo com a total eliminação do solvente orgânico e utilização de polímeros biodegradáveis, estudos toxicológicos de nanocápsulas são fundamentais para uso seguro na saúde humana visto que, o fato de ser biodegradável não significa que imediatamente após a degradação o polímero irá afastar-se do seu local de ação e ser removido do organismo (WOODRUFF e HUTMACHER, 2010). Além disso, sabe-se que alterando o tamanho das partículas, alteram-se as propriedades físico-químicas e sua interação com o organismo, fazendo-se necessário estudo toxicológico para cada nova formulação desenvolvida (YILDIRIMER *et al.*, 2011).

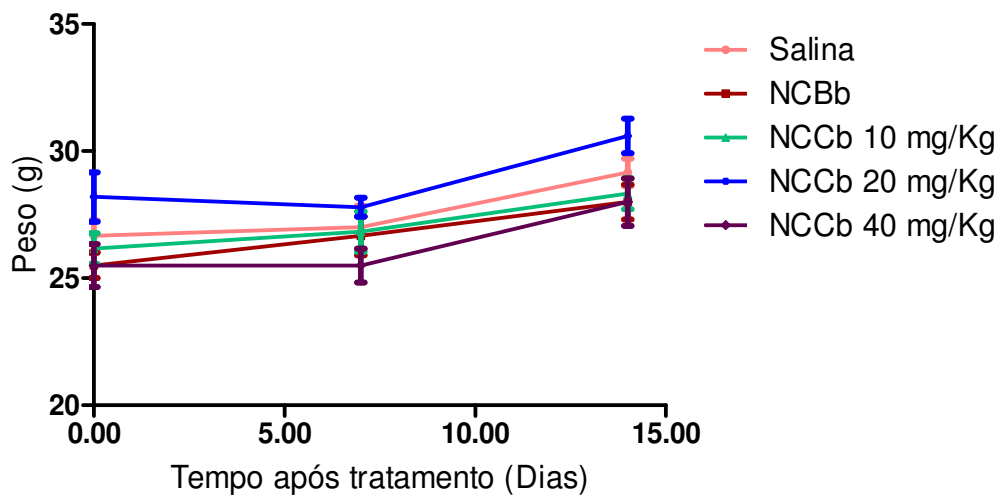
Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos adversos em um curto período de tempo, com administração da droga em dose única ou fracionada em um período não superior à 24 horas e observação clínica de sinais / sintomas durante 14 dias. São ensaios que tem potencial de oferecer dados como mortalidade, sinais clínicos, alterações de pesos corporais, identificação de órgãos-alvo e considerações farmacocinéticas preliminares (SILVEIRA *et al.*, 2019a). Nesse estudo, a toxicidade aguda de NCCb (10, 20 e 40 mg/kg, v.o. em camundongos fêmeas) foi avaliada com observação de sinais clínicos, incluindo acompanhamento de peso corpóreo e possível mortalidade, além de exames hematológicos e bioquímicos antes do tratamento e após o período de observação.

A maior dose escolhida para realização do ensaio é a quantidade máxima possível de fármaco veiculado na formulação desenvolvida (NCC) respeitando o volume máximo a ser administrado em cada animal, e está abaixo do máximo estabelecido segundo a OECD 425 (2000 mg/kg/dia). A menor dose escolhida foi com base na literatura, em que a CM apresenta atividades farmacológicas, como anti-inflamatória (LUCHINI *et al.*, 2008) e anti-edemadogênico (MARINHO *et al.*, 2003), e nesta dose foi avaliada a atividade leishmanicida.

Durante os 14 dias de estudo não foram observados a ocorrência de redução da motilidade, redução da frequência respiratória, sedação, catatonia, ptose palpebal, redução da resposta ao tato, diarreia, contorção, agressividade, grunhidos, ereção cauda, convulsão ou qualquer outro sinal que indicasse toxicidade nos grupos de animais que receberam a formulação de NCCb, NCBb ou o controle (Salina).

A evolução do peso corpóreo de animais é um indicador sensível, embora não específico, usado com frequência em testes de toxicidade (BEZERRA, 2015). Na Figura 28 é possível observar que não houve perda ou ganho significativos nos camundongos tratados de forma aguda com NCBb e NCCb em relação o controle, na primeira ou na segunda semana após o tratamento. Também não houve morte de nenhum animal nas doses testadas, o que nos leva a estimar que a DL50 da NCCb seja superior a 40 mg/kg, por via oral, em camundongos.

**Figura 28 - Evolução do peso corporal de camundongos submetidos à avaliação da toxicidade aguda da NCCb.**



Os animais foram pesados semanalmente.  $n = 6/\text{grupo}$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. do peso em gramas após 14 dias de observação. Não houve diferença significativa entre os grupos/tempo de tratamento ( $p < 0.05$ , ANOVA, teste de Tukey). E.P.M. = erro padrão da média.

Diante da ausência de sinais clínicos que indicasse toxicidade da NCCb, os estudos prosseguiram com a avaliação de seus efeitos sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais. A literatura (RESTELL *et al.*, 2014) mostra que esses parâmetros em camundongos ou ratos são influenciados por vários fatores, incluindo o local de coleta de amostras, idade, gênero, condições ambientais e estresse. Assim a presença de um grupo não tratado e a determinação dos parâmetros antes do tratamento com a droga teste são controles imprescindíveis para realização do ensaio.

A administração oral de NCCb até a dose de 40 mg/kg não provocou alterações bioquímicas significativas nos parâmetros investigados (glicose, colesterol, triglicerídeos, uréia, ALT, AST) mensurados antes e após o tratamento dos animais (Tabela 18). Estudos demonstram que a principal via metabólica da CM em roedores é a 3,4-epoxidação, gerando o

metabólito instável 3,4-epóxido que é convertido a o-HPA, o que pode resultar em hepato e nefrotoxicidade (LAKE, 1999). Contudo, no presente estudo os marcadores usados para estudar a função hepática, renal e metabólica não demonstraram diferença estatística entre o grupo tratado com a NCCb e o grupo controle ou entre as coletas em tempos diferentes do mesmo grupo.

Em humanos, a CM é rapidamente convertida ao metabólito não tóxico 7-hidroxicumarina e a condição imunológica do paciente interfere em maior proporção do que a quantidade de droga administrada (COX *et al.*, 1989). Ao contrário do que ocorre com ratos e camundongos, onde altas doses de cumarina podem produzir toxicidade e carcinogenicidade, há pouca evidência de toxicidade induzida pela CM em seres humanos, quando são administradas doses de até 114 mg / kg / dia (LAKE *et al.*, 1999).

Ademais, a composição do nanossistema (Eudragit RS100 - 10 mg/ml, Miglyol 812-19,2 mg/ml e Tween 80 - 45 mg/ml) parece também não interferir nos parâmetros bioquímicos do sangue dos animais nas condições investigadas. Um estudo de toxicidade aguda com nanossistema contendo Silimarina, um fitoterápico com efeitos antioxidante e anti-inflamatório, encapsulada com uma combinação dos polímeros Eudragit RS100 e LS100 (50 mg/kg de polímeros na proporção 1:1 por 6 dias) não revelou nenhuma alteração nos níveis de ALT, AST, ALP, creatinina e ureia sérica ou qualquer outro efeito tóxico evidente, como perda de peso, das nanopartículas carregadas ou não com o fármaco em ratos (EL-NAHAS *et al.*, 2017). Esses dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo, onde foi empregado o Eudragit RS100 para produção das NCCb e uma dose de até 400 mg/kg de polímero não apresentou toxicidade.

Em relação aos parâmetros hematológicos, também não foram observadas alterações significativas na segunda coleta em relação à primeira coleta de sangue, com exceção dos níveis de plaquetas. Nos grupos tratados com NCCb 10, 20 e 40 mg/kg houve decréscimo na ordem de 5, 24 e 27 %, respectivamente. O grupo controle /não tratado (salina) também apresentou diminuição nos níveis de plaquetas (da ordem de 15 %), sugerindo uma limitação do próprio ensaio, enquanto a formulação desenvolvida parece neutralizar esse efeito, visto que não foi observado no grupo NCBb (Tabela 19).

Tratando-se de ensaios de toxicidade aguda, a maioria das pesquisas (SILVEIRA *et al.*, 2019a; SALDANHA *et al.*, 2018; EL-NAHAS *et al.*, 2017) comparam grupos de animais tratados com um controle não tratado, realizando apenas uma coleta de sangue no fim do estudo. A comparação entre os resultados dos marcadores obtidos antes e depois do

tratamento trás vantagens como a observação do efeito do próprio ensaio e permitir que cada grupo tratado seja seu próprio controle.

A redução nos níveis de plaquetas provocada por NCCb (20 e 40 mg/kg) mais acentuada é um resultado importante pois essas células ajudam a manter a hemostasia primária e o fluxo sanguíneo dentro do vaso (HOLINSTAT, 2017). Assim, estudos adicionais sobre os parâmetros da coagulação (como tempo de sangramento, tempo de coagulação, tempo de ativação da protrombina e tempo de ativação parcial da tromboplastina) para avaliar o impacto desse efeito é necessário.

**Tabela 18 - NCCb sobre parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos na toxicidade aguda.**

Parâmetros	Tempo (dias)	Salina	NCBb	NCCb 10 mg/kg	NCCb 20 mg/kg	NCCb 40 mg/kg
<b>Glicose (mg/dl)</b>	0	249 ± 34	308 ± 24	348 ± 9	354 ± 34	363 ± 53
	14	236 ± 35	292 ± 24	362 ± 22	336 ± 34	344 ± 15
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	0	50 ± 20	47 ± 7	46 ± 11	70 ± 45	46 ± 11
	14	48 ± 21	46 ± 8	45 ± 13	68 ± 43	45 ± 11
<b>Trigli (mg/dl)</b>	0	202 ± 25	170 ± 18	206 ± 32	149 ± 20	203 ± 63
	14	184 ± 25	192 ± 27	247 ± 37	134 ± 20	186 ± 62
<b>Uréia (mg/dl)</b>	0	50 ± 32	55 ± 43	53 ± 17	44 ± 9	42 ± 12
	14	52 ± 31	58 ± 44	58 ± 12	39 ± 41	49 ± 31
<b>ALT (U/L)</b>	0	10 ± 59	22 ± 45	30 ± 29	22 ± 36	17 ± 26
	14	14 ± 17	25 ± 42	32 ± 22	20 ± 34	18 ± 27
<b>AST (U/L)</b>	0	28 ± 17	29 ± 21	34 ± 23	26 ± 8	28 ± 23
	14	30 ± 20	30 ± 20	35 ± 23	25 ± 11	30 ± 23

Valores expressos como média ± DPR. n = 6/grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos/tempo de coleta (p < 0,05, ANOVA, teste de Tukey). DPR = desvio padrão relativo. ALT = alanina aminotransferase. AST = aspartato aminotransferase. Trigli = Triglicerídeos.

**Tabela 19 - NCCb sobre parâmetros hematológicos do sangue de camundongos na toxicidade aguda.**

Parâmetros	Tempo (dias)	Salina	NCBb	NCCb 10 mg/kg	NCCb 20 mg/kg	NCCb 40 mg/kg
<b>HEM</b> ( $10^6/\text{mm}^3$ )	0	8,8 ± 5,5	8,6 ± 2,6	8,4 ± 1,7	8,9 ± 5,2	8,5 ± 3,8
	14	8,6 ± 5,6	8,6 ± 1,5	8,6 ± 3,7	7,9 ± 8,7	8,2 ± 4,9
<b>HGB</b> (g/dl)	0	14,2 ± 7,5	14,2 ± 5,0	14,1 ± 2,4	14,9 ± 6,3	14,2 ± 7,9
	14	13,3 ± 8,1	14,4 ± 3,2	14,4 ± 3,0	13,2 ± 5,3	14,1 ± 5,1
<b>HCT</b> (%)	0	46,2 ± 6,8	47,1 ± 4,9	44,4 ± 1,9	48,7 ± 6,3	46,1 ± 9,7
	14	43,8 ± 9,1	46,7 ± 1,5	47,9 ± 3,3	40,8 ± 6,3	47,2 ± 4,6
<b>VCM</b> (fl)	0	52,8 ± 4,1	54,6 ± 2,9	52,7 ± 1,2	54,9 ± 4,2	54,1 ± 6,4
	14	56,1 ± 4,9	54,2 ± 2,2	55,6 ± 2,7	54,0 ± 4,2	57,7 ± 3,3
<b>HCM</b> (pg)	0	16,3 ± 4,7	16,5 ± 4,4	16,7 ± 2,2	16,8 ± 2,3	16,6 ± 4,2
	14	17,0 ± 3,3	16,7 ± 2,9	16,8 ± 2,6	17,4 ± 2,9	17,3 ± 2,9
<b>CHCM</b> (g/dl)	0	30,8 ± 2,6	30,2 ± 3,8	31,7 ± 2,2	30,6 ± 2,4	30,8 ± 3,5
	14	30,3 ± 2,5	30,8 ± 2,5	30,2 ± 1,6	32,2 ± 1,6	29,9 ± 2,8
<b>LEU</b> ( $10^3/\text{mm}^3$ )	0	5,5 ± 39,2	3,9 ± 19,7	6,4 ± 31,9	4,7 ± 25,3	4,8 ± 26,1
	14	5,1 ± 61,7	5,6 ± 38,6	4,2 ± 44,5	5,5 ± 24,3	5,1 ± 26,9
<b>NEU</b> (%)	0	4,7 ± 4,6	6,6 ± 6,1	3,5 ± 3,2	6,0 ± 5,5	1,7 ± 0,6
	14	8,6 ± 3,9	10,4 ± 4,7	5,8 ± 2,7	14,4 ± 2,6	5,6 ± 3,6
<b>LIN</b> (%)	0	94,6 ± 5,0	93,0 ± 6,6	96,0 ± 3,5	93,7 ± 5,9	97,9 ± 0,7
	14	90,7 ± 4,5	89,3 ± 5,3	93,7 ± 3,1	85,2 ± 3,1	94,0 ± 3,8
<b>MON</b> (%)	0	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
	14	0,5 ± 0,7	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0

Parâmetros	Tempo (dias)	Salina	NCBb	NCCb 10 mg/kg	NCCb 20 mg/kg	NCCb 40 mg/kg
<b>EOS</b> (%)	0	0,4 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	14	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
<b>BAS</b> (%)	0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	14	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,3
<b>PLT</b> (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	0	107,6 ± 8,9	99,4 ± 17,9	96,8 ± 8,6	101,1 ± 8,9	93,9 ± 11,7
	14	91,2 ± 15,0	97,0 ± 8,9	91,8 ± 16,2	76,6 ± 5,0	70,3 ± 13,9
		a		a,b	a,b,c	a,b,c,d

Valores expressos como média ± DPR. n = 6/grupo. <sup>a</sup> p < 0,05 tempo 0 vs tempo 14; <sup>b</sup> p < 0,05 NCBb tempo 14; <sup>c</sup> p < 0,05 NCCb 10 mg/kg tempo 14, <sup>d</sup> p < 0,05 NCCb 20 mg/kg tempo 14 (ANOVA, teste de Tukey). DPR = desvio padrão relativo. HEM = hemácias. HGB = hemoglobina. HCT = hematócrito. VCM = volume corpuscular médio. HCM = hemoglobina corpuscular média. CHCM = concentração da hemoglobina corpuscular média. LEU = leucócitos. NEU = neutrófilos. LIN = linfócitos. MON = monócitos. EOS = eosinófilos. BAS = basófilos. PLT = plaquetas.

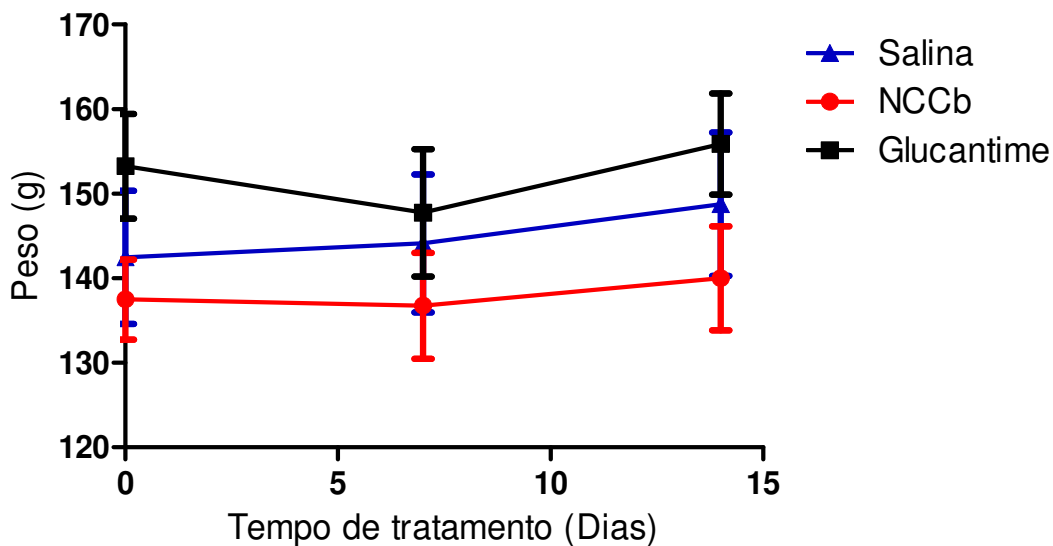
### 6.9. Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* de NCCb

Os ensaios *in vitro* são sistemas mais simples e mais facilmente controláveis, além de serem mais rápidos (alguns sujeitos à automação) e econômicos. No entanto, não são uma representação completa da resposta de um animal vivo a um medicamento, e, portanto, não permitem a extrapolação para uso em humanos. Por outro lado, os modelos em animal são complexos, requererem maior espaço físico e maior demanda de pessoal, além de mais caros e mais longos (COSTA, 2006). É possível que por esses motivos, muitas pesquisas não avancem, como visto numa revisão sobre o efeito leishmanicida de plantas medicinais brasileiras, com foco em espécies que contêm cumarinas e óleos essenciais, onde apenas 14 % dos estudos realizaram testes *in vivo* (SILVEIRA *et al.*, 2019b). Por outro lado, a ciência tem se esforçado para reduzir o uso de animais em pesquisas biomédicas, mas existem poucos modelos alternativos validados capazes de substituir completamente os ensaios em cobaias animais para a obtenção de resultados seguros (CERQUEIRA, 2008). Assim, estudos *in vivo* são indispensáveis para identificar níveis seguros de eficácia e toxicidade dos fármacos, ajudando a garantir que um medicamento represente o menor risco possível quando seja administrado em humanos.

Nesse estudo foram utilizados hamsters *Mesocricetus auratus*, uma espécie que é suscetível a infecção por *L. braziliensis* e reproduz o perfil de infecção em humanos, com inchaço e ulceração progressivos no local da inoculação, seguidos pela disseminação dos parasitas para o linfonodo drenante (COSTA *et al.*, 2014). A avaliação da carga parasitária no linfonodo drenante, além da avaliação na lesão, é importante pois mesmo em paciente curados é possível encontrar parasitos nas cicatrizes ou linfonodos anos após o sucesso do tratamento (SCORZA *et al.*, 2017).

A evolução do peso corpóreo dos animais foi avaliada, aferindo o peso antes e após 7 e 14 dias de tratamento. A Figura 29 mostra que não houve perda ou ganho de peso significativos nos hamsters tratados com NCCb (10 mg/kg/dia), salina e GLU. Esse resultado é semelhante ao obtido no estudo de toxicidade aguda realizado nesta pesquisa, onde não foi observado variações no peso de camundongos Swiss tratados com 10, 20 ou 40 mg/kg/dia de NCCb.

**Figura 29 - Evolução do peso corporal de hamster infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com NCCb.**



Os animais foram pesados semanalmente.  $n = 4/\text{grupo}$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. do peso em gramas após 14 dias de tratamento com NCCb (10 mg/kg/dia). Não houve diferença significativa entre os grupos/tempo de tratamento ( $p < 0.05$ , ANOVA, teste de Tukey). E.P.M. = erro padrão da média.

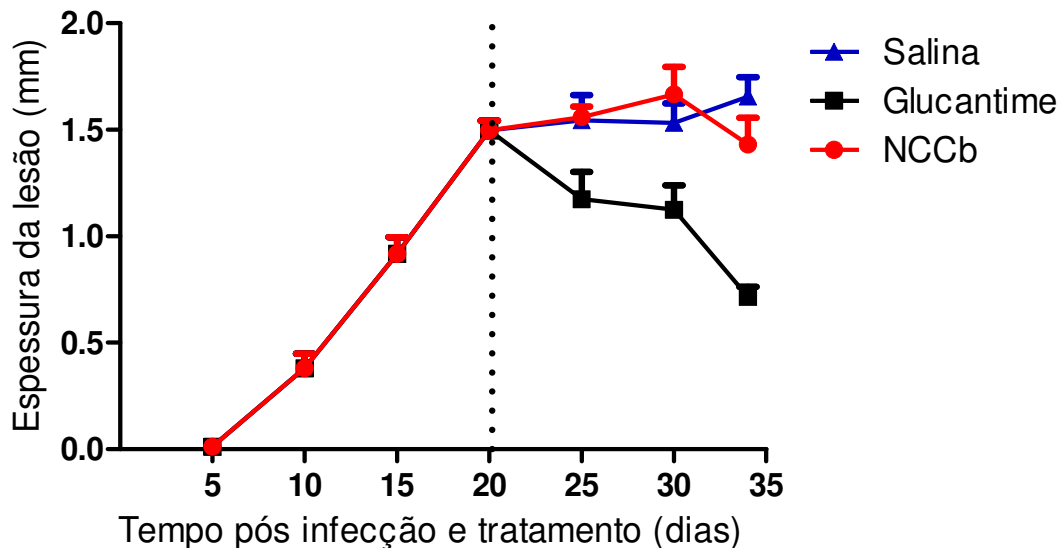
A cinética das lesões foi avaliada através da medida das orelhas (infectada e não infectada) a cada cinco dias após a inoculação do parasita na derme da orelha direita. O acompanhamento foi realizado até 35 dias após a infecção, prazo que se encerrou o tratamento



com NCCb. As medidas foram aumentando gradativamente e no vigésimo dia pós-infecção, com nódulos em tamanho médio de  $1,50 \pm 0,046$  mm, foram iniciados os tratamentos que seguiram por 14 dias.

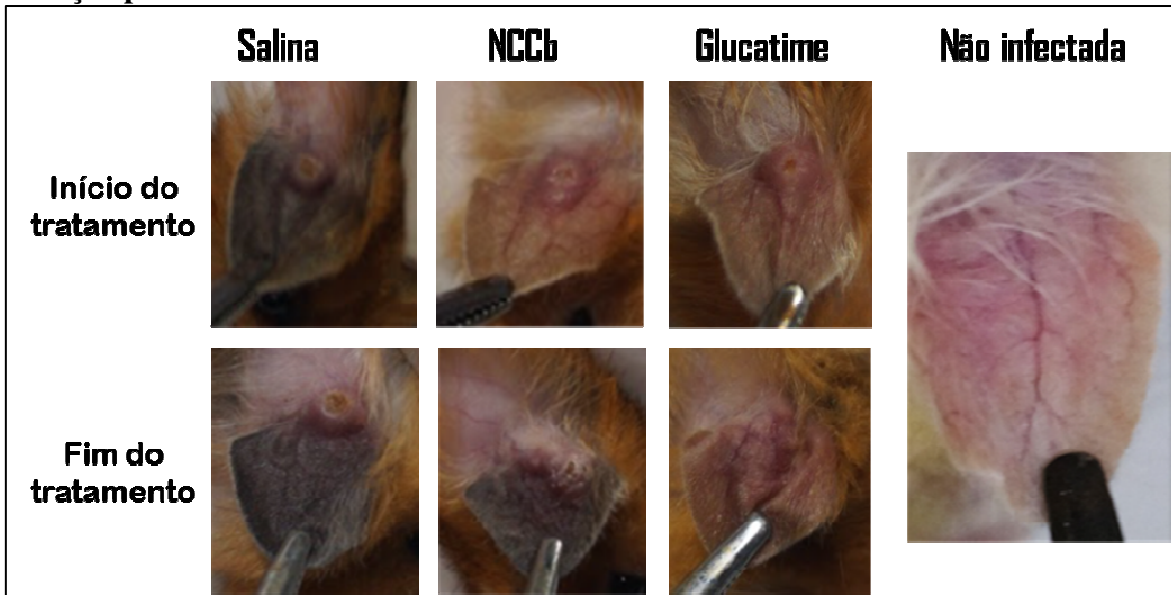
O grupo tratado com GLU (im) manteve regressão ao longo do tratamento (14 dias), com tamanho médio das lesões ao fim de  $0,72 \pm 0,046$  mm. Nesse período, o tratamento com NCCb provocou uma regressão menos acentuada da espessura das lesões ( $1,43 \pm 0,125$  mm), sem diferença significativa em relação ao início do tratamento, enquanto no grupo controle (salina) a lesão progrediu para 1,66 mm (Figura 30 e 31).

**Figura 30 - Evolução da espessura da lesão em hamsters infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com NCCb.**



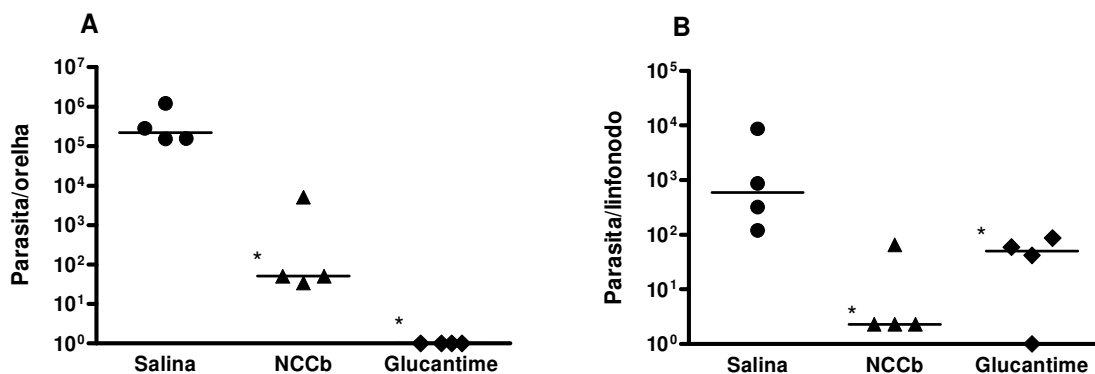
A espessura das lesões foi aferida a cada cinco dias após inoculação na derme da orelha direita com  $10^7$  promastigota de *L. braziliensis* em hamster e o tratamento (linha vertical pontilhada) com NCCb (10 mg/kg/dia), Glucantime (100 mg/kg/dia) ou salina foi realizado por 14 dias.  $n = 4$ /grupo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. da variação espessura das lesões em milímetros. E.P.M. = erro padrão da média.

**Figura 31 - Fotografias dos aspectos das lesões durante o tratamento com NCCB na infecção por *L. braziliensis*.**



Avaliando a carga parasitária nas lesões das orelhas foi possível observar que houve redução do número de parasitos nos grupos tratados com NCCb ( $1,3 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^5$ ) e GLU ( $1,0 \times 10^5 \pm 0,01$ ), diferente daquele tratado com salina ( $4,4 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^5$ ) (Figura 32A). No linfonodo drenante da lesão, NCCb reduziu o número de parasitos ( $1,8 \times 10^1 \pm 1,6 \times 10^1$ ) a valores inferiores ao grupo tratado com GLU ( $4,7 \times 10^1 \pm 1,7 \times 10^1$ ), sendo significativamente diferente do controle ( $2,4 \times 10^3 \pm 2,1 \times 10^3$ ) (Figura 32B).

**Figura 32 - Carga parasitária na lesão (A) e no linfonodo drenante da lesão (B) em hamster infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com NCCb.**



Número de parasitas nas orelhas (A) e linfonodos de drenagem (B) de hamster inoculados na derme da orelha direita com  $10^7$  promastigota de *L. braziliensis* e divididos em 3 grupos: não tratado - salina; tratado com Glucantime; tratado com NCCb (10 mg/kg/dia). Grupos de animais ( $n = 4$ /grupo) foram eutanasiados na segunda semana pós tratamento. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. Significância estatística vs salina (\* $p < 0,05$ ). E.P.M. = erro padrão da média.

A atividade leishmanicida do ativo livre foi avaliada em hamsters *Mesocricetus auratus* em estudo anterior realizado pelo nosso laboratório (dados ainda não publicados) seguindo o mesmo protocolo usado nesta pesquisa, onde não foi observado diferença significativa no número de parasitos encontrados nas lesões das orelhas após tratamento por 14 dias com a CM - 20 mg/kg/dia ( $9,4 \times 10^5 \pm 5 \times 10^5$ ) em relação ao grupo que recebeu salina ( $4,4 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^5$ ). No linfonodo drenante da lesão, o tratamento com CM foi eficaz, reduzindo o número de parasitos para  $1,3 \times 10^1 \pm 1,2 \times 10^1$ .

Ao comparar os resultados obtidos entre os dois estudos realizados, é possível observar que a CM encapsulada foi capaz de reduzir o número de parasitas nas lesões das orelhas, enquanto que a CM livre, com uma dose 2 vezes maior que NCC, não mostrou atividade. No linfonodo drenante da lesão, mesmo com metade da dose, NCCb mostrou atividade semelhante a CM livre. Ainda, é importante ressaltar que o efeito leishmanicida apresentado pela NCCb administrada de forma oral foi mais eficaz no linfonodo drenante da lesão que o GLU (antimônio de meglumina - 27mg/kg/dia) administrado via intramuscular, mesmo em dose menor (10 mg/kg/dia).

Esses resultados corroboram com estudo que mostrou a eficácia oral melhorada da quercetina (Qc, flavonóide) quando encapsulada em nanocápsulas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) para tratamento da leishmaniose cutânea em camundongos. A pesquisa mostrou que o tratamento com Qc livre (16 mg /kg) reduziu os tamanhos das lesões e a carga do parasita em 38 e 71%, respectivamente, e quando encapsulada (0,4 mg /kg) a redução foi de 64 e 91%, respectivamente (SOUSA-BATISTA *et al.*, 2017)

Ainda, uma chalcona (3-nitro-2-hidroxi-4,6-dimetoxicalcona) com atividade leishmanicida reduziu a carga parasitária em 86% após três semanas de aplicação tópica em camundongos infectados com *Leishmania amazonenses*, quando encapsulada em nanocápsulas de Poli- $\epsilon$ -caprolactona, enquanto que livre foi ineficaz (ESCRIVANI *et al.*, 2019).

No entanto, a redução da carga parasitária observada neste estudo não está associada com a discreta redução da espessura da lesão, sendo possível que ainda exista inflamação da lesão. Em pesquisa onde os eventos inflamatórios durante a infecção por *Leishmania braziliensis* em camundongos foram investigados (TEIXEIRA *et al.*, 2005), lesões grandes foram diretamente associadas com a reação inflamatória, mas não com a carga parasitária. No estudo, duas cepas diferentes de *L. braziliensis* induziram distintos ritmos de

respostas inflamatórias, diferindo no tamanho e persistência da lesão, mesmo sem diferença significativa entre o número de parasitas 15 dias após a infecção.

Ademais, destaca-se a importância do efeito leishmanicida administrado via oral frente às limitações que a terapia atual apresenta. Em um estudo com Psoralidina, molécula com atividade anticâncer e insolúvel em água, foi usado o polímero Eudragit S100 e quitosana para encapsulamento em nanocápsulas. Um ensaio lipolítico demonstrou que essas nanocápsulas não foram degradadas pela lipase e, após a administração oral, sua biodisponibilidade foi significativamente aumentada (339,02% em relação à suspensão do fármaco livre) devido a excelente adesão intestinal e permeabilidade transepitelial (YIN *et al.*, 2016). Assim, os resultados obtidos com NCC mostraram-se promissores, justificando a nanoencapsulação da CM.

## CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido (CLAE - DAD) para análise da CM em NCC foi validado, mostrando-se específico, linear, preciso, exato e robusto em determinadas circunstâncias.

Obteve-se um Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CM com características tecnológicas interessantes, mas a citotoxicidade das formulações (com e sem ativo) equiparou-se ao padrão citotóxico (ensaio MTT em macrófagos J774) e inviabilizou os ensaios *in vitro* para avaliação da atividade leishmanicida, fazendo com que o mesmo fosse descontinuado no presente trabalho.

Este estudo demonstrou a viabilidade da obtenção de nanocápsulas de Eudragit® RS100 contendo o ativo CM pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado. A otimização do nanosistema (NCC) permitiu o desenvolvimento de suspensões coloidais com tamanho de 210 nm, distribuição homogênea, baixa polidispersividade e melhor percentual de encapsulamento, com boa estabilidade durante o período de estudo (nove meses).

A NCC mostrou ausência de citotoxicidade em macrófagos, enquanto a administração aguda da mesma em camundongos não provocou alterações comportamentais ou bioquímicas, mas causou redução no número de plaquetas a ser melhor investigado.

Em macrófagos infectados por *L. braziliensis*, NCC foi capaz de reduzir a carga parasitária e na avaliação farmacológica em hamster, as nanocápsulas de CM mostraram atividade leishmanicida, com redução da carga parasitária nas orelhas e linfonodos dos animais, não associada com a discreta redução da espessura da lesão.

As informações geradas por este estudo em relação a nanocápsulas contendo CM mostram uma nanoformulação farmacêutica promissora para o tratamento da leishmaniose e incentivam estudos que investiguem como a nanoencapsulação da CM pode agregar vantagens no tratamento de outras doenças.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot of freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly (vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006a.

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug delivery Reviews**, v. 58, p. 1688-1713, 2006b.

AERTS, C.; VINK, M.; PASHTOON, S. J.; NAHZAT, S.; PICADO, A.; CRUZ, I.; SICURI, E. Cost Effectiveness of New Diagnostic Tools for Cutaneous *Leishmaniasis* in Afghanistan. **Applied Health Economics and Health Policy**. 2018.

AGEVISA - Agência estadual de vigilância em Saúde de Rondônia. Agevisa faz alerta sobre leishmaniose, doença que fez 3,3 mil vítimas em Rondônia desde 2014. Disponível em: < <https://www.newsrodonia.com.br/noticias/endemias+agevisa+faz+alerta+sobre+leishmanios+doenca+que+fez+33+mil+victimas+em+rondonia+desde+2014/92677> >. Acesso em: 20 mar. 2020.

ALCÂNTARA, L. M.; FERREIRA, T. C. S.; GADELHA, F. R.; MIGUEL, D. C. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on *Leishmaniasis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430-439. 2018.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 168–172, 2004.

ALONSO, M. J. **Nanoparticulate drug carrier technology**. In: COHEN, S. BERNSTEIN, H. Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines. New York: Marcel Dekker. Cap. 7, p. 203-242, 1996.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v.10, n.3, 2003.

ALVES, M. P.; SCARRONE A. L.; SANTOS M.; POHLMANN A. R.; GUTERRES S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

AMARAL, H. H. S. **Extrato seco padronizado de *Amburana Cearensis* cultivada e constituintes químicos modulam a inflamação em um novo modelo de asma exacerbada em camundongos balb/c e a resposta neutrofílica *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

ASLAN, B.; OZPOLAT, B.; SOOD, A. K.; LOPEZ-BERESTEIN, G. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of drug Targeting**, v. 21, n. 10, p. 904-913, 2013.

AZZINI, R. G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácido carboxílicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora Unicamp, 1996.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A.; Leishmaniose tegumentar americana: história, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BASILE, A.; SORBO, S.; SPADARO, V.; *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (apiaceae). **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 939–952, 2009.

BEIJA, M.; SALVAYRE, R.; VIGUERIE, N. L.; MARTY, J. Colloidal systems for drug delivery: from design to therapy. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 485-496, 2012.

BEKHIT, A. A., EL-AGROUDY, E., HELMY, A., IBRAHIM, T. M., SHAVANDI, A., BEKHIT, A. E. A. *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 160, p. 229-2445, 2018.

BENDER, E. T.; RIBEIRO, J. A.; PEREIRA, A. A. M.; ROMAN, S. S. Avaliação da toxicidade aguda de nanocápsulas contendo anti-inflamatórios em ratos. **6º congresso internacional em saúde**, Universidade Regional do Noroeste, Rio Grande do Sul, Brasil, 2019.

BENITA, S. Microencapsulation: methods and industrial applications, **Marcel Dekker**, p. 640, New York, 1996.

BEZERRA, S. B. **Avaliação da segurança e eficácia farmacológica nãoclínica das gotas arthur de carvalho®: validação do uso medicinal nos distúrbios gastrintestinais**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

BISCHOFF, S.C., Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Curr Opin Nutr Metab Care**, v. 11, p. 733-740, 2008.

BLOUZA, I. L.; CHARCOSSET, C.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

BOURGAUD, F.; HEHN, A.; LARBAT, R.; DOERPER, S.; GONTIER, E.; KELLNER, S.; MATERN, U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2-3, p. 293–308, 2006.

BRASIL - ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Versão 2, Brasília, DF, 2013.

BRASIL - ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 166 de 24 de julho de 2017. Determina a publicação do guia para

validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2017.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose tegumentar 2017, 2019. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/Leish-2017-novo-layout.pdf>>. Acesso em: 8 mai. 2020.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior. Nanopartícula, processo de encapsulação simultânea de nanopartículas magnéticas e fármacos, composição farmacêutica para o tratamento de câncer e uso de nanopartículas magnéticas e fármacos encapsulados simultaneamente. Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio De Janeiro, 2015.

BRASIL. DATASUS. Leishmaniose Tegumentar Americana- casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação-Sinan Net, 2015. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf> >. Acesso em: 22 jun 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Leishmaniose Tegumentar (LT): o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção, 2020. Disponível em: < <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>>. Acesso em: 20 mar 2020.

BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A. T.; MUNOZ, V. O.; CALLAPA, J.; MEN-OLIVIER, L. L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 71-4, 1999.

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BUBOLS, G. B.; VIANNA, D. D. R.; MEDINA-REMON, A.; VON POSER, G.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; EIFLER-LIMA, V. L.; GARCIA, S. C. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 318–34, 2013.

BURFIELD, T. Coumarin: The Real Story. **Copyright**, 2008.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. *Leishmaniasis*. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, sep. 2018.

BVS - BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. Benzopiranos. Disponível em: <[http://www.bvsalut.coc.fiocruz.br/php/decsws.php?tree\\_id=D03.633.100.150&lang=pt](http://www.bvsalut.coc.fiocruz.br/php/decsws.php?tree_id=D03.633.100.150&lang=pt)>. Acesso em: 03 mar. 2020.

CALIXTO, J. B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A. R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 6, n. 2, p. 261-79, 2001.



CARVALHO, C. E.; SOBRINHO-JUNIOR, E. P.; BRITO, L. M.; NICOLAU, L. A.; CARVALHO, T. P.; MOURA, A. K.; RODRIGUES, K. A.; CARNEIRO, S. M.; ARCANJO, D. D.; CITÓ, A. M.; CARVALHO, F. A. Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 59-67, 2017.

CASLEY-SMITH & JAMAL, 1993; CASLEY-SMITH, J. R.; JAMAL, S. Reduction of filiaritic lymphoedema and lephantiasis by 5,6 benzomt-pyrone (coumatin), and the effects of diethylcarbamazine (DEC). **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 8, p. 247–258, 1993.

CEARÁ – Secretaria de Saúde do estado. Boletim Epidemiológico Leishmaniose Visceral. 19 de dezembro de 2019.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Cienc. Cult.**, v. 60, n. 2, 2008.

CHAKTHONG, S.; WEAARYEE, P.; PUANGPHET, P.; *et al.* Alkaloid and coumarins from the green fruits of *Aegle marmelos*. **Phytochemistry**, v. 75, p. 108–113, 2012.

CHAVES, D. S. A.; COSTA, S. S.; ALMEIDA, A. P.; FRATTANI, F.; ASSAFIM, M.; ZINGALI, R. B. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v. 33, n.1, 2010.

CHENG, J. F.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KASHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A.; SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A. M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF-alpha inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 14, p. 2411-2415, 2004.

CHIANG, C. C.; CHENG, M. J.; PENG, C. F.; HUANG, H. Y.; CHEN, I. S. A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*. **Chemistry and Biodiversity**, vo 7, n. 7, p. 1728–1736, 2010.

CLODIUS & PILLER, 1982; CHENG, J. F.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KASHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A.; SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A. M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF-alpha inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 14, p. 2411-2415, 2004.

COSTA L. E.; ALVES P. T.; CARNEIRO A. P.; DIAS A. C. S.; FUJIMURA P. T.; ARAUJO G. R.; TAVARES G. S. V.; RAMOS F. F.; DUARTE M. C.; MENEZES-SOUZA D.; *et al.* *Leishmania infantum* beta-Tubulin Identified by Reverse Engineering Technology through Phage Display Applied as Theranostic Marker for Human Visceral *Leishmaniasis*. **Int. J. Mol. Sci.**, n. 20, 2019.

COSTA, A. B. G.; VIEIRA, T. S. S.; SILVA, R. P.; MESQUITA, A. L. F.; FERNANDES, J. R. M.; SARAIVA, E. M. 3'nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infection And Immunity**, v.82, n.4, p.1732-1740, 2014.

COSTA, D.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; SILVA, N. M.; MILANEZI, C. M.; CARDOSO, C. R.; GIUDICE, A.; JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S. BALB/c Mice Infected with Antimony Treatment Refractory Isolate of

*Leishmania braziliensis* Present Severe Lesions due to IL-4 Production. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 3, 2011.

COSTA, R. N. **Estudo da aplicabilidade do ensaio de quantificação de proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial de irritação ocular de xampus e tensoativos.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

COX, D.; O'KENNEDY, R.; THORNES, R. D. The Rarity of Liver in Patients Treated with Coumarin (1,2-Benzopyrone). *Human Toxicology*, v. 8, p. 501-506, 1989.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in *Leishmaniasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19, n.1, p. 111-26, 2006.

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. *Review Pharmacol Rep*, v. 71, n. 1, p. 156-166, 2019.

DALCIN, A. J. F.; VIZZOTTO, B. S.; BOCHI, G. V.; GUARDA, N. S.; NASCIMENTO, K.; SAGRILLO, M. R.; MORESCO, R. N.; SCHUCH, A. P.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P. Nanoencapsulation of the Flavonoid Dihydromyricetin Protects Against the Genotoxicity and Cytotoxicity Induced by Cationic Nanocapsules. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 173, p. 798-805, 2019.

DE MOURA, T. R.; NOVAIS, F. O.; OLIVEIRA, F.; CLARENCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Towards a novel experimental model of infection to study American cutaneous *Leishmaniasis* caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*, v. 73, p. 5827-5834, 2005.

DOMINGUES, G. S. **Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação *in vitro* de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quím. Nova*, v.31, n.8, 2008.

DURAND, R.; PAUL, M.; RIVOLLET, D.; HOUIN, R.; ASTIER, A.; DENIAU, M. Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. *Int. J. Parasitol.*, v. 27, n. 11, p. 1361–1367, 1997.

EGAN, D.; KENNEDY, R.; MORAN, E.; COX, D.; ROSSER, E.; THORNES, R. D. The pharmacology. Metabolism, analysis. And applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, v. 22, n. 5, p. 503-529, 1990.

EL-NAHAS, A. E.; ALLAM, A. N.; ABDELMONSIF, D. A.; EL-KAMEL, A. H. Silymarin-Loaded Eudragit Nanoparticles: Formulation, Characterization, and Hepatoprotective and Toxicity Evaluation. *AAPS PharmSciTech*, v. 8, p. 3076-3086, 2017.

ESCRIVANI, D. O.; LOPES, M. V.; POLETTO, F.; FERRARINI, S. R.; SOUSA-BATISTA, A. J.; STEEL, P. G.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; ROSSI-BERGMANN, B.

Encapsulation in lipid-core nanocapsules improves topical treatment with the potent anti*Leishmanial* compound CH8. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 2019.

ESPUELAS, M.; LEGRAND, P.; LOISEAU, P.; BORRIES, C.; BARRAT, G.; IRACHE, J. *In vitro* anti*Leishmanial* activity of amphotericin B loaded in Poli( $\epsilon$ -caprolactone) nanospheres. **Journal of Drug Targeting**, v. 10, p. 593–599, 2002.

FALQUEIRO, A. M.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C. Selol-load magnetic nanocapsules: a new approach for hyperthermia cancer therapy. **Journal of Applied Physics**, v. 109, n. 7, 2011.

FANG, C.; AL-SUWAYEH, S.; FANG, J. Y. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. **Recent patents on nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2013.

FERREIRA, C. D.; NUNES, I. L. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food Market. **Nano Review**, v. 14, n. 9, 2019.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; SILVA, J. M. F. L.; SANTOS, F. A. V.; CÁSSIO, R.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M. O.; COLARES, A. V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, J. C. F.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**, v. 2013, 5 pages, 2013.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz - Departamento de Protozoologia - Lab. de Imunomodulação. As leishmanioses, 1997. Disponível em: <[http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/ciclo\\_biol\\_gico.htm](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/ciclo_biol_gico.htm)>. Acesso em: 29 nov. 2019.

FONSECA, YRIS MARIA, **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. Ribeirão Preto, 2007.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **Plo S One**, v. 6, p. 1-7, 2011.

GALVÃO, E. L.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of azole therapy for tegumentary *Leishmaniasis*: A systematic review and metaanalysis. **Plos One**, v. 12, n. 10, 2017.

GALVÃO, J. G. **Desenvolvimento de formulação cosmética contendo carreadores lipídicos nanoestruturados à base de manteiga de Ourateasp. : uma estratégia nanotecnológica para o aumento da hidratação cutânea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Sergipe, 2015.

GARRARD, A. Coumarins. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1052–1054. 2014.

GAUMET, M.; VARGAS A.; GURNY R.; DELIE F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1- 9, 2008.

GHATE, M.; KUSANUR, R. A.; KULKARNI, M. V. Synthesis and *in vivo* Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Some Bi Heterocyclic Coumarin Derivatives. *Eur J Med Chem.*, v. 40, n.9, p. 882-887, 2005.

GHOBAKHLOO, N.; MOTZADIAN, M. H., FARDAEI, M. Expression Analysis of Multiple Genes May Involve in Antimony Resistance among *Leishmania* major Clinical Isolates from fars province, Central Iran. **Journal Parasitology**, v. 11, n. 2, p. 168-176, 2017.

GHOLAP, V. V.; KOSMIDER, L.; HALQUIST, M. S. A Standardized Approach to Quantitative Analysis of Nicotine in e-Liquids Based on Peak Purity Criteria Using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, 2018.

GOMES, G. S.; MACIEL, T. R.; PIEGAS, E. M.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; FREDDO, R. J.; ÁVILA, D. S.; GUNDEL, A.; HAAS, S. E. Optimization of Curcuma Oil/Quinine-Loaded Nanocapsules for Malaria Treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n.2, p. 551–564, 2017.

GÓMEZ-OUTES, A.; SUÁREZ-GEA, M. L.; CALVO-ROJAS, G.; LECUMBERRI, R.; ROCHA, E.; POZO-HERNÁNDEZ, C.; TERLEIRA-FERNÁNDEZ, A. I.; VARGAS-CASTRILLÓN, E. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. **Curr Drug Discov Technol**, v. 9, n. 2, p. 83-104, 2012.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C, E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2018.

GRADISHAR, W. J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane. **Expert Opin Pharmacother.**, v. 7, n. 8, p. 1041-53, 2006.

GUERRA, Priscila Valera. **Efeito protetor de CXCL10 em infecção experimental por *Leishmania braziliensis***. Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

HAN, F.; Li, S.; Yin, R.; Liu, H.; Xu, L. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 315, n. 1, p. 210-216, 2008.

HANY, M. H.; EL GAZAYERLY, O. N. Rice bran solid lipid nanoparticles: Preparation and characterization. **International Journal of Research in Drug Delivery**, 2011.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013a

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013b.

HOU, S.; HSIA, C.; TSAI, C.; HSIA, C.; JAYAKUMAR, T.; VELUSAMY, M.; SHEU, J. Modulation of Human Platelet Activation and *in vivo* Vascular Thrombosis by Columbianadin: Regulation by Integrin  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 Inside-Out but Not Outside-In Signals. **J Biomed Sci.**, v. 27, n. 1, p. 60, 2020.

HOULI, L.; XIAOBIN, Z.; YUKUN, M.; GUANGXI, Z.; LINGBING, L.; HONGXIANG, L. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. **J Control Release**, v. 133, p. 238–244, 2009.

HOULT J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **Gen Pharmacol**, v. 27, p. 713-722, 1996.

HU, X.; XU, Z.; LIU, M.; FENG, L.; ZHANG, G. Recent Developments of Coumarin Hybrids as Anti-fungal Agents. **Curr Top Med Chem**, v. 17, n. 29, p. 3219-3231, 2017.

ICH - INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of analytical procedures: text and methodology. 2014.

ISMAIL, T.; SHAFI, S.; SINGH, S.; SIDIQ, T.; KHAJURIA, A.; ROUF, A.; YADAV, M.; SAIKAM, V.; SINGH, P. P.; ALAM, M. S.; ISLAM, N.; SHARMA, K.; KUMAR, H. M. S. Synthesis and immunopotentiating activity of novel isoxazoline functionalized coumarins. **Eur J Med Chem**, 2016.

JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsules polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 297-305, 2007.

JAIN, R.; SHAH, H. N.; MALIK, A. W.; RHODES, T. C. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 124, n. 8, p. 703-727, 1998.

KALANTARI, H.; HEMMATI, A.; BAVARSAD, N.; REZAIE, A.; AHMADI, S. Effect of topical Nanoliposomes of Paromomycin on Rats Liver and Kidney. **Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, n. 4, 2014.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v. 22, p. 439–445, 2006.

KANG, J. I.; HONG, J. Y.; CHOI, J. S.; LEE, S. K. Columbianadin inhibits cell proliferation by inducing apoptosis and necroptosis in HCT116 colon cancer cells. **Biomol Ther.**, v. 24, n. 3, p. 320–327, 2016.

KANG, S. Y.; LEE, K. Y.; SUNG, S. H.; KIM, Y. C. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*. **J Nat Prod**, v. 68, p. 56–59, 2005.

KANSAL, S.; TANDON, R.; VERMA, P. R. P.; DUBE, A.; MISHRA, P. R. Development of doxorubicin loaded novel core shell structured nanocapsules for the intervention of visceral *Leishmaniasis*. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, n. 5, p. 441–450, 2013.

KARMAKAR, S.; PAUL, J.; DE, T. *Leishmania donovani* gly-cosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. **Eur J Immunol** v. 41, p. 1376-1387, 2011.

KASHMAN, Y.; GUSTAFSON, K. R.; FULLER R. W.; *et al.*, The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 15, p. 2735–2743, 1992.

KEIPER, A. The nanotechnology revolution. **New Atlantis Spring**. v. 17, p. 34, 2003.

KHARASCH, E. D.; HANKINS, D. C.; TARADAY, J. K. Single-dose methoxsalen effects on human cytochrome P-450 2A6 activity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 28, n. 1, p. 28–33, 2000.

KHOSA, A.; REDDI, S.; SAHA, R. N. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. **Review Biomed Pharmacother**, v. 103, p. 598-613, 2018.

LACY, A.; KENNEDY, R. Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 3797-3811, 2004.

LAKE, B. G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. **Review Food Chem Toxicol**, v. 37, n. 4, p. 423-53, 1999.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, p. 5-10, 1998.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v. 4, p. 221-227, 1997.

LEAL, L. K. A. M.; FERREIRA, A. A. G.; BEZERRA, G. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J Ethnopharmacol**, v. 70, p. 151–159, 2000.

LEAL, L. K. A. M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, R. A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and Smooth Muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 335-340, 2003.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LERTSUTTHIWONG, P.; NOOMUN, K.; LONGAROONNGAMSAND, N.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 209-214, 2008.

LERTSUTTHIWONG, P.; ROJSITTHISAK, P.; NIMMANNIT, U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 856-860, 2009.

LI, Y.; WING, M. K.; LIUAC, K. Endocytosis of PEGylated nanoparticles accompanied by structural and free energy changes of the grafted polyethylene glycol. **Biomaterials**, v. 35, n. 30, p. 8467-8478, 2014.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H. ; K. MADER, K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 214, p. 9–12, 2001.

LIU, D; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular Microbiology and Infection**; v. 2,n. 83, 2012.

LUCHINI, A. C.; RODRIGUES-ORSI, P. ; CESTARI, S. H.; SEITO, L. N.; WITAICENIS, A.; PELLIZZON, C. H.; DI STASI, L. C. Intestinal Anti-inflammatory Activity of Coumarin and 4-Hydroxycoumarin in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 7, p. 1343-1350, 2008.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 4, p. 221-241, 1991.

MAKADIA H. K.; SIEGEL S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled **Drug Delivery Carrier**. **Polymers**, n. 3, p. 1377–1397, 2011.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zeta sizer nano series**. Manual do usuário. V1.1. Worcestershire, 2013. 250p. 2013.

MARCHAL-HEUSSLER, L.; MAICENT, P.; HOFFMAN, M.; SPITTLER, J.; COUVREUR, P. Antiglaucomatous activity of betaxolol chlorhydrate sorbed onto different isobutylcyanoacrylate nanoparticle preparation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 115. 1990.

MARINHO, M. G. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A.; ANJOS-CARVALHO, K.; BEZERRA, S. C. R.; CAVALCANTI, A. L. H.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R. *Amburana cearensis* e Cumarina Imunomodulam os Níveis de anticorpos antígeno-específicos em camundongo Balb/c sensibilizados com Ovoalbumina. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, p. 47-52, 2003.

MARSHALL, M. E.; MOHLER, J. L.; EDMONDS, K.; WILLIAMS, B.; BUFFER, K.; RYLES, M.; WEISS, L.; URBAN, D.; BUESCHEN, A.; MARKIEWICZ, M.; CLOUD, G. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. **Cancer Res Clin Oncol**, v. 120, 1994.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.32, n. 5, São Paulo, 2006.

MATOS, B. N.; OLIVEIRA, P. M.; AREDA, C. A.; CUNHA-FILHO, M. S. S.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Preparações farmacêuticas e cosméticas com uso de nanotecnologia. **Brasília Med.**, v. 52, n. 1, p. 8-20, 2015.

MCKEE, T. C.; FULLER, R. W.; COVINGTON, C. D. *et al.*, New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 8, p. 754–758, 1996.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid NPs: Production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, p. 165–96, 2001.

MENDONÇA, L. A. **Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação**. Dissertação (Mestrado em estatística aplicada e biometria) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MUKAKA, M. M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69-71, 2012.

MÜLLER, R. H. *et al.* Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 522-530, 2007.

MULLER, R. H.; MAASSEN, S.; WEYHERS, H.; MEHNERT, W. Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid NPs (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. **J Drug Targeting**, v. 4, p. 161–70, 1996.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 343-356, 2004.

MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, R. A. *The Natura/Coumarins*. **New York: John Wiley and Sons**, 1982.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. The anti*Leishmanial* activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2071–2077, 2006.

NEUHAUS-CARLISLE, K.; VIERLING, W.; WAGNER, H. Screening of plant extracts and plant constituents for calcium-channel blocking activity. **Phytomedicine**, v. 4, p. 67-69, 1997.

NEVES, David Pereira *et al.* **Parasitologia Humana**. 11. ed. Belo Horizonte: Atheneu, 2005.



NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, p. 629–661, 2016.

NEWMAN, R. A.; CHEN, W.; MADDEN, T. L. Pharmaceutical properties of related calanolide compounds with activity against human immunodeficiency virus. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 9, p. 1077–1080, 1998.

NORTHFELT, D. W.; MARTIN, F. J.; WORKING, P.; VOLBERDING, P. A.; RUSSELL, J.; NEWMAN, M.; AMANTEA, M. A.; KAPLAN, L. D. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-found polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. **J Clin Pharmacol.**, v. 36, n. 1, p. 55-63, 1996.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue Damage and Immunity in Cutaneous *Leishmaniasis*. **Review Parasite Immunol**, v. 34, n. 12, p. 551-61, 2012.

ODDONE, R.; SCHWEYNOCH, C.; SCHÖNIAN, G.; DE SOUSA, C. S.; CUPOLILLO, E.; ESPINOSA, A. J.; NOYES HM KUHL, K. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 9, p. 2818–2825, 2017.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1997.

OPAS/OMS – Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial da Saúde. *Leishmanioses – Informe Epidemiológico das Américas Nº 7, março, 2019*. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>>. Acesso em: 29 nov. 2019.

PAHO – WHO. Pan American Health Organization - World Health Organization. *Manual of procedures for Leishmaniases surveillance and control in the Americas*. 187p, Washington, D.C., 2019.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170–184, 2009.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; EGGLESTON, D. S.; *et al.* The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 26, p. 4131–4138, 1993.

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data, **Applied Optics**, v. 45, p. 2209-2216, 2006.

PAYÁ, M.; GOODWIN, P. A.; DE LAS HERAS, B.; HOUK, J. R. S. Superoxide scavenging activity in leukocytes and absence of cellular toxicity of a series of coumarins. **Biochem Pharmacol**, v. 48, p. 445-451, 1994.

PAYÁ, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J. R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochem Pharmacol**, v. 44, p. 205-214, 1992.

PINEHIRO, M. G. M. S. **Bioprospecção de produtos naturais leishmanicidas a partir de *Amburana cearensis***. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

POOLE, S. K.; POOLE, C. F. Thin-layer chromatographic method for the determination of the principal polar aromatic flavour compounds of the cinnamons of commerce. **The Analyst**, v. 119, n. 1, p. 113–120, 1994.

PROFIRIO, D. M. **Preparação de nanopartículas de plga contendo carboplatina e sua funcionalização com folato de quitosana**. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

RASHIDZADEH, H.; SALIMI, M.; SADIGHIAN, S.; ROSTAMIZADEH, K.; RAMAZANI, A. *In vivo* Antiplasmodial Activity of Curcumin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **Curr Drug Deliv**, v. 16, n. 10, p. 923-930, 2019.

RESTELL, T. I.; PORFIRIO, L. C.; SOUZA, A. S.; SILVA, I. S. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. **Acta Cir. Bras.** v.29, n. 5, p. 306-12, 2014.

REY, L. ***Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. In: Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quim Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RIBEIRO, T.G., CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A., DIOGO G. VALADARES, D. G., FRANCA, J. R., LAGE, P. S., DUARTE, M. C., ANDRADE, P. H. R., MARTINS, V. T., COSTA, L. E., LA ARRUDA, A., FARACO, A. A. G., COELHO, E. A. F., CASTILHO, R. O. Anti*Leishmanial* activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**. v. 143, p. 60-68, 2014.

RIEUX, A.; FIEVEZ, V.; GARINOT, M.; SGHNEIDER, Y. J. PRÉAT, V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A Mechanistic Approach. **J Control Release**, v. 116, n. 1, p.1-27, 2006.

RIZWANULLAH, M.; AHMAD, J.; AMIN, S. Nanostructured Lipid Carriers: A Novel Platform for Chemotherapeutics. **Review Curr Drug Deliv**, v. 13, n. 1, p. 4-26, 2016.

RODRIGUES, J. M.; CROFT, S. L.; FESSI, H.; BORIES, C.; DEVISSGUET, J. P. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (D, L-lactide) nanoparticles in *Leishmania donovani* infected mice. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 45, p. 223–228, 1994.

RODRIGUES, Rafaela da Fonseca. Extração da cumarina a partir das sementes da *Amburana* (*torresea cearensis*) utilizando dióxido de Carbono supercrítico. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SAHARAN, P.; BAHMANI, K.; SAHARAN, S. P. Preparation, Optimization and *In vitro* Evaluation of Glipizide Nanoparticles Integrated with Eudragit RS-100. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, 2019.

SALDANHA, G. B.; SALDANHA, G. B.; DE SOUSA, M. R. S. C.; OLIVEIRA, G. L. DA S.; DA SILVA, A. P. DOS S. C. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Absence of toxicity in Swiss mice following treatment with 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin: Acute and repeated-dose toxicity study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 75-82, 2018.

SALEEM, K.; KHURSHEED, Z.; HANO, C.; ANJUM, I.; ANJUM, S. Applications of Nanomaterials in *Leishmaniasis*: A Focus on Recent Advances and Challenges. **Nanomaterials (Basel)**, v. 9, n. 12, p. 1749, 2019.

SANTOS, E. P. S. & BARBOZA, J. C. S. Avaliação do uso de amidos aniônicos hidrolisados como estabilizantes em nanocápsulas poliméricas para formulações tópicas. **Polímeros**, v.23, n. 5, 2013.

SANTOS, G. S.; PEREIRA, G. G.; BENDER, E. A.; COLOMÉ, L. M.; GUTERRES, S. S.; CARVALHO, D. C. M.; WEISSMÜLLER, G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas destinadas à aplicação tópica de dapsona. **Quím. Nova**, v.35, n.7, 2012.

SANTOS, S. S.; LORENZONI, A.; FERREIRA, L. M.; MATTIAZZI, J.; ADAMS, A. I. H.; DENARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SCHAFFAZICK, S. R.; CRUZ, L. Clotrimazole-loaded Eudragit® RS100 Nanocapsules: Preparation, Characterization and *in vitro* Evaluation of Antifungal Activity Against Candida Species. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 33, n. 3, p. 1389-94, 2013.

SARI, M. H. M.; FERREIRA, L. M.; ZBOROWSKI, V. A.; ARAUJO, P. C. O CERVI, V. F.; BRÜNING, C. A.; CRUZ, L.; NOGUEIRA, C. W. p,p'-Methoxyl-diphenyl Diselenide-Loaded Polymeric Nanocapsules Are Chemically Stable and Do Not Induce Toxicity in Mice. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 117, p. 39-48, 2017.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine *Leishmaniasis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 129, 2017.

SHIN, E.; CHOI, K. M.; YOO, H. S.; LEE, C. K.; HWANG, B. Y.; LEE, M. K. Inhibitory effects of coumarins from the stem barks of *Raxinus rhynchophylla* on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 1610–1614, 2010.

SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Exp Parasitol**, v. 130, p. 183–188, 2012.

SILVEIRA, E. S. **Desenvolvimento e avaliação farmacológica de nanocápsulas de cinamato de metila: potencial anti-inflamatório**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SILVEIRA, E. S.; BEZERRA, S. B.; ÁVILA, K. S.; ROCHA, T. M.; CALDAS MAGALHÃES, P. J.; SANTOS, F. A.; LEAL, L. K. A. M. Gastrointestinal effects of standardized Brazilian phytomedicine (Arthur de Carvalho Drops®) containing *Matricaria recutita*, *Gentiana lutea* and *Foeniculum vulgare*. **Pathophysiology (amsterdam. Print)**, v. 26, p. 349 - 359, 2019a.

SILVEIRA, E. S.; RODRIGUES, N. L. D. C.; MACHADO, N. J.; FONSECA, F. R. M.; TEIXEIRA, M. J.; LEAL, L. K. A. M. Medicinal Plants Containing Coumarin or Essential Oils from the Brazilian Biome May be New Option for Treating *Leishmaniasis*?, **Pharmacog Rev**, v. 14, n. 27, p. 53-61, 2019b.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of *Leishmaniasis*. **J Infect Chemother**, v. 10, n.6, p. 307-15, 2004.

SOUSA-BATISTA, A. J.; POLETTO, F. S.; PHILIPON, C. I. M. S.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; ROSSI-BERGMANN, B. Lipid-core nanocapsules increase the oral efficacy of quercetin in cutaneous *Leishmaniasis*. **Parasitology**, v. 144, n. 13, p. 1769–1774, 2017.

SOUTO, E. B.; DIAS-FERREIRA, J.; CRAVEIRO, S. A.; SEVERINO, P.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; GARCIA, M. L.; SILVA, A. M.; SOUTO, S. B.; MAHANT, S. Therapeutic Interventions for Countering *Leishmaniasis* and Chagas's Disease: From Traditional Sources to Nanotechnological Systems. **Pathogens.**, n. 8, v. 3, p. 119, 2019.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados - parte II. **Polímeros**, v. 22, n.1, 2012.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A.H.; FRACETO L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SRIVASTAVA, P.; VYAS, V. K.; VARIYA, B.; PATEL, P.; QURESHI, G.; GHATE, M. Synthesis, Anti-Inflammatory, Analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) Inhibition Activities, and Molecular Docking Study of 7-substituted Coumarin Derivatives. **Bioorg Chem.**, v. 67, p. 130-138, 2016.

STANGARLIN, M. F. L. **Avaliação da influência do óleo e do polímero sobre as características físico-químicas e estabilidade de sistemas nanoestruturados contendo Ubiquinona**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal da Santa Maria, Santa Maria, 2014.

STEICHEN, S. D.; CALDORERA-MOORE, M.; PEPPAS, N. A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 48, n. 3, p. 416-427, 2013.

SUN, X.; SUN, L.; HANG QI, H.; GAO, Q.; GONG-XIN WANG, G.; WEI, N.; WANG, K. Antipruritic Effect of Natural Coumarin Osthole Through Selective Inhibition of Thermosensitive TRPV3 Channel in the Skin. **Mol Pharmacol**, v. 94, n. 4, p. 1164-1173, 2018.

TANG, X. J.; FU, Y. H.; MENG, D. H.; LI, L. M.; YING, X. Y.; *et al.* Evaluation of pluronic nanosuspensions loading a novel insoluble anticancer drug both *in vitro* and *in vivo*. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 243-250, 2013.

TASDEMIR, D. Antitrypanosomal and anti*Leishmanial* activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrob Agent and Chemot**, v. 50, p.1352-1364., 2010.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **J. Immunol. Meth**, v. 72, p. 29-40, 1984.

TEIXEIRA, M. J.; FERNANDES, J. D.; CLARISSA ROMERO TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; POMPEU, M. L.; DA SILVA, J. S.; BRODSKY, C. I.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1191–1195, 2005.

THAKUR, A.; SHARMA, R.; JASWAL, V. S.; NEPOVIMOVA, E.; CHAUDHARY, A.; KUCA, K. Psoralen: A Biologically Important Coumarin With Emerging Applications. **Mini Rev Med Chem.**, 2020.

TITUS RG, CEREDIG R, CEROTTINI JC, LOUIS JA. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK 1.5 on cutaneous *Leishmaniasis* in genetically-susceptible BALB/c mice. **J Immunol**, v. 135, p. 2108-2114, 1985.

TORRES-SANTOS, E. C.; RODRIGUES, J. M.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A.; ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *in vitro* and *in vivo* anti*Leishmanial* activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 1776-8, 1999.

TRAHAMANE, E. J. O. **Efeitos da terapia fotodinâmica antiparasitária em *Leishmanibraziliensis* e na interação com macrófagos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

UBRICH, N.; SCHMIDT, C.; BODMEIER, R.; HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Oral evaluation in rabbits of cyclosporine-loaded Eudraic RS or RL nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 169-175, 2005.

ÜNER, 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-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

USP - UNITED STATES PHARMACOPEIA, 3<sup>a</sup> Ed., United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2011.

VAN DE VEM, H.; VERMEERSCH, M.; MATHEEUSSEN, A.; VANDERVOORT, J.; WEYENBERGA, W.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; LUDWIG, A. PLGA nanoparticles loaded with the anti*Leishmanial* saponin  $\beta$ -aescin: Factor influence study and *in vitro* efficacy evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 420, p. 122– 132, 2011.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 14, 2013.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de cancer. **Einstein**, v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

VILA, A.; SANCHEZ, A.; TOBIO, M.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Design of biodegradable particles for protein delivery. **J Control Release**, v. 78, n. 1-3, p. 15-24, 2002.

WADHWA, J.; ASTHANA, A.; GUPTA, S.; ASTHANA, G. S.; SINGH, R. Development and Optimization of Polymeric Self-Emulsifying Nanocapsules for Localized Drug Delivery: Design of Experiment Approach. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

WANG, C. M.; ZHOU, W.; LI, C. X.; CHEN, H.; SHI, Z. Q.; FAN, Y. J. Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by *Sphaerotheca fuliginea*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 9, p. 783–791, 2009.

WATERS CORPORATION. Waters 996 Photodiode Detector: Peak Purity I What is peak purity analysis? U.S.A., 1998.

WHO - World Health Organization. The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. 2011; 12. Disponível em: <[https://www.who.int/medicines/areas/policy/world\\_medicines\\_situation/WMS\\_ch6\\_wPricing\\_v6.pdf](https://www.who.int/medicines/areas/policy/world_medicines_situation/WMS_ch6_wPricing_v6.pdf)>. Acesso em: 29 nov. 2019.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 1257 – 1272, 2004.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. Intestinal antiinflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **ChemicoBiological Interactions**, v. 186, n. 2, p. 211–218, 2010.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer-- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-56, 2010.

YENILMEZ, E. Desloratadine-Eudragit ® RS100 Nanoparticles: Formulation and Characterization. **Turk J Pharm Sci.**, v. 14, n. 2, p. 148-156, 2017.

YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. K.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. **NanoToday**, v. 6, p. 585-607, 2011.

YIN, J.; XIANG, C.; SONG, X. Nanoencapsulation of psoralidin via chitosan and Eudragit S100 for enhancement of oral bioavailability. **Int J Pharm**, v. 510, n. 1, p. 203-209, 2016.

YOUSEFI, M.; EHSANI, A.; JAFARI, S. M. Lipid-based nano delivery of antimicrobials to control food-borne bacteria. **Review Adv Colloid Interface Sci.**, v. 270, p. 263-277, 2019.

ZAMBRANO-VILLA S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. How protozoanparasites evade the immune response. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 272-278, 2002.

ZHANG, C.; HSU, A. C.; PAN, H.; GU, Y.; ZUO, X.; DONG, B.; WANG, Z.; ZHENG, J.; LU, J.; ZHENG, R.; WANG, F. Columbianadin Suppresses Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation and Apoptosis through the NOD1 Pathway. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 549, 2019.