



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JANAÍNA BARROS DE MENEZES

**Caracterização e investigação da atividade leishmanicida de nanocarreadores complexados com antimônio e/ou quercetina**

Maceió

2018

JANAÍNA BARROS DE MENEZES

**Caracterização e investigação da atividade leishmanicida de nanocarreadores complexados com antimônio e/ou quercetina**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Co-orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

Maceió

2018

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

- M543c Menezes, Janaina Barros de.  
Caracterização e investigação da atividade leishmanicida de nanocarreadores complexados com antimônio e/ou quercetina / Janaina Barros de Menezes. – 2019.  
107 f. : il. color.
- Orientadora: Camila Braga Dornelas.  
Co-orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.  
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2018.
- Bibliografia: f. 91-104.  
Apêndices: f. 105-107.
1. Leishmaniose. 2. Quimioterapia. 3. Antimônio. 3. Quercetina.  
4. Hidróxidos duplos lamelares. I. Título.

CDU: 616.993.161:615.28:547.972.3



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária - Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

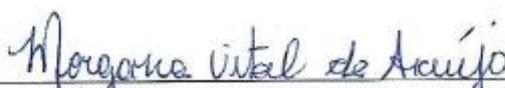
## Folha de Aprovação

Janaína Barros de Menezes

Caracterização e investigação da atividade leishmanicida de nanocarreadores complexados com antimônio e/ou quercetina

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 24 de Outubro de 2018.

## Banca Examinadora

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Morgana Vital de Araújo - (UFAL)

  
Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo - (UFAL)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Aparecida Corá - (UNCISAL)

À Deus e à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela possibilidade de realização de mais este sonho. Por ser meu Pai, meu guia. E por colocar pessoas iluminadas em meu caminho.

Agradeço à minha mãe, meu anjo na Terra, e ao meu pai (*in memoriam*) pelo grande incentivo, pela inabalável confiança desde os meus primeiros rabiscos e pelo ato de amor mais

lindo que já vi na vida (a adoção)!

A quem serei eternamente grata!

À minha irmã, pelo companheirismo.

Aos meus maiores e mais lindos presentes: minhas filhas Luíza e Livia. Que me ensinam diariamente sobre amor e dedicação.

Ao meu marido, meu amor, melhor amigo. Meu incentivador, meu apoio. Por todo o carinho e por ter colocado a mão na massa junto comigo!

À minha sogra e ao meu cunhado Adriano, pelas insubstituíveis ajudas!

Agradeço aos meus professores, Luciano Grillo e Camila Dornelas, a quem tenho profundo carinho e apreço. Obrigada por acreditarem em mim, pelo acolhimento e torcida!

À minha co-orientadora, Magna Suzana, pelo grande apoio.

À banca, em nome dos doutores Morgana Vital, Luciana Corá e Luciano Grillo pela disponibilidade de tempo e grande contribuição ao meu trabalho.

Aos queridos professores Irinaldo, Ticiano, Eduardo F. e Josué, pelas trocas de conhecimento, pelo tempo e espaço cedidos em seus laboratórios. Agradeço também aos meus colegas e amigos de laboratório. Em especial Camilla Camerino, Lisllie, Valcilaine e Elysson, que muitas vezes largaram seus afazeres pra me dar uma “mãozinha”, e que são meus grandes amigos!

Meu muito obrigada aos demais laboratórios que auxiliaram na construção desta tese:

LINQA, LAFA, LAFI, LCQA, Laboratório de Ensino do Instituto de Física da UFAL, LPQPN, LBFI e ao LSCat.

Por fim, agradeço aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, FAPEAL e FINEP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) e à Universidade Federal de Alagoas pela possibilidade de realização deste trabalho.

*“A frase ‘a pessoa se fez sozinha’ não existe, carece de veracidade. Todos nós somos feitos por outras milhares de pessoas. Cada ser que fez algo de bom para nós, ou nos disse algumas palavras de conforto ou aprovação, influenciou em nossa personalidade e nossos atos. É por isso que elas se transformam em parte de qualquer sucesso nosso.”*

George Matthew Adams, escritor.

## RESUMO

Considerando-se a gravidade da leishmaniose enquanto antropozoonose em nível mundial (categoria I do Programa de Doenças Tropicais, referente a doenças emergentes e fora de controle, segundo a Organização Mundial da Saúde) e no contexto nacional; a reemergência da doença devido a co-infecção *Leishmania*- HIV; e os quimioterápicos indicados para o tratamento da doença, que apesar de eficazes, são dotados de severos efeitos adversos, justificam a busca por alternativas. Assim, foi objetivo deste trabalho investigar a utilização dos nanomateriais inorgânicos Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), sintetizados por co-precipitação, como matrizes hospedeiras bidimensionais de SbIII e/ou quercetina para avaliação de sua atividade leishmanicida. Os sistemas binários (QUE-SbIII, Mg, Al HDL-QUE e Mg, Al/Sb HDL-QUE) e ternário [HDL-(QUE-SbIII)] são sintetizados via solução (co-precipitação) e caracterizados. Espectrofotometria UV-Vis permite a visualização da interação entre a quercetina e os metais do HDL por meio da observação de deslocamentos batocrômicos na banda da quercetina, o que confirma a sua quelação com (semi-)metais e a consequente formação de novos produtos; assim como o aparecimento de fluorescência nos sistemas binários e ternário, ratificando a interação da quercetina com os (semi-)metais presentes. A Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) sugere os sítios de ligações metálicas na quercetina: carbonila das posições C-3 e C-4 no sistema binário Mg, Al HDL-QUE e no sistema ternário HDL-(QUE-SbIII), e nos sistemas binários QUE-SbIII e Mg, Al HDL-QUE, adicionalmente à região da carbonila, quelação orto-fenólica do anel B na molécula de quercetina. A Difração de Raios X (DRX) determina o sucesso nas sínteses dos nanosistemas binários e ternário tendo em vista a obtenção de produtos com diferentes cristalinidades, onde os fármacos leishmanicidas se associaram ao nanocarreador. Por fim, a Termogravimetria (TG) traçou o perfil de degradação dos sistemas obtidos. Diante disto, podemos confirmar a formação dos nanosistemas binários e ternário sugeridos, e assim, podemos afirmar que os produtos obtidos apresentam potencial aplicação ao tratamento da leishmaniose; o que foi confirmado pela atividade leishmanicida *in vitro*, com destaque para Mg, Al/Sb HDL-QUE e HDL-(QUE-SbIII), que mostraram-se pouco tóxicos para macrófagos e boa atividade leishmanicida para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Palavras-chave: leishmaniose, quimioterapia, antimônio, quercetina, Hidróxidos Duplos Lamelares.

## ABSTRACT

Considering the severity of leishmaniasis as a world-wide anthroponosis (category I of the Tropical Diseases Program, referring to emerging and out-of-control diseases, according to the World Health Organization) and in the national context; the reemergence of the disease due to Leishmania-HIV co-infection; and the chemotherapeutics indicated for the treatment of the disease, which, although effective, are endowed with severe adverse effects, justify the search for alternatives. The objective of this work was to investigate the use of inorganic nanomaterials as Lamellar Double Hydroxides (LDHs), synthesized by co-precipitation, as two-dimensional host matrices of SbIII and / or quercetin to evaluate their leishmanicidal activity. The binary systems (QUE-SbIII, Mg, Al LDH-QUE and Mg, Al / Sb LDH-QUE) and ternary [LDH-(QUE-SbIII)] are synthesized via solution (co-precipitation) and characterized. UV-Vis spectrophotometry allows visualization of the interaction between quercetin and the metals of LDH by observing bathochromic shift in the quercetin band, which confirms its chelation with (semi-) metals and the consequent formation of new products; as well as the appearance of fluorescence in the binary and ternary systems, ratifying the interaction of quercetin with the (semi-) metals present. Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) suggests the quercetin: carbonyl metal bonding sites of positions C-3 and C-4 in the binary system Mg, Al LDH-QUE and the ternary system LDH-(QUE-SbIII); and in binary systems QUE-SbIII and Mg, Al LDH-QUE, in addition to the carbonyl region, ortho-phenolic chelation of the B-ring in the quercetin molecule. X-Ray Diffraction (XRD) determines the success in the synthesis of binary and ternary nanosystems in order to obtain products with different crystallinity, where the leishmanicidal drugs have associated with the nanocarrier. Finally, the thermogravimetry (TG) traced the degradation profile of the obtained systems. In view of this, we can confirm the formation of the binary and ternary nanosystems suggested, and thus, we can affirm that the obtained products present a potential application to the treatment of leishmaniasis; which was confirmed by the in vitro leishmanicidal activity, with emphasis on Mg, Al / Sb LDH-QUE and LDH- (QUE-SbIII), which showed little toxicity to macrophages and good leishmanicidal activity for promastigotes of *L. amazonensis* and promastigotes of *L. chagasi*.

Key words: leishmaniasis, chemotherapy, antimony, quercetin, Layered Double Hydroxides.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Escala nanométrica  | 18 |
| Figura 2 - Esquema da estrutura dos Hidróxidos Duplos Lamelares  | 21 |
| Figura 3 - Inseto <i>Lutzomyia</i> , vetor da Leishmaniose   | 24 |
| Figura 4 - <i>Leishmania</i> – (A) Forma flagelada ou promastigota e (B) forma aflagelada ou amastigota  | 24 |
| Figura 5 - Ciclo de vida da Leishmaniose   | 25 |
| Figura 6 - Sinais e sintomas característicos das leishmanioses: (A) úlceras características da leishmaniose cutânea e mucosa em diferentes fases evolutivas; (B) hepatoesplenomegalia característica da leishmaniose visceral em estado avançado | 26 |
| Figura 7 - Leishmaniose em países endêmicos: uma atualização epidemiológica com base nos dados reportados em no ano de 2014  | 27 |
| Figura 8 - Estrutura da quercetina (com representação das bandas Ie II) e os três principais sítios de ligação na molécula da quercetina (indicados pelas setas)   | 32 |
| Figura 9 - Fluxograma para identificação de amostras   | 42 |
| Figura 10 - Inspeção visual das soluções: a) quercetina; b) antimônio e c) complexo QUE-SbIII SOL  | 44 |
| Figura 11 - Espectros UV-Vis de quercetina, do complexo QUE-SbIII SOL e de $SbCl_3$  | 45 |
| Figura 12 - Inspeção visual decorrente da incidência do laser hélio-neon (632,8 nm) sobre as soluções: a) quercetina b) QUE-SbIII SOL  | 45 |
| Figura 13 - Fluorescência do complexo em relação à quercetina (com excitação em 370 nm)  | 46 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 14 - Espectro de espectroscopia IV por KBr do complexo QUE-SbIII e de seus precursores   | 47 |
| Figura 15 - Amostras após transluminescência (306nm): A) quercetina, B) antimônio, C) QUE-SbIII SOL D) QUE-SbIII LIO, E) QUE-SbIII ROTA e F) QUE-SbIII SD | 48 |
| Figura 16 - Espectros na região do infravermelho por KBr dos sistemas binários: a) QUE-SbIII ROTA, b) QUE-SbIII LIO, c) QUE-SbIII SD                      | 49 |
| Figura 17 – Estrutura proposta para a ligação entre quercetina e antimônio no sistema binário QUE-SbIII   | 51 |
| Figura 18 - Difratoograma dos complexos QUE-SbIII obtidos por diferentes processos de secagem e de seus precursores                                       | 52 |
| Figura 19 - Curva termogravimétrica da quercetina   | 53 |
| Figura 20 – Curva termogravimétrica do complexo QUE-SbIII ROTA  | 54 |
| Figura 21 - Curva termogravimétrica do complexo QUE-SbIII LIO   | 55 |
| Figura 22 - Curva termogravimétrica do complexo QUE-SbIII SD  | 56 |
| Figura 23 - Curvas termogravimétricas dos complexos QUE-SbIII   | 57 |
| Figura 24 - Micrografia dos sistemas binários (A) QUE-SbIII ROTA, (B) QUE-SbIII LIO e (C) QUE-SbIII SD  | 58 |
| Figura 25 - Fórmula estrutural da quercetina na forma desprotonada  | 59 |
| Figura 26 - Espectro UV-Vis do nanosistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seu precursor QUE  | 60 |
| Figura 27 - Fluorescência do sistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seu precursor QUE  | 61 |
| Figura 28 - Espectro obtido por espectroscopia IV por KBr do sistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seus precursores   | 62 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 29 – Estrutura proposta de ligação entre metal e quercetina no sistema binário Mg, Al HDL-QUE   | 64 |
| Figura 30 – Difratoograma dos precursores e do sistema binário formado (Mg, Al HDL-QUE)  | 65 |
| Figura 31 - Curva termogravimétrica do Mg, Al HDL  | 66 |
| Figura 32 - Curva termogravimétrica do sistema binário Mg, Al HDL-QUE  | 67 |
| Figura 33 - Micrografias do sistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seus precursores   | 68 |
| Figura 34 - Espectros UV-Vis do nanosistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE em comparação com o complexo SbIII-QUE, com a quercetina precursora e com o sistema binário Mg, Al HDL-QUE | 70 |
| Figura 35 - Fluorescência do nanosistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE em comparação com o complexo SbIII-QUE, com a quercetina precursora e com o sistema binário Mg, Al HDL-QUE    | 71 |
| Figura 36 - Espectros de infravermelho por KBr de: SbCl <sub>3</sub> , Mg, Al HDL e Mg, Al/Sb HDL  | 72 |
| Figura 37 - Espectros infravermelho e Raman do nanocarreador Mg, Al/Sb HDL   | 73 |
| Figura 38 - Espectros de infravermelho por KBr do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE e seu nanocarreador precursor  | 74 |
| Figura 39 - Difratoograma de: SbCl <sub>3</sub> , Mg, Al HDL e Mg, Al/Sb HDL   | 75 |
| Figura 40 - Difratoograma do nanosistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE   | 76 |
| Figura 41 - Perfil termogravimétrico do Mg, Al/Sb HDL  | 77 |
| Figura 42 - Perfil termogravimétrico do Mg, Al/Sb HDL-QUE  | 78 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 43 - Micrografias do Mg, Al/Sb HDL precursor (A) e do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE (B)  | 79 |
| Figura 44- Espectros UV-Vis do nanosistema ternário HDL-(QUE-SbIII), da quercetina, do complexo SbIII-QUE e do sistema binário Mg, Al HDL-QUE | 80 |
| Figura 45 - Fluorescência do nanosistema ternário HDL-(QUE-SbIII), da quercetina, do complexo SbIII-QUE e do sistema binário Mg, Al HDL-QUE   | 81 |
| Figura 46 - Espectros de infravermelho por KBr do nanosistema ternário HDL-(QUE-SbIII) e seu precursor Mg, Al HDL                             | 82 |
| Figura 47 – Estrutura proposta deligação entre a quercetina e o antimônio no sistema ternário HDL-(QUE-SbIII)                                 | 82 |
| Figura 48 - Difratoograma do nanosistema HDL-(QUE-SbIII)  | 83 |
| Figura 49 - Perfil termogravimétrico do HDL-(QUE-SbIII)   | 84 |
| Figura 50 - Micrografia do sistema ternário HDL-(QUE-SbIII)   | 85 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1- Rendimento de adsorção/intercalação obtido com as variáveis estudadas  | 59 |
| Tabela 2- Parâmetros de linearidade obtidos com a quercetina em tampão tetraborato de sódio em diferentes proporções   | 69 |
| Tabela 3 – Determinação da citotoxicidade dos produtos em macrófagos da linhagem J774.A1 e em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> (48 horas) | 87 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1 - Investigação da atividade leishmanicida do flavonoide quercetina                         | 35 |
| Quadro 2 - Comparação entre as diferentes frequências dos produtos analisados por espectroscopia IV | 50 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de Raios X

DTG – do inglês *derivative thermogravimetry*, Termogravimetria Derivada

EUA – Estados Unidos da América

HDL – Hidróxido Duplo Lamelar

HDL-QUE – Hidróxido Duplo Lamelar – quercetina

HDL-SbIII – Hidróxido Duplo Lamelar – antimônio

HDL-(SbIII-QUE) – Hidróxido Duplo Lamelar – antimônio – quercetina

(HDL-SbIII)-QUE – Hidróxido Duplo Lamelar – antimônio – quercetina

HIV – do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

IC50 – Concentração Inibitória

IV – Infravermelho

KBr – Brometo de potássio

LC – Leishmaniose Cutânea

LV – Leishmaniose Visceral

Mg Al HDL – Magnésio Alumínio Hidróxido Duplo Lamelar

Mg Al/Sb HDL – Magnésio Alumínio/Antimônio Hidróxido Duplo Lamelar

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

QUE-SbIII LIO – Quercetina – antimônio liofilizado

QUE-SbIII ROTA – Quercetina – antimônio rotaevaporado

QUE-SbIII SD – Quercetina – antimônio *spray dried*

SbIII – antimônio trivalente

SbV – antimônio pentavalente

TG – Termogravimetria

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta Visível

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO   | 16 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA  | 18 |
| 2.1 NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES                                | 18 |
| 2.2 ARGILAS LAMELARES: HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES                  | 20 |
| 2.3 LEISHMANIOSE  | 23 |
| 2.4 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE                                      | 28 |
| 2.5 QUERCETINA  | 32 |
| 3. OBJETIVOS  | 37 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL  | 37 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 37 |
| 4. METODOLOGIA  | 38 |
| 4.1 MATERIAL  | 38 |
| 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS  | 38 |
| 4.2.1 Sistema binário Quercetina-Antimonial (QUE-SbIII)             | 38 |
| 4.2.2 Sistema binário Mg, Al HDL-QUE                                | 39 |
| 4.2.3 Sistema ternário Mg, Al/Sb HDL-QUE                            | 39 |
| 4.2.4 Sistema ternário HDL-(QUE-SbIII)                              | 39 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO  | 40 |
| 4.4 FLUXOGRAMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS                       | 42 |
| 4.5 AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i> DOS PRODUTOS<br>OBTIDOS | 42 |
| 4.5.1 Atividade leishmanicida                                       | 42 |
| 4.5.1.1 Manutenção da linhagem de macrófagos                        | 42 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.5.1.2 | Determinação da viabilidade celular   | 42  |
| 4.5.1.3 | Avaliação leishmanicida <i>in vitro</i> dos produtos obtidos sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania</i> | 43  |
| 4.5.1.4 | Avaliação da carga parasitária intracelular <i>in vitro</i>   | 43  |
| 5.      | RESULTADOS E DISCUSSÃO  | 44  |
| 5.1     | QUE-SbIII   | 44  |
| 5.1.1   | Solução   | 44  |
| 5.1.2   | QUE-SbIII LIO; QUE-SbIII ROTA; QUE-SbIII SD   | 48  |
| 5.2     | SISTEMA BINÁRIO Mg, Al HDL-QUE  | 58  |
| 5.3     | SISTEMA BINÁRIO Mg, Al/Sb HDL-QUE   | 58  |
| 5.4     | SISTEMA TERNÁRIO HDL-(QUE-SbIII)  | 68  |
| 5.5     | ENSAIO DE CITOTOXICIDADE  | 79  |
| 5.6     | ATIVIDADE LEISHMANICIDA – ENSAIOS <i>IN VITRO</i>   | 85  |
| 5       | CONCLUSÃO   | 86  |
|         | CRONOGRAMA DE ATIVIDADES  | 89  |
|         | PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS  | 90  |
|         | REFERÊNCIAS   | 91  |
|         | APÊNDICE 1  | 93  |
|         | APÊNDICE 2  | 105 |
|         | APÊNDICE 3  | 106 |





## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada mundialmente causada por cerca de 20 espécies de um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, subdividido em dois subgêneros distintos: *L. (Leishmania) spp.* e *L. (Viannia) spp.*, da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae* (PEACOCK et al., 2007).

Em 2011, um estudo realizado pelo Ministério da Saúde revelou que menos de 5% do financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas foi investido neste grupo de doenças parasitárias, ainda que mais de 500 milhões de pessoas sejam ameaçadas pelas mesmas (MORAN et al., 2009). Provavelmente, esta é a justificativa para a utilização de fármacos de alta toxicidade, e muitas vezes, ineficazes na quimioterapia da leishmaniose há mais de 100 anos e que até hoje o conhecimento a respeito dos seus mecanismos de toxicidade, de resistência e de ação, visto a diversidade de fenótipos de *Leishmania*, é escasso, e continuam sendo os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da doença (LIMA et al., 2007; FRÉZARD et al., 2008; CARVALHO et al., 2012).

Além dos graves efeitos adversos (SOARES-BEZERRA et al., 2004), os fármacos disponíveis possuem elevado custo, demandam longo período de tratamento e a maioria é administrado por via parenteral (MS, 2011). Devido a estes fatores, é comum o abandono do tratamento pelos pacientes e o consequente aparecimento de cepas resistentes, potencializando a problemática.

Diante disto, ocorre atual busca pelo desenvolvimento de sistemas de distribuição de fármacos para o tratamento de doenças negligenciadas, baseados em nanotecnologia. O que é uma via promissora, visto a capacidade de direcionar fármacos para as células infectadas e o perfil de liberação prolongada que estes nanocarreadores apresentam resultando em um contato por um período mais longo entre o fármaco e o parasito (KHALIL et al., 2013).

A nanotecnologia tem se apresentado também como uma alternativa na redução de toxicidade e melhoramento da biodisponibilidade de fármacos, conferindo-lhes um direcionamento do fármaco através da utilização de nanocarreadores (BERGAYA e LAGALY, 2001).

Devido à ausência de toxicidade celular, endocitose facilitada, fácil síntese, possibilidade de intercalação/adsorção de fármacos e baixo custo, os hidróxidos duplos lamelares (HDLs) são nanomateriais promissores a serem utilizados como carreadores no tratamento da leishmaniose (CUNHA et al, 2010).

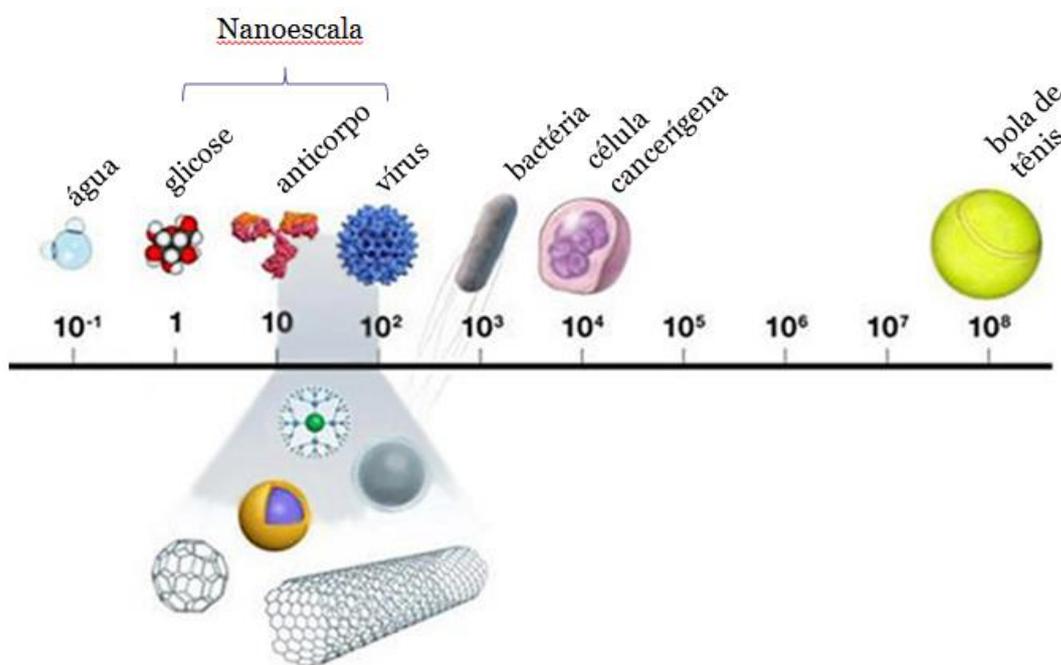
Diante disto, verifica-se a necessidade de pesquisa no intuito de incrementar a quimioterapia da doença e melhorar a qualidade de vida do paciente. Neste estudo foi proposta a associação da quercetina, substância natural com atividade leishmanicida comprovada e capacidade quelante, facilitando a complexação ao antimônio) ao SbIII semi-metal de carga trivalente designado como responsável pela atividade leishmanicida (MARTINS, 2007) e de ambos ao nanocarreador Mg,Al HDL visando um sinergismo entre os fármacos e a consequente redução dos efeitos adversos inerentes ao antimonial, visto que a utilização da nanotecnologia atribui propriedades únicas aos fármacos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES

Nanotecnologia é a ciência emergente que se dedica ao estudo, pesquisa e desenvolvimento de materiais associados a fenômenos físicos, biofísicos e bioquímicos na escala de aproximadamente 1 a 100nm (Figura 1), cuja proposta foi documentada em 1958 por R. Feynman (WHITESIDES, 2005; NIKALJE, 2015). Estes materiais são estudados em níveis atômico, molecular ou macromolecular com objetivo de compreender tais fenômenos e materiais em nanoescala, que é o principal apelo da nanociência. Desta forma, torna-se possível a criação, manipulação e utilização de estruturas, dispositivos e sistemas que apresentam novas propriedades e funções devido ao tamanho reduzido. Dentre estas novas propriedades e funções, estão as elevadas condutibilidade elétrica e eletrônica, menor condutibilidade térmica e características de deformação de temperatura mais altas em comparação com os equivalentes convencionais de material a granel (SWEENEY, 2003; WHITESIDES, 2005).

**Figura 1 - Escala nanométrica**



Fonte: Adaptado de Hoffman, 2017

Atualmente, potenciais aplicações da nanotecnologia encontram-se nas áreas de saúde e medicina, eletrônicos, transporte, energia e meio ambiente e exploração espacial (NIKALJE, 2015). De acordo com Gleiter (2009), a nanotecnologia tem sido aplicada

intensamente na terapia do câncer, rotulagem celular, síntese de materiais sólidos com estruturas atômicas ajustáveis e na investigação dos limites da física quântica. Na área de biociências e na medicina, a nanotecnologia está sendo vastamente utilizada na investigação de processos biológicos que ocorrem em nível molecular. Isto resulta na permissão da obtenção de sensores, imagens moleculares e detecção precoce de doenças (ADAMS e BARBANTE, 2013).

Nas Ciências Farmacêuticas, esta tecnologia é bastante utilizada na área de sistemas de entrega de fármacos, nos quais, entre várias outras propriedades, torna possível a otimização do estudo de pré-formulações, como o melhoramento da solubilidade, por exemplo. Isto permite o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, que após administração, alcançam propriedades farmacocinéticas e toxicológicas desejáveis, assim reduzindo os efeitos adversos de determinados medicamentos, uma vez que o princípio ativo é entregue em seu local de ação e, desta forma, reduzindo quantidade do fármaco utilizada, custo de tratamento e desconforto ao paciente tratado (DEVALAPALLY et al., 2007; ADAMS e BARBANTE, 2013; NIKALJE, 2015).

Cunha et al. (2010) e Zhao et al. (2010) demonstraram a utilização de nanomateriais e matrizes hospedeiras para o armazenamento e liberação prolongada de produtos biologicamente ativos (denominados hóspedes). O efeito sinérgico entre os precursores (matriz hospedeira e hóspede) resulta em um material com propriedades físico-químicas únicas, diferentes da matriz hospedeira e do hóspede, podendo ser o último fármaco, hormônio, agroquímico, etc.

Os nanomedicamentos, assim denominados os medicamentos que fazem uso de nanotecnologia, são constituídos por partículas em nanoescala (nanoestruturas) ou por moléculas que melhoram sua biodisponibilidade (CAVALCANTI et al., 2008). Dentre eles podemos citar nanoesferas, nanocápsulas, nanocristais, nanoemulsões (BARZEGAR-JALALI et al., 2008), que são vastamente utilizadas na área farmacêutica.

Os materiais em tamanho nanométrico adquirem novas propriedades, e algumas vezes muito diferentes, devido à dimensão, quando comparadas com a forma a granel (LOGOTHETIDIS, 2012). Micelas, nanoemulsões, nanotubos, nanoesferas, lipossomas, dendrímeros, polímeros terapêuticos, nanopartículas, nanocápsulas, nanoesferas e

hidrogéis são exemplos de nanomateriais atualmente investigados na área farmacêutica (FILIPPONI e SUTHERLAND, 2013).

Por isso, devido às novas propriedades adquiridas por estes materiais, as interações entre os nanomateriais e as células, os animais, os seres humanos e o meio ambiente tornaram-se complexas e, portanto, torna-se necessária a investigação detalhada destas interações para o melhor entendimento de como as propriedades dos nanomateriais influenciam e, assim, determinam o impacto final dos nanomateriais sobre a saúde e a meio ambiente (ADAMS e BARBANTE, 2013).

Embora sejam ainda escassos os estudos de toxicidade, sabemos que as nanopartículas são mais propensas a interagir com células e com os vários componentes biológicos, e se distribuir pelo organismo, o que aumenta suas chances de interagir com outros componentes para induzir respostas inflamatórias e imunitárias (ADAMS e BARBANTE, 2013). Portanto, a caracterização detalhada dos nanomateriais produzidos torna-se essencial.

## 2.2 ARGILAS LAMELARES: HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

De acordo com Richards (2009), os nanomateriais são organizados estruturalmente em nanoescala, entre 1 e 100 nm. E classificados em conformidade com o tipo dessas estruturas: zero dimensional (0-D), unidimensional (1-D), bidimensional (2-D) e tridimensional (3-D).

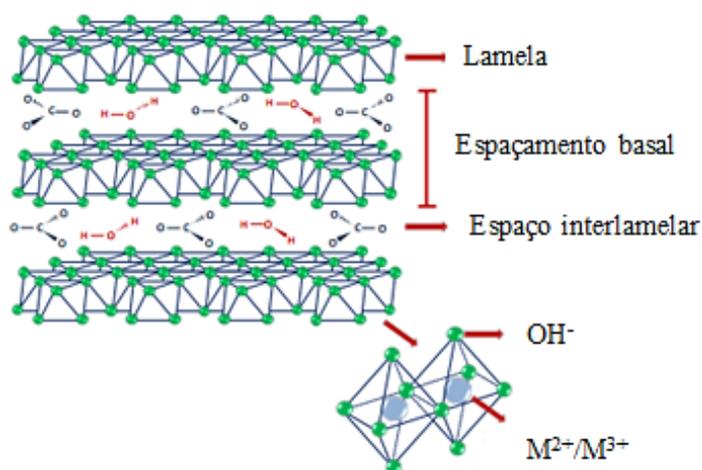
Os materiais classificados como 0-D devem possuir todas as dimensões inferiores a 100 nm, e portanto, são os “blocos de construção” mais simples. Dentre eles, podemos citar os nanocristais e as nanopartículas. Já os materiais classificados como 1-D possuem uma das dimensões fora da escala nanométrica e por consequência, os materiais 2-D possuem duas de suas dimensões fora da escala nanométrica e os materiais 3-D são formados pela agregação de moléculas, polímeros (RICHARDS, 2009).

Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) são nanopartículas 2-D lamelares que apresentam especial interesse entre os nanocompósitos poliméricos em geral, visto que devido a sua estrutura lamelar, podem apresentar cargas superficiais capazes de interagir com outras entidades que também possuem carga (SEOK e SOO-JIN, 2007; RICHARDS 2009), dentre elas, a absorção de ânions orgânicos e inorgânicos. Isto o que os torna atraentes para as mais diversas aplicações tecnológicas em diferentes áreas (OLFS et al.

2009). São utilizados com frequência como matrizes hospedeiras que armazenam ou controlam a liberação de diversas espécies aniônicas no espaço interlamelar (CAVANI et al., 1991).

Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) constituem uma ampla família de sólidos lamelares (RIVES, 2013), capazes de sofrer intercalação, adsorção ou esfoliação (CUNHA et al., 2010). Este tipo de material inorgânico, natural ou sintetizado, consiste em um empilhamento de camadas positivamente carregadas, que necessitam ser contrabalanceadas negativamente; podem apresentar em sua estrutura lamelar elementos distintos (Figura 2) (CREPALDI e VALIM, 1998). Este nanomaterial possui propriedades como alta capacidade de troca iônica e elevada área superficial, que lhe são conferidas devido à sua configuração estrutural (BASU et al., 2014; OLFS et al., 2009).

**Figura 2 - Esquema da estrutura dos Hidróxidos Duplos Lamelares**



Fonte: Adaptado de BENÍCIO et al., 2015

Tais compósitos, conhecidos popularmente como argilas, são encontrados com facilidade na natureza e são conhecidos, academicamente, como silicatos lamelares ou compostos tipo hidrotalcitas (argilas aniônicas ou argilas naturais). Possuem estrutura semelhante à brucita, hidróxido de magnésio,  $Mg(OH)_2$  em que os átomos de magnésio estão octaedricamente coordenados por grupos hidróxidos (SAN ROMÁN et al., 2012). Estes materiais, de forma geral, são terrosos, apresentam granulação fina, e, quando umedecidos com água, apresentam intumescimento (NEUMANN et al., 2000).

São representados pela fórmula geral  $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^{p+}(X^{n-})_{p/n} \cdot yH_2O$ , em que  $M^{2+}$  e  $M^{3+}$  são os cátions di- e trivalentes, respectivamente, que se encontram na posição

octaédrica nas lamelas do HDL e  $X^{n-}$  é o ânion que permite a troca iônica (KHAN et al., 2009), além de moléculas de água.

HDLs são ausentes de toxicidade e ricos em esmectitas; sendo que tais esmectitas se diferenciam de acordo com a natureza da camada octaédrica (dioctaédrica ou trioctaédrica). Outra característica destes materiais é a apresentação de estrutura cristalina, que é composta por átomos de oxigênio e grupamentos hidroxila coordenados tetraedricamente ao  $Si^{4+}$  e ao  $Al^{3+}$  (grupos tetraédricos) e octaedricamente ao  $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$  (grupos octaédricos) (BRAGANÇA, 2008).

Os grupos tetraédricos são ligados entre si formando folhas contínuas denominadas folhas tetraédricas, assim como os grupos octaédricos também estão ligados entre si, formando folhas octaédricas. Os arranjos dos átomos nas folhas tetraédricas e octaédricas são tais que podem se ajustar entre si, formando camadas ou lamelas de espessura nanométrica e assim originar uma série de aluminosilicatos (BRAGANÇA, 2008).

A utilização destas argilas lamelares em aplicações farmacêuticas vem crescendo em função da capacidade dos mesmos, através da formação de sistemas binários tipo intercalados ou esfoliados, de promover alteração na(s) propriedade(s) inicial(is) de um fármaco (BERGAYA e LAGALY, 2001).

Os HDLs são considerados nanopartículas porque possuem uma das três dimensões em escala nanométrica (CAVANI et al., 1991). Estes materiais foram sintetizados pela primeira vez em 1942 por Feitknecht, baseando-se na precipitação controlada de soluções aquosas contendo cátions metálicos com uma solução alcalina (FEITKNECHT, 1942). Estes podem ser sintetizados em laboratório e segundo Crepaldi e Valim (1998), o preparo pode ser realizado de diferentes métodos, sendo eles: coprecipitação, também conhecido por método sal-base (onde o pH utilizado pode variar ou ser constante), método sal-óxido, síntese hidrotérmica e substituição do ânion interlamelar (que parte de um precursor previamente preparado). A depender da rota de síntese utilizada, uma variedade de íons pode se incorporar às lamelas (LIN et al., 2006; PRASAD et al., 2011).

A carga positiva das lamelas pode ser neutralizada por uma série de ânions já descritos em literatura, como exemplo,  $Cl^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $F^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $BO_3^{3-}$ ,  $HPO_4^{2-}$  (MEYN et al., 1990; KAMEDA et al., 2006) e, portanto, resulta em elevada

capacidade de modificação de sua composição, gerando diferentes afinidades químicas nas camadas interlamelares quanto ao ânion a ser intercalado e a quantidade de água presente na estrutura do composto produzido (REIS, 2009); visto que no processo de troca iônica, alguns íons são mais facilmente trocados que outros, ou seja, os trocadores iônicos são seletivos ou têm maior afinidade por determinado íon (SOUZA, 2008).

Características como facilidade de manipulação de suas propriedades em uma ampla faixa de composições químicas e baixo custo (CREPALDI e VALIN, 1998) também garantem aos HDLs grande versatilidade nos mais diversos campos de aplicação (BALSAMO et al., 2012; PRASAD et al., 2011), mas é a degradação em meio ácido que o torna um diferencial, em especial para a Tecnologia Farmacêutica. Os HDLs são os únicos nanocarreadores inorgânicos que não se acumulam no organismo devido à sua alcalinidade e capacidade de lenta degradação em meio ácido (pH 4-6), resultando em íons, que deixam as células através de canais iônicos. Desta forma, o HDL parece apresentar um equilíbrio favorável entre estabilidade química e biodegradabilidade (CUNHA et al., 2010).

Diante do exposto, propomos a utilização do HDL como um carreador de fármacos com o intuito de que realize a entrega específica dos fármacos a ele associados, pois o nanocarreador HDL desempenharia o papel facilitador dos hidratos de carbono no processo de endocitose pelos macrófagos. Visto o baixo custo de síntese atribuído a este nanomaterial e à possibilidade de transposição para escala industrial, tal tecnologia apresenta aplicabilidade para o tratamento de doenças que acometem populações de baixa renda.

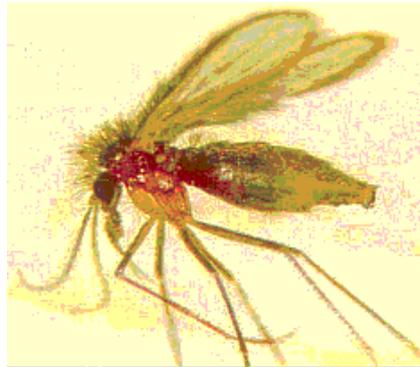
### 2.3 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma antropozoonose, pois acomete homens e animais, ocasionada por parasitos do gênero *Leishmania* e é considerada potencialmente letal, devido aos sinais e sintomas que são desenvolvidos com o curso da doença, acrescido de seu negligenciamento; por ser uma doença que afeta, em sua maioria, populações de baixa renda de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (DNDi, 2016; MOLOO, POSTIGO, 2016).

A infecção, nos mamíferos, ocorre pela hematofagia de flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis* ou *Lutzomyia cruzi*, no Brasil) (Figura 3) fêmeas infectadas: as formas promastigotas são fagocitadas (por macrófagos ou por outras células fagocíticas

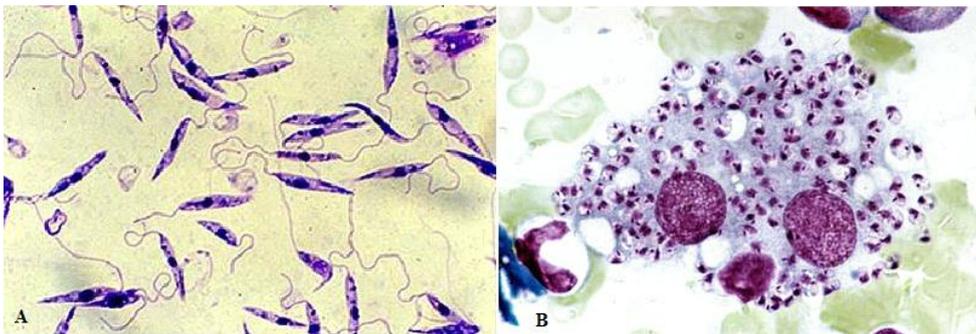
mononucleares), estas formas se diferenciam em amastigotas, sofrem replicação, promovendo a lise das células fagocíticas e acometendo outras células. Os insetos se infectam pela ingestão (hematofagia) de células sanguíneas infectadas. No intestino do inseto, as amastigotas se diferenciam em promastigotas (Figura 4) e migram para a probóscida do flebotomíneo, favorecendo o início de um novo ciclo (Figura 5). Atualmente mais de 20 espécies são infectados e as manifestações clínicas podem ser tegumentares ou viscerais (OMS, 2016a).

**Figura 3 - Inseto *Lutzomyia*, vetor da Leishmaniose**



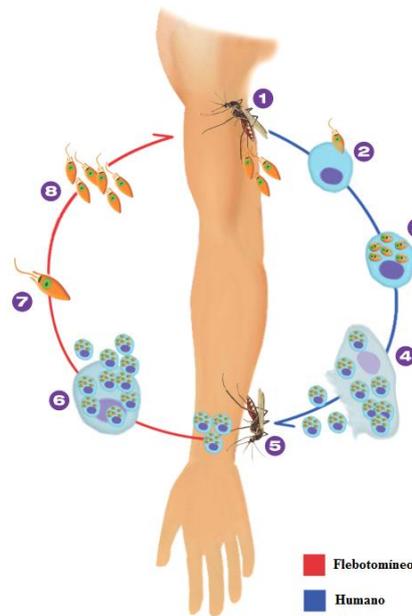
Fonte: VIEIRA, 2012

**Figura 4 – *Leishmania* – (A) Forma flagelada ou promastigota e (B) forma aflagelada ou amastigota**



Fonte: CORRÊA, R. (2012); Canine Vector-Borne Diseases (2016)

**Figura 5 - Ciclo de vida da Leishmaniose**



Fonte: Adaptado de VERMELHO et al, 2014

A leishmaniose tegumentar (Figura 6A), apesar de menos nociva (embora atualmente seja caracterizada pela diversidade das apresentações clínicas e das espécies causadoras da doença) do que a forma visceral (acomete órgãos e tecidos internos, como baço, fígado, medula óssea e nódulos linfáticos), influencia psicossocialmente na vida do paciente, pois provoca lesões na pele, podendo causar deformações e estigmatização social. A forma visceral (Figura 6B), também conhecida como Calazar, pode provocar febre, esplenomegalia, hepatomegalia, distensão abdominal e dor; por consequência de possíveis infecções secundárias, anemia grave ou falência dos órgãos, visto o comprometimento do baço e fígado, pode causar óbito do paciente. E por isto esta última é considerada a forma mais grave da doença, principalmente se não houver tratamento adequado (SVS/MS, 2015).

**Figura 6 - Sinais característicos das leishmanioses: (A) úlceras características da leishmaniose cutânea e mucosa; (B) hepatoesplenomegalia característica da leishmaniose visceral em estado avançado**

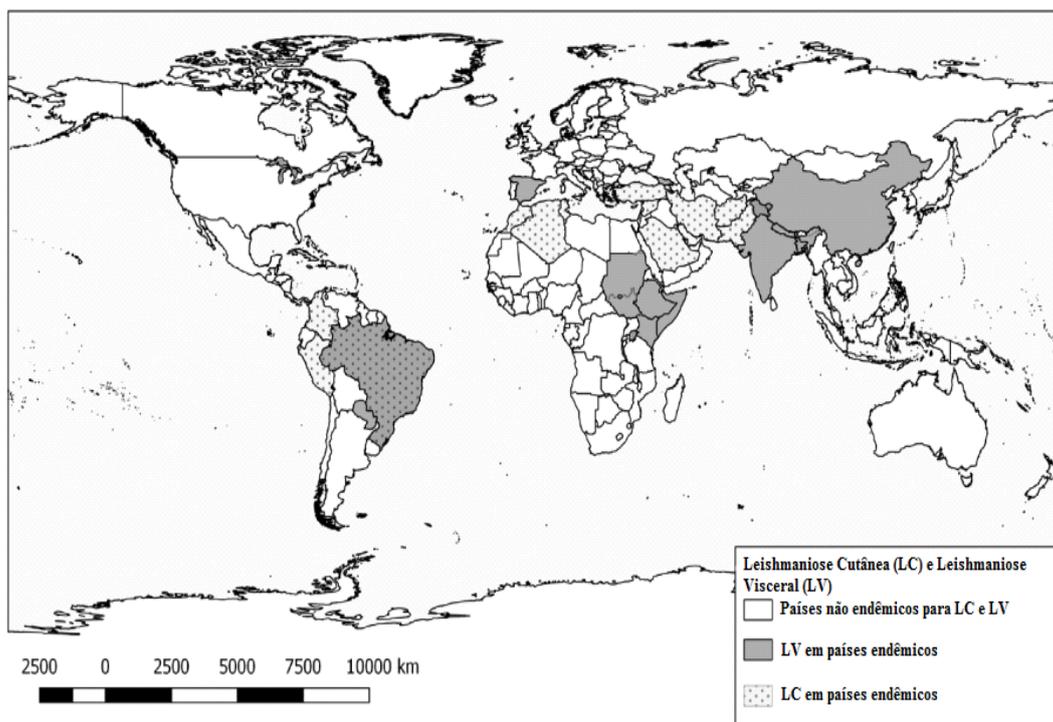


Fonte: OMS, 2017

No Brasil, o acometimento tegumentar tem sido descrito por sete espécies de *Leishmania*, das quais algumas causam síndromes peculiares associadas a fenômenos imunopatogênicos específicos, como a forma difusa causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a forma mucosa causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A leishmaniose visceral (LV) é causada essencialmente por uma única espécie, a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (SVS/MS, 2015).

Resultados publicados recentemente (OMS, 2016a) estimam que cerca de 399 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a leishmaniose cutânea e 556 milhões sob o risco de contrair o tipo visceral da doença em países endêmicos (Figura 7).

**Figura 7 - Leishmaniose em países endêmicos: uma atualização epidemiológica com base nos dados reportados no ano de 2014**



Fonte: Adaptado de MOLOO e POSTIGO, 2016

Moloo e Postigo (2016) relacionam a doença com fatores como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização. Estimam, ainda, a ocorrência de cerca de 900.000 a 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes por ano.

O número de casos da leishmaniose pode ser subestimado devido à baixa frequência de relatos de casos em bases regulares por países acometidos pela doença. No entanto, OMS tem se empenhado para o melhoramento do registro de notificações da doença, possibilitando a implementação de programas de controle adequados (MOLOO, POSTIGO, 2016).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS 2016), no período de 2001 a 2014 foram registrados 797.849 novos casos de leishmaniose cutânea (LC) (dentre estes, 51.098 foram registrados apenas no ano de 2014), com uma média anual de 56.989 casos distribuídos em 17 dos 18 países americanos considerados endêmicos para leishmaniose cutânea. No mesmo período, foram registrados 48.720 novos casos de leishmaniose visceral (LV) (dentre estes, 3.624 foram registrados apenas

no ano de 2014), com uma média anual de 3.480 casos distribuídos nos 12 países americanos considerados endêmicos para leishmaniose visceral.

No Brasil, no período de 2000 a 2013, a leishmaniose tegumentar apresentou média anual de 24.694 casos registrados enquanto que a forma visceral possuiu uma média anual de casos de 3.454; com um aumento gradual da letalidade, passando de 3,2%, em 2000, para 7,1%, em 2013. É importante ressaltar que ambas as formas da doença têm apresentado expansão geográfica (SVS/MS, 2015). Segundo a OPAS/OMS (2016), o Brasil está entre os países com as maiores taxas de mortalidade para a LV nas Américas.

Apenas no ano de 2013, foram notificados 18.112 de Leishmaniose Tegumentar no Brasil, sendo que 51 casos foram notificados em Alagoas e 3.014 casos de LV no Brasil, dentre esses, 25 casos foram notificados em Alagoas (OPAS/OMS 2016). É importante ressaltar que devido à elevada subnotificação da doença, os números podem ser ainda mais elevados (NEGRÃO e FERREIRA, 2014).

De acordo com Rocha et al. (2015a), no período de 2007 a 2012 foram confirmados 199 casos de LV com 23 óbitos registrados só no estado de Alagoas com letalidade considerada elevada, quando comparada à média nacional. Em relação à LC, foram registrados no mesmo período 484 casos em Alagoas, sendo que a forma cutânea (95,69%) se manifestou com maior frequência do que a mucosa (4,31%), de acordo com Rocha et al. (2015b) com registro de óbitos apenas nos anos de 2007 e 2012, em baixo número. No ano de 2015 a doença chamou atenção no estado, visto que apenas neste ano, até o mês de julho, foram registrados 25 casos de LV e 133 casos de LC, sendo que 50 desses casos de leishmaniose foram registrados apenas no município de Novo Lino (G1 ALAGOAS, 2015).

A Secretaria de Vigilância em Saúde, como medidas preventivas, orienta a utilização de mosquiteiros, repelentes, telagem nas portas e janelas pela população, limpeza de terrenos associada à aplicação de inseticidas e tratamento adequado aos cães contaminados (SVS/MS, 2015).

## 2.4 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Atualmente estão inclusos na lista de medicamentos essenciais do Brasil os seguintes fármacos leishmanicidas: antimoniato de meglumina, desoxicolato de anfotericina B, anfotericina B lipossomal e pentamidina (OMS, 2014; SVS/MS, 2017);

sendo a anfotericina B o fármaco de primeira escolha para a co-infecção Leishmania-HIV (para a forma visceral é recomendada a formulação lipossomal e na tegumentar, o desoxicolato de anfotericina B) (SVS, 2015; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). Sendo o medicamento de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, o antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>, Sanofi Aventis, França), comercializado no Brasil (SVS/MS, 2017); e o estibogluconato de sódio (Pentostan<sup>®</sup>, Glaxo Wellcome, Reino Unido) distribuído em países de língua inglesa (MARTINS, 2007), ambos antimoniais pentavalentes.

Estes fármacos são administrados por via parenteral, sendo relatados frequentemente flebite e edema como consequência das administrações consecutivas. Portanto, é considerada uma dificuldade no que diz respeito à na adesão ao tratamento pelo paciente, resultando no abandono do tratamento em curso, favorecendo o aparecimento de cepas resistentes (MENEZES et al., 2015; SVS/MS, 2017), sendo esta a limitação da utilização dos atuais fármacos na quimioterapia (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Vale ressaltar que os antimoniais pentavalentes foram adotados por exibir menor toxicidade que os fármacos antimoniais originais (SbIII). Estes são comercializados complexados a carboidratos porque se solubilizam facilmente em água e distribui o antimônio para os macrófagos infectados (ROBERTS et. al., 1995), que os trivalentes. Os compostos trivalentes ligam-se em maior quantidade aos tecidos e às células vermelhas do sangue e, portanto, sua toxicidade é superior quando comparado à forma pentavalente (MS/SVS, 2011). O tártaro emético ou tartarato de antimônio e potássio foi o primeiro fármaco utilizado na quimioterapia da leishmaniose pelo médico brasileiro Gaspar Viana no ano de 1912 (VIANNA, 1912).

Apesar do uso clínico dos antimoniais pentavalentes há mais de 100 anos, o mecanismo de ação e base para toxicidade seletiva precisos destes agentes leishmanicidas permanecem incertos. Mas é sabido que administrações consecutivas do antimonial pentavalente levam a um aumento dos níveis de retenção, ocorrendo uma transformação para a forma trivalente e um acúmulo do semi-metal. Goodwin e Page (1943) foram os primeiros a sugerir que a forma pentavalente do antimônio (SbV) agiria como um pró-fármaco, posteriormente sendo convertido à forma trivalente (SbIII) e Miekeley et al. (2002) propuseram a biorredução do SbV em SbIII, sendo esta última, a responsável tanto pela toxicidade quanto pela atividade terapêutica, embora os parasitos também

apresentem susceptibilidade ao SbV (EPHROS et al., 1999). Geralmente, o pH ácido e a temperatura ligeiramente elevada favorecem a redução de Sb (V) para Sb (III). Essa redução de antimoniais pode ocorrer tanto nos macrófagos quanto no parasito leishmania (PUND e JOSHI, 2017).

No entanto, de acordo com Pund e Joshi (2017), a capacidade dos parasitos de Leishmania de reduzir o Sb (V) para Sb (III) é específica do estágio. As amastigotas podem reduzir o Sb (V) ao Sb (III), enquanto as promastigotas não podem, tornando as amastigotas mais suscetíveis ao Sb (V). Ferreira et al. (2003), sugerem a atuação de grupamentos tiol nesta redução, tanto em pH ácido quanto neutro (FRÉZARD et al, 2009).

Dentre as hipóteses discutidas a respeito do mecanismo de ação desta classe de fármacos estão: a depleção dos níveis intracelulares de ATP devido à interferência da glicólise e da beta-oxidação de ácidos graxos em amastigotas (BALAÑA-FOUCE et al., 1998) por meio da alteração do potencial redox tiol celular, induzindo o efluxo de tiol intracelular e assim inibindo a tripanotiona redutase (OUELLETTE et al., 2004); e a existência de uma metaloprotease zinco dependente na forma amastigota, a qual pode ser inativada em caso de substituição do zinco pelo antimônio, assim inibindo o desenvolvimento do parasito (BANGS et al., 2011).

No entanto, a resistência do parasito aos antimoniais pentavalentes é um grave problema, assim levado à sua descontinuação. Porém, foram até então, várias as tentativas em função do melhoramento da quimioterapia com antimoniais e da superação do problema da resistência a esses fármacos (PUND e JOSHI, 2017).

De acordo com Lima et al. (2007), são mecanismos prováveis de resistência ao antimônio: a redução da transformação do SbV em SbIII, a formação de conjugado entre o Sb e o tiol intracelular (tripanotione) por conjugase/transferase não identificadas, e a extrusão do Sb pelo elevado nível de transportadores ABC.

Até a década passada, esta doença tem recebido pouco auxílio do governo e da indústria farmacêutica (VERMELHO et al., 2014). Porém, por ser uma doença em expansão nos países da Europa e da América do Norte, tem atraído a atenção das autoridades de saúde de todo o mundo (ALVAR et al., 2006).

A anfotericina B lipossomal (AmBisome®, Gilead Sciences, Inc, Foster City, EUA) é o único exemplo de medicamento de base nanotecnológica que já possui utilização prática clínica no tratamento da leishmaniose até o momento. No entanto, possui elevado custo atribuído ao processo de síntese do nanomaterial lipossomal.

Alguns estudos já foram realizados no intuito de utilizar esta tecnologia para os antimoniais: antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio. Estes fármacos foram encapsulados em lipossomas e avaliados por via intravenosa em *golden hamsters*. Como resultado, apresentaram uma atividade 700 vezes superior aos respectivos fármacos não encapsulados, além de uma redução dos efeitos colaterais. Este efeito foi atribuído à liberação do antimônio diretamente ao seu sítio de ação (ALVING et al., 1978). Segundo Filippin e Souza (2006), a formação de vesículas lipídicas (lipossomas) tem sido investigada principalmente na tentativa de reduzir a nefrotoxicidade característica da administração do antimoniato de N-metilglucamina.

Demicheli et al. (2004) avaliaram a associação de antimoniato de meglumina com  $\beta$ -ciclodextrina, a qual resultou no aumento da absorção de antimônio por via oral e tornou o fármaco oralmente ativo em um modelo murino infectado pela forma cutânea. A eficácia da formulação oral foi equivalente à formulação de antimoniato de meglumina administrada por via intraperitoneal com uma dose duas vezes mais elevada de antimônio.

No entanto, assim como para as formas lipossomais, a utilização de ciclodextrinas é bastante dispendiosa (VEIGA e SALTÃO, 2001; FRÉZARD et al., 2005) para a aplicabilidade no tratamento da leishmaniose, visto o seu alto custo de síntese, a vasta duração da quimioterapia e o perfil da população; normalmente de baixa renda e portanto, incapazes de financiar tal tecnologia. Assim, tornando-se discutível tal aplicabilidade prática para uma doença negligenciada, como a leishmaniose.

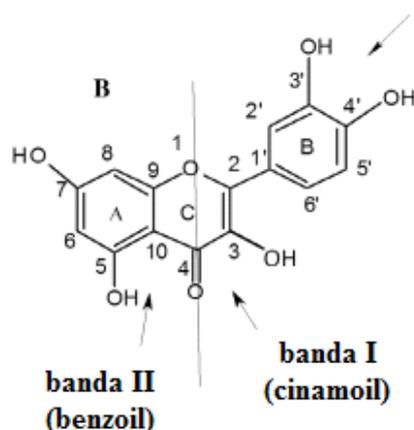
Por ser uma doença tropical negligenciada, há uma enorme dificuldade na obtenção de investimentos necessários para o desenvolvimento de novas terapias (UNIVERSIDADE DA PENSILVÂNIA, 2017). Portanto, o desenvolvimento de novos alvos de parasitos e drogas sintéticas, juntamente com a pesquisa de produtos naturais representa uma estratégia importante para a descoberta de novos compostos contra *Leishmania* sp. (VERMELHO et al., 2014), visto que os sucessos na quimioterapia das leishmanioses nos últimos 21 anos têm sido baseados em reformulação e rastreio (SOARES-BEZERRA et al. 2004).

De acordo com Tiuman et al. (2011), as plantas são descritas como uma fonte potencial de novos fármacos antiprotozoários. Extratos de plantas ou compostos derivados de plantas são possíveis agentes medicinais para o tratamento da leishmaniose (CARVALHO e FERREIRA, 2001; KAYSER e KIDERLEN, 2001), e uma variedade relatos científicos têm demonstrado o seu potencial leishmanicida (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; ROCHA et al., 2005). A atividade desses extratos vai depender, em grande parte, do solvente utilizado para a extração, da parte da planta utilizada e da presença de um ou mais produtos naturais (ADEBAYO et al., 2013). Portanto, muitos grupos de produtos naturais, incluindo alcaloides (MISHRA, 2009), flavonoides (TASDEMIR et al., 2006; MUZITANO et al., 2009), terpenoides (DA SILVA FILHO et al., 2009) e óleos essenciais (ROHLOFF et al., 2013), possuem atividade leishmanicida relatada em literatura.

## 2.5 QUERCETINA

A quercetina (Figura 8) é uma penta-hidroxi-flavona, pois contém em sua estrutura 5 grupos hidroxila nas posições 3, 3', 4', 5', 7, além de um grupamento carbonila na posição 4 (BUKHARI et al., 2009). Pertence a um grupo de compostos polifenólicos, os flavonoides, encontrados facilmente em plantas (LEWIN et al., 2011), como *Calendula officinalis* L. (PAHAL et al., 2018) e *Amorpha fruticose* L. (WANG et al., 2018), por exemplo; e bastante presentes na dieta humana.

**Figura 8 - Estrutura da quercetina (com representação das bandas I e II) e os três principais sítios de ligação na molécula da quercetina (indicados pelas setas)**



Fonte: GHOSH et al., 2015

Este flavonoide é bastante estudado devido às suas características: antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anti-protozoária, anti-cancerígena e imunomoduladora (BINSACK et al., 2001; SANCHARI et al., 2008; WIEGAND et al., 2009; VERMELHO et al., 2014; RAULF et al., 2018), com atividade leishmanicida comprovada contra várias espécies conforme compendiado por Menezes et al., 2015. Além disso, é considerado um excelente acceptor de radicais e quelante de metais (TEIXEIRA, 2016).

A estrutura deste flavonoide contendo grupos funcionais insaturados leva a mudanças nas transições eletrônicas quando radiação UV é utilizada. Assim, como ocorre com a maioria das flavonas e flavonóis, o espectro UV-Visível (UV-Vis) é dividido em banda I e banda II, onde a primeira está relacionada às transições  $n-\pi^*$  do sistema cinamoil representado pelo anel B, e a outra às transições cromofóricas  $\pi-\pi^*$  (grupos insaturados covalentes, como C=C, C=O ou NO<sub>2</sub>, que são responsáveis pela absorção eletrônica), do qual o anel A é representante (BUKHARI et al., 2009; LIU et al., 2014, GHOSH et al., 2015).

Uma das principais características da quercetina (QUE) no organismo é a inibição da atividade da arginase no parasito (SILVA et al., 2012) e a antioxidação através da inibição de radicais livres, dividida em três etapas: indução da produção e interação com íons superóxido (peróxido de hidrogênio) e de outras espécies reativas de oxigênio (ROS) por células infectadas por *Leishmania*, assim resultando em disfunção mitocondrial e morte do parasito (FONSECA-SILVA et al., 2011); formação de radicais hidroxila a partir da quelação de íons ferro no organismo e na peroxidação lipídica por reagir com radicais peróxi de lipídeos (BEHLING et al., 2004; PRIMIKYRI et al., 2015). Pode-se observar que a presença de grupos hidroxila é vista como potencialmente importante para quelar o ferro presente na matriz celular que induz dano oxidativo.

Bukhari et al. (2009) afirmam que grupos hidróxi- e oxi- presentes na quercetina têm a habilidade de formar complexos, atraindo, assim, a atenção de pesquisadores, somado às suas propriedades farmacológicas e biológicas.

Alguns dos estudos que investigam sua complexação com metais sugerem a existência de três principais sítios prováveis de ligação do metal na molécula da quercetina conforme ilustrado na Figura 8, que são 3-hidróxi-4-carbonila, 5-hidróxi-4-carbonila e 3'-4'-dihidroxilo (catecol) (GHOSH et al., 2015). Tal complexação varia de

acordo com o pH, forma da quercetina (anidra ou dihidratada) e metal complexado (BORGHETTI et al., 2012; PRIMIKYRI et al., 2015). Quando a quercetina anidra é usada como agente quelante do zinco (II), sugere-se que os locais de complexação sejam o oxigênio da carbonila C-4 e a hidroxila do C-3 por serem mais energeticamente favoráveis (PRIMIKYRI et al., 2015). O mesmo foi encontrado para o complexo gálio (III)-quercetina por Simões et al. (2013). No entanto, quando o cobre (II) se encontra complexado a quercetina anidra a pH 10, a dissociação do grupo 4'-OH no anel B provavelmente aumenta a habilidade de complexação do grupo orto-fenólico do anel B, que é do tipo catecol (JURASEKOVA et al., 2009).

Outro mecanismo sugerido por pesquisadores é a inibição da enzima arginase do parasito (MANJOLIN et al., 2013; TAKELE et al., 2013) e que há forte contribuição dos grupos catecol e hidroxilo da posição 3, presentes na estrutura química da quercetina (MANJOLIN et al., 2013).

Mais especificamente, de acordo com Chien et al. (2009), a quercetina ativa o programa apoptótico por meio da via mitocondrial dependente de  $Ca^{2+}$ , promovendo o aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  citosólicos, a abertura dos poros mitocondriais, o colapso do potencial da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo C mitocondrial.

De acordo com Muzitano et al. (2009) e Gomes et al. (2010), tanto a quercetina quanto seus derivados são ativos contra as formas visceral e cutânea da leishmaniose quando administradas por via oral.

Em estudos recentes, foi verificado que a quercetina apresenta propriedades contra a resistência a fármacos. Yuan et al (2015) verificaram que a quercetina foi responsável pela reversão a resistência a drogas em células tumorais orais. Além disso, Ponte-Sucre e Padrón-Nieves (2018) relatam que flavonoides se mostram promissores para reverter a resistência de fenótipos de leishmania a alguns fármacos, dentre eles, o antimônio, o que é favorável ao atual tratamento de primeira escolha.

Apesar de a quercetina apresentar valiosos efeitos benéficos sobre a saúde humana, possui algumas desvantagens como baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade, natureza hidrófoba e pouca permeabilidade. Para superar tais desvantagens, uma alternativa é a utilização da nanotecnologia (SANCHARI et al., 2008).

Gang et al. (2012) demonstraram que os nanomateriais são veículos de entrega de fármaco eficazes como carreadores de fármacos tumorais, por meio da nanoformulação de quercetina em polímero PEG2000-DSPE, que se mostrou mais eficaz do que a quercetina pura *in vitro*.

Vermelho et al. (2014) reuniu estudos de nanoencapsulação da quercetina e observaram que, *in vivo*, a quercetina nanoencapsulada é mais eficaz no controle da leishmaniose do que a forma livre.

Estudos sobre a atividade leishmanicida da quercetina foram compilados no quadro 1 a seguir:

**Quadro 1 - Investigação da atividade leishmanicida do flavonoide quercetina**

| <b>Espécie avaliada</b>                          | <b>Tipo de ensaio</b>                | <b>Resultado</b>   | <b>Referências</b>              |
|--|--------------------------------------|--|---------------------------------|
| Formas amastigotas de <i>L. donovani</i>         | <i>in vitro</i>                      | CI <sub>50</sub> de 1,0 µg /mL.  | Tasdemir <i>et al.</i> , 2006.  |
|  | <i>in vivo</i> , via intraperitoneal | Inibição da infecção de 15,3%.   | Tasdemir <i>et al.</i> , 2006.  |
| Formas amastigotas de <i>L. donovani</i>         | <i>in vitro e in vivo</i> , via oral | Em um CI <sub>50</sub> de 45,5 µM, o composto reduziu a carga de parasitos intracelulares em 70 %.   | Mittra <i>et al.</i> , 2000.    |
| Formas amastigotas de <i>L. donovani</i>         | <i>in vivo</i> , via oral            | Reduz a carga parasitária em aproximadamente 80 ± 9,7% (P <0,001, n = 6) em células de baço infectadas.  | Mittra <i>et al.</i> , 2000.    |
| Formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>    | <i>in vitro</i>                      | CI <sub>50</sub> de 1,0µg/mL.  | Muzitano <i>et al.</i> , 2006   |
| Formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>      | <i>in vitro</i>                      | A quercetina interage com o substrato L-arginina e o cofator Mn <sup>2+</sup> , a pH 9,6. Inibindo assim a enzima envolvida na biossíntese de poliaminas. O valor de IC <sub>50</sub> foi de 4.30 ± 0.03 µM. | Da Silva <i>et al.</i> , 2012.  |
| Formas amastigotas de <i>L. infantum chagasi</i> | <i>in vitro</i>                      | CI <sub>50</sub> de 10,6 µg/mL.  | Vila-Nova <i>et al.</i> , 2012. |

Adaptado de: Menezes et al., 2015

Apesar de existirem estudos que comprovam a formação de complexo antimônio (III) – quercetina, no intuito de realizar a descontaminação de águas poluídas por antimônio (ROJAS et al., 2013), até então existem escassos relatos na literatura de qualquer atividade farmacológica a respeito dos complexos antimônio (III) – quercetina, como por exemplo, a avaliação da atividade antioxidante do complexo (TONG et al., 2016).

Diante o exposto e, de acordo com Vermelho et al. (2014), a combinação de fitoquímica e nanoformulações pode abrir novas perspectivas na busca de novos fármacos leishmanicidas, devido a versatilidade (estrutural, formato, composição, capacidade de incorporação de substâncias hidrófilas e/ou lipófilas, etc.) dos sistemas de distribuição de fármacos com base em nanoformulações, que pode contribuir para melhorar a eficácia dos compostos naturais e tornando-os mais atraentes para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Portanto, foi sugerida a complexação de antimônio III com quercetina (ambos apresentam propriedades leishmanicidas), associados ao nanocarreador, visto que a quercetina e o carreador apresentam propriedades que podem minimizar os efeitos adversos causados pela utilização (BEHLING et al., 2004; SANCHARI et al., 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Preparar e analisar sistemas nanoestruturados Hidróxido Duplo Lamelar com antimônio trivalente e/ou quercetina e investigar seu efeito citotóxico e leishmanicida *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Preparar o novo carreador Mg, Al/Sb HDL;

3.2.2 Promover e analisar a complexação antimônio-quercetina (QUE-SbIII), assim como os processos inéditos de secagem para este complexo;

3.2.3 Preparar os nanosistemas binários Mg, Al Hidróxido Duplo Lamelar – quercetina (Mg, Al HDL-QUE) e Mg, Al/Sb Hidróxido Duplo Lamelar (Mg, Al/Sb HDL-QUE);

3.2.4 Preparar o nanosistema ternário antimônio – Mg, Al Hidróxido Duplo Lamelar – quercetina: [HDL-(QUE-SbIII)];

3.2.5 Caracterização físico-química e morfológica dos produtos obtidos;

3.2.6 Avaliação citotóxica;

3.2.7 Avaliação leishmanicida *in vitro* dos produtos obtidos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAL

Para síntese dos nanocarreadores e nanosistemas foram utilizados cloreto de alumínio, cloreto de magnésio e quercetina anidra, adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA), e tricloreto de antimônio, que foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. (Rio de Janeiro, Brasil). O tetraborato de sódio, utilizado para o preparo do tampão no preparo dos nanosistemas, foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

### 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

#### 4.2.1 Sistema binário Quercetina-Antimonial (QUE-SbIII)

O complexo QUE-SbIII foi obtido com a mistura (1:1 m/m) de uma solução aquosa de tricloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_3$ ) e uma solução de quercetina em tampão tetraborato de sódio, de mesmo volume e concentração (2 mg/mL). Para obtenção do complexo na forma de pó foram investigados três processos de secagem: liofilização, rotaevaporação e *spray drying*, porém todos passaram pelo processo de rotaevaporação para a retirada prévia do metanol. Dessa forma, o complexo precursor, na forma de solução, será identificado como QUE-SbIII SOL (solução), enquanto que os produtos finais da secagem foram identificados como QUE-SbIII LIO, QUE-SbIII ROTA e QUE-SbIII SD.

O rotaevaporador utilizado foi IKA HB10 digital (Campinas, Brasil). Nele, foi utilizada a temperatura de 80°C quando o objetivo foi a secagem total da solução e 60°C quando o objetivo foi apenas a retirada do metanol. Após retirada do metanol em rotaevaporador e posterior congelamento em freezer, o produto foi levado ao liofilizador Terroni LD1500 (São Carlos, Brasil) por aproximadamente 24 horas para total secagem (pressão 293 mmHg). Para a atomização, foi utilizado o mini *spray dryer* Büchi B-290 (New Castle, Estados Unidos) com temperatura de entrada de 200°C, temperatura de saída variando de 75 a 85° C, bomba (alimentação) 33% e aspirador 85%.

Visto a propriedade cromofórica dos complexos (semi-)metais-flavonoide, a fluorescência também pode ser visualmente analisada. Assim, a solução QUE-SbIII foi também avaliada por fluorimetria. Para isto, foi utilizado Helium-Neon laser 632,8 nm PHYWE (Göttingen, Alemanha) (Laboratório de Ensino do Instituto de Física - UFAL) e espectrofluorímetro RF-5301PC Shimadzu com Excitação 370 nm (Tóquio, Japão). Também foi possível visualizar este fenômeno por transluminescência, que foi avaliada

no Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais – UFAL, em equipamento Gel logic 200 da marca Kodak no comprimento de onda 306nm (Nova Iorque, EUA).

#### 4.2.2 Sistema binário Mg, Al HDL-QUE

Para síntese do nanosistema hidrotalcita-quercetina (Mg, Al HDL-QUE), o Mg, Al, Cl HDL precursor foi previamente sintetizado via direta pelo método de coprecipitação (HONGO et al, 2011; MENEZES et al., 2014).

Para a determinação da formulação do nanosistema binário foram avaliados previamente a proporção m/m flavonoide-argila (1:2; 1:1; 2:1), o solvente (etanol ou tampão tetraborato de sódio) e o tempo reacional (2 ou 24 horas). O tampão foi preparado segundo Alexandre (2010). Após agitação a temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada (4.000 rpm) por 30 minutos. A melhor condição, ou com o maior percentual de fármaco adsorvido/intercalado, calculado indiretamente por espectrofotometria UV-Vis do sobrenadante resultante, prosseguiu para caracterização. Para tal, foram construídas curvas de calibração nos solventes estudados (Apêndices 1 e 2).

#### 4.2.3 Sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE

O sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE consistiu na associação, via solução, do nanocarreador Mg, Al/Sb-HDL com a quercetina. Para preparar este nanosistema, inicialmente, foi sintetizado o nanocarreador Mg, Al/Sb-HDL de acordo com Kim et al. (2008), que teve por objetivo a substituição do íon alumínio presente na lamela pelo antimônio. Este nanocarreador teve  $\text{SbCl}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{AlCl}_3$  (em proporção 1: 4: 1 m/m) como precursores.

#### 4.2.4 Sistema ternário HDL-(QUE-SbIII)

Este nanosistema foi obtido pela associação do Mg, Al, Cl precursor, cujo procedimento de síntese já foi mencionado no item 4.2.1; e o complexo QUE-SbIII descrito no item 4.2.2. Para isso, HDL e complexo, em proporção de 1: 2 m/m, foram adicionados em tampão tetraborato de sódio e a suspensão foi mantida sob agitação por 2 horas. Logo após, o produto foi centrifugado (3.500 rpm/ 30 minutos) e o precipitado resultante foi seco à temperatura ambiente ( $26^\circ\text{C}\pm 2$ ) e reservado para posterior caracterização.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO

Por meio da espectrofotometria UV-Vis é possível propor modificações estruturais. Esta análise foi realizada em equipamento Micronal AJX-6100PC (São Paulo, Brasil), onde a faixa utilizada para leitura foi de 200 a 600 nm. Os nanosistemas que continham o flavonoide quercetina em sua composição, foram avaliados por espectrofotometria UV-Vis por meio do sobrenadante após a centrifugação (também por meio desta mesma técnica foi realizada a quantificação indireta de quercetina, visto que a quercetina estava contida no sobrenadante; através da construção de curva de calibração e aplicação da equação da reta).

Um aspecto observado nos complexos com quercetina é um aumento da fluorescência do complexo quando comparado à quercetina livre (ZHOU et al., 2001). Com o intuito de visualizar a formação de complexos à quercetina, foi realizada a espectrofluorescência em todos os sistemas que continham quercetina. Esta técnica foi realizada com o sobrenadante logo após a centrifugação, em equipamento Shimadzu RF-5301PC (Tóquio, Japão). Para a excitação da amostra foi utilizado um comprimento de onda de 370 nm e para a emissão, uma faixa de comprimento entre 400 e 750 nm.

Assim como a espectrofotometria UV-Vis, a espectrofluorescência foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação em Química Analítica (LINQA-UFAL).

A análise dos grupos funcionais presentes nos nanosistemas foi realizada por meio da técnica de espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (ou espectroscopia IV), onde o intervalo do número de ondas foi mantido na faixa de 500-4.000  $\text{cm}^{-1}$ . Para a obtenção dos dados, foram utilizadas pastilhas de KBr (2 mg de amostra- 200 mg de KBr seco), e a análise foi realizada em espectrômetro Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10, em modo Smart Omni Sampler Infrared Fourier Transform Spectroscopy (SOSIFT).

Com o objetivo de identificar as fases cristalinas presentes, foi realizada a técnica de difração de raio X (DRX), com o equipamento difratômetro Shimadzu XRD 7000 (Kyoto, Japão), utilizando a linha  $\alpha$  do cobre ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ) a uma tensão do tubo de 40 kV e corrente do tubo de 40 mA. A aquisição foi dada em intervalos de  $0,02^\circ$  ( $2\theta$ ) na faixa de 3 a  $90^\circ$ . Através da equação de Bragg ( $n\lambda = 2.d.\text{sen}\theta$ ), o espaçamento basal  $d(003)$  foi calculado.

As técnicas de espectroscopia IV e DRX foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Nanosistemas Carreadores de Substâncias Ativas (TecNano-UFAL).

O perfil termogravimétrico (estabilidade térmica) foi traçado por meio de Análise Termogravimétrica (TG) realizado em termobalança Shimadzu, modelo DTG-60H (Kyoto, Japão). A análise foi realizada à temperatura ambiente (25°C) até 800°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>, sob fluxo de nitrogênio (60 mL min<sup>-1</sup>) para evitar degradação termo-oxidativa. Esta análise foi realizada no Laboratório de Síntese de Catalisadores (LSCat-UFAL).

Para a análise morfológica, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando os microscópios Shimadzu SSX-550 Superscan (Kyoto, Japão) no Laboratório OPTMA (OPTMA/UFAL) e Tescan S8000G (Libušina tř., República Checa) no Instituto Federal de Alagoas. Previamente, a amostra foi metalizada com ouro por 200 segundos à 45mA em metalizadora Quorum (Laughton, Inglaterra) Q150R ES.

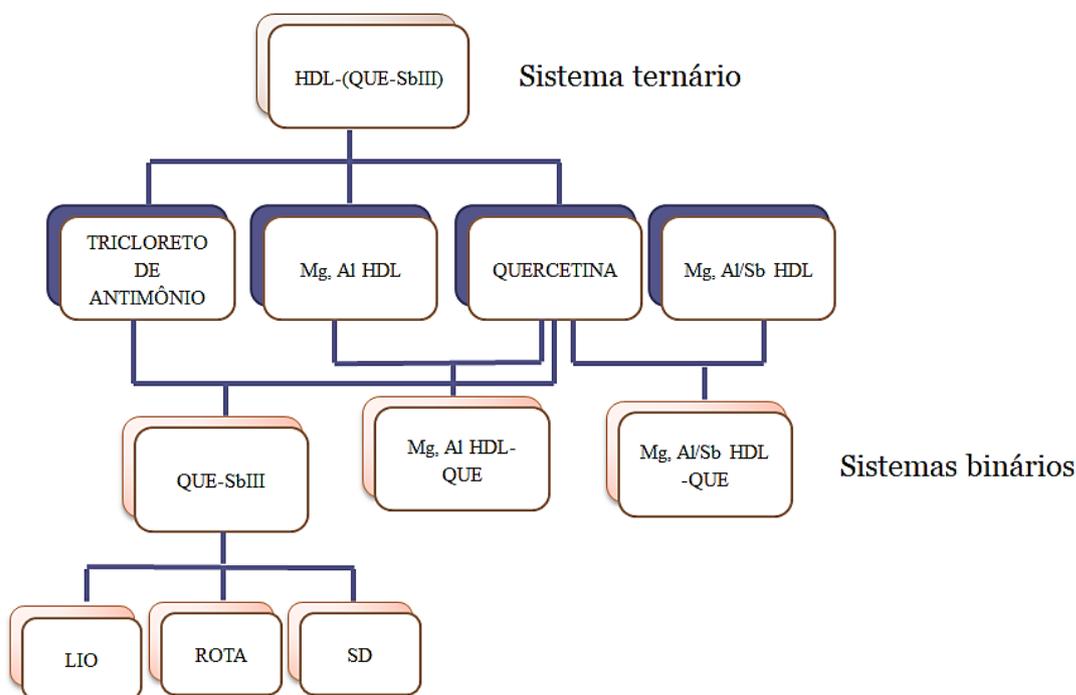
As amostras que continham antimônio foram ainda submetidas à técnica de Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) para a quantificação deste elemento, em acordo com a Farmacopeia Britânica (2007) utilização de espectrômetro Spectro (Kleve, Alemanha), modelo Arcos – SOP com leitura realizada no comprimento de onda 206 nm. Esta análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP com o pó (aproximadamente 1mg).

Além das técnicas já citadas, foi também utilizada a espectroscopia Raman para o nanocarreador Mg, Al/Sb HDL. Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro Renishaw (Gloucestershire, Reino Unido) localizado na Central Analítica da Universidade Federal de Alagoas, por meio de um laser Hene e um comprimento de onda de 775 nm.

#### 4.4 Fluxograma para identificação de amostras

A Figura 9 apresentada a seguir, tem por objetivo facilitar o entendimento do preparo das amostras obtidas.

**Figura 9 – Fluxograma para identificação de precursores e produtos obtidos**



Fonte: Autoria própria

#### 4.5 AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA *IN VITRO* DOS PRODUTOS OBTIDOS

##### 4.5.1 Atividade leishmanicida

##### 4.5.1.1 Manutenção da linhagem de macrófagos

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura com 5 mL de meio RPMI e 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. No momento do uso, as células foram centrifugadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e contadas para plaqueamento dos experimentos.

##### 4.5.1.2 Determinação da viabilidade celular

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de 5 x 10<sup>4</sup> células/poço e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> *overnight*, para adesão dos macrófagos a placa. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e foram

acrescentadas as diferentes concentrações das substâncias. Os poços controles eram células cultivadas somente com meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT (MOSMANN, 1983). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

#### 4.5.1.3 Avaliação leishmanicida *in vitro* dos produtos obtidos sobre as formas promastigotas de *Leishmania*

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* ( $2 \times 10^6$  células/mL) foram mantidas *in vitro* em meio de Schneider suplementado com 10% de FBS e 2% de urina humana na presença de várias concentrações das substâncias e pentamidina (0,1, 1,0, 10 e 100, 200 e 300  $\mu$ L) durante 48 horas a 26 ° C. As células foram também cultivadas em meio isentos de compostos (controle de crescimento basal), ou com 0,1% de DMSO (veículo controle). Os promastigotas foram ajustados para uma concentração de  $10^2$  em PBS no momento da contagem e as células viáveis foram contadas em uma câmara de Neubauer (TIUMAN et al., 2005).

#### 4.5.1.4 Avaliação da carga parasitária intracelular *in vitro*

Os macrófagos da linhagem J774 foram cultivados sobre lamínulas em placa de 48 poços. Após 24 horas, eles foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, numa proporção de 10 parasitos/macrófago. Em seguida, a placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub>. Após este período de infecção, os macrófagos foram “lavados” com Hank’s sem soro, para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram, então, cultivados com meio DMEM na presença ou não de diferentes concentrações dos compostos derivados da CA-4 e foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub> por 2 dias. Após este período, as células foram fixadas com metanol, coradas e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi realizada com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100x (NUNES et al., 2005).

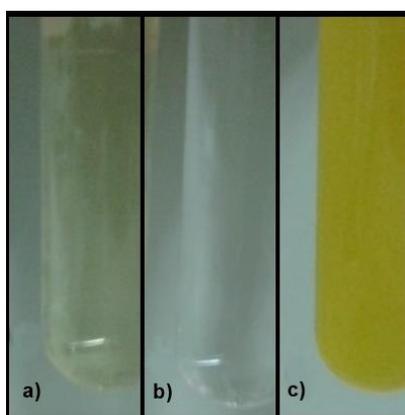
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUE-SbIII

#### 5.1.1 Solução

Após mistura das soluções aquosa de antimônio e solução de quercetina em tampão tetraborato de sódio; notou-se uma mudança imediata da coloração do produto para amarelo alaranjado (Figura 10). Tal característica foi observada por Viswanathan et al. (2000), que também notou aparecimento de fluorescência no complexo QUE-SbIII, quando a quercetina estava em solução metanólica.

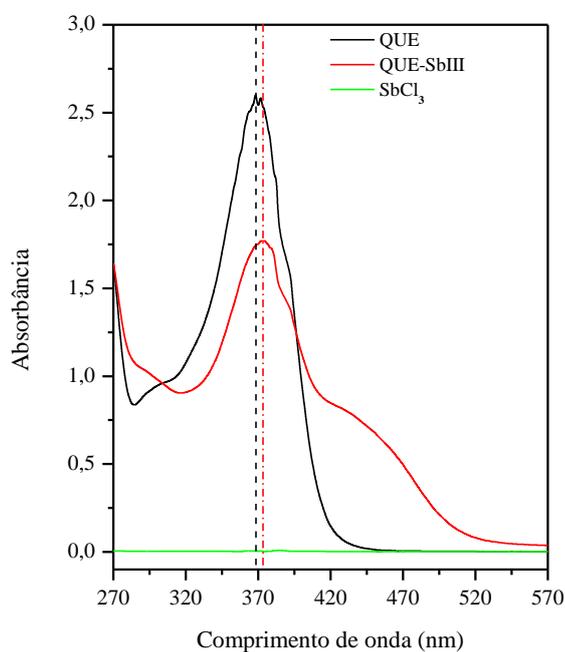
**Figura 10 - Inspeção visual das soluções: a) QUE; b) antimônio e c) complexo QUE-SbIII SOL**



Fonte: Autoria própria

Através de análise por UV-Vis (Figura 11), observou-se que o SbIII, como esperado, não apresentou absorbância, formando apenas uma linha de base. Ao contrário do que foi visto comparando-se a quercetina com o complexo, onde nota-se deslocamento batocrômico de 368 (quercetina) para 373 nm no complexo QUE-SbIII Solução (QUE-SbIII SOL), indicando a formação do complexo QUE-SbIII na posição C3 da molécula de quercetina.

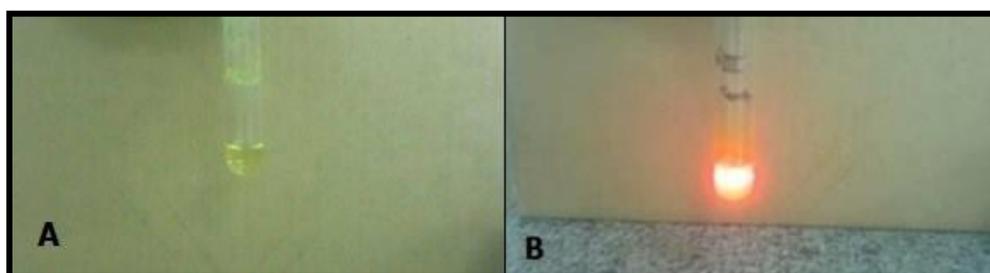
**Figura 11 - Espectros UV-Vis de quercetina, do complexo QUE-SbIII SOL e de SbCl<sub>3</sub>**



Fonte: Autoria própria

Como visto anteriormente, quando complexada a metais, a quercetina possui como característica a fluorescência, sendo assim, através de laser hélio-neon (Figura 12), obteve-se que a quercetina livre não apresentou fluorescência, ao contrário do que acontece quando complexado.

**Figura 12 - Inspeção visual decorrente da incidência do laser hélio-neon (632,8 nm) sobre as soluções: a) QUE b) QUE-SbIII SOL**

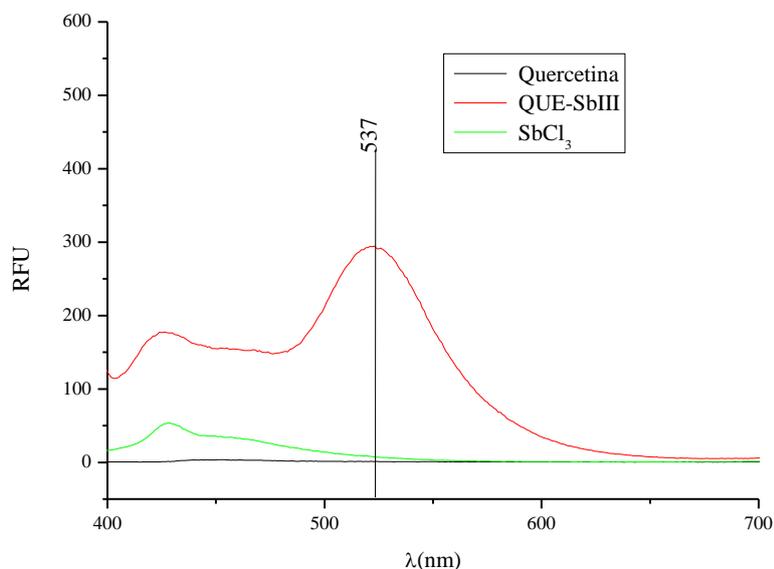


Fonte: Autoria própria

Análise através de fluorímetro ainda reafirmou a presença de fluorescência no complexo com emissão máxima em 537 nm, quando excitado em 370nm como pode ser

visto na Figura 13. Assim, aliada ao desvio batocrômico no UV-Vis, a emissão de fluorescência ratifica a formação do complexo.

**Figura 13 - Fluorescência do complexo QUE-SbIII em relação à quercetina (com excitação em 370 nm)**



Fonte: Autoria própria

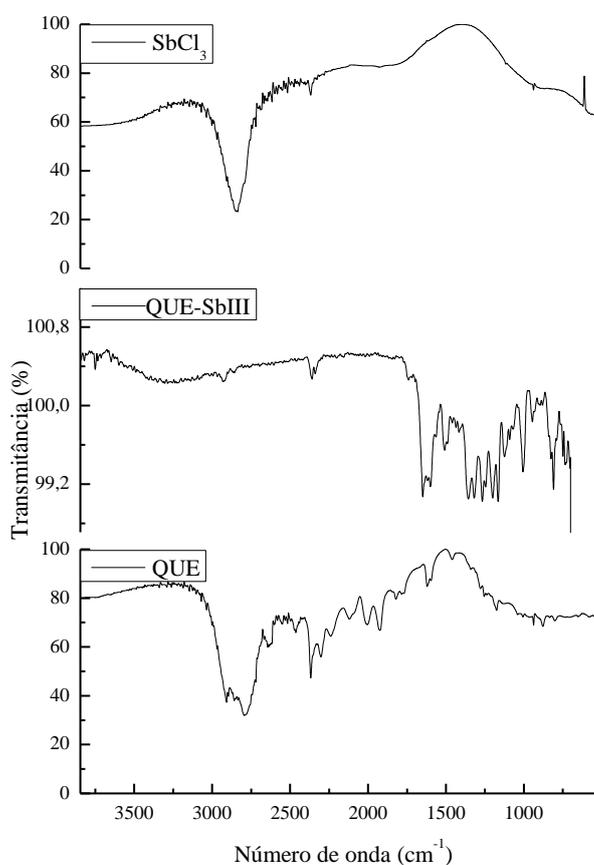
Os valores provenientes da análise de espectroscopia IV para o cloreto de antimônio ( $\text{SbCl}_3$ ) estão apresentados na Figura 14. A região que compreende de  $3.699$  a  $2.792 \text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento OH que representa água adsorvida, assim como a banda em  $1619 \text{ cm}^{-1}$  referente a carbonila proveniente de  $\text{CO}_2$  adsorvido da atmosfera. As bandas  $753$  e  $665 \text{ cm}^{-1}$  correspondem às ligações Sb-O, visto que nesta faixa ocorrem vibrações correspondentes às ligações M-O (DUOMO et al., 1997).

A partir da análise dos espectros obtidos por espectroscopia IV para o complexo QUE-SbIII SOL (Figura 14), verificou-se uma diminuição da frequência da carbonila característica da quercetina antes do complexo, anteriormente em  $1661 \text{ cm}^{-1}$  para  $1648 \text{ cm}^{-1}$ , caracterizando a ocorrência da complexação. As bandas de vibração C=C do fenol ( $1603 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1558 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1502 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1422 \text{ cm}^{-1}$ ) e de vibração angular no plano de ligação O-H do grupamento fenol ( $1343 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1309 \text{ cm}^{-1}$ ) foram alteradas, inferindo a ocorrência de modificação da molécula da quercetina nesta região. As bandas características de deformação assimétrica de C-O-C ( $1196 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1151 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1117 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1003 \text{ cm}^{-1}$ ) e

deformação angular fora do plano de C-H aromático ( $947\text{ cm}^{-1}$ ,  $822\text{ cm}^{-1}$ ) foram mantidas, indicando que não foram verificadas alterações moleculares (SIMÕES et al., 2013; BAKKIALAKSHMI; BARANI, 2013).

A banda em  $750\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a ligações metálicas com o oxigênio (DUOMO et al., 1997).

**Figura 14 - Espectro de espectroscopia IV por KBr do complexo QUE-SbIII e de seus precursores**



Fonte: Autoria própria

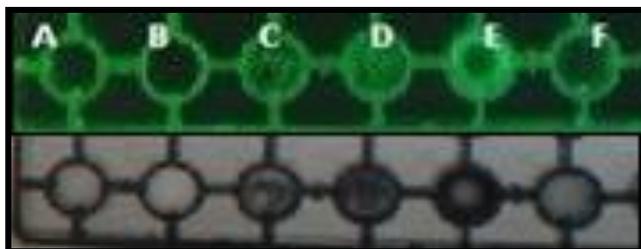
Tendo em vista este resultado, sugeriu-se que o sítio de ligação do Sb à quercetina seja na carbonila da posição 4 e em C-3.

### 5.1.2 QUE-SbIII LIO; QUE-SbIII ROTA; QUE-SbIII SD

Inicialmente, optou-se pela secagem do complexo no intuito de aumentar a estabilidade química e microbiológica dos complexos, tendo em vista a fotossensibilidade da quercetina, melhora na facilidade de seu acondicionamento e armazenagem (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Assim, mediante a escassez relatos na literatura de secagem desses produtos, objetivou-se avaliar o efeito de três técnicas de secagem sobre o complexo. Todas as técnicas levaram à formação de um pó de coloração amarelada.

A avaliação dos complexos por transluminescência foi realizada com o intuito de enfatizar a complexação da quercetina ao antimônio nos três produtos após os processos de secagem. Esta técnica tornou possível a visualização da não-fluorescência dos materiais precursores comparada a fluorescência dos complexos QUE-SbIII solução e aos complexos restituídos. Na Figura 15 podem ser visualizadas: na parte superior as amostras sob o laser transluminescente; e na parte inferior da figura as mesmas amostras sem a incidência do laser.

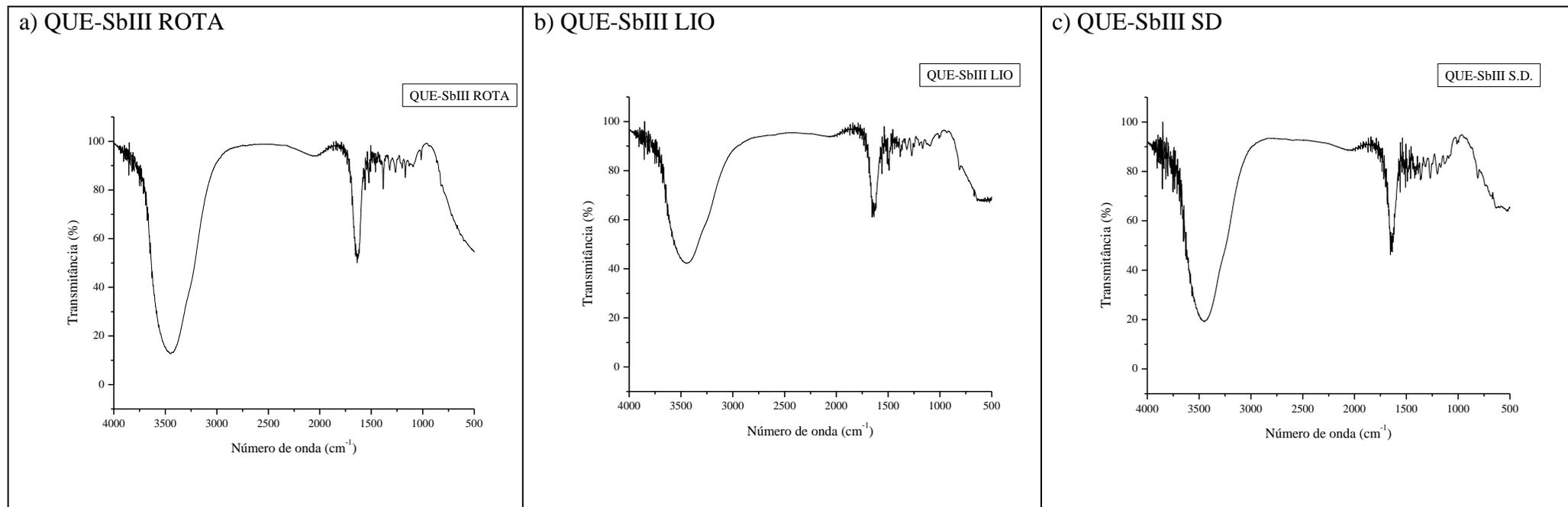
**Figura 15 - Amostras após transluminescência (306nm): A) QUE, B) SbCl<sub>3</sub>, C) QUE-SbIII SOL D) QUE-SbIII LIO, E) QUE-SbIII ROTA e F) QUE-SbIII SD**



Fonte: Autoria própria

Os dados de espectroscopia IV foram compilados no na Figura 16 e no Quadro 2. A partir desta técnica, notou-se que QUE-SbIII ROTA; QUE-SbIII LIO; e QUE-SbIII SD, apresentaram uma diminuição da frequência da carbonila característica da quercetina antes do complexo, anteriormente em  $1661\text{ cm}^{-1}$  para  $1651$ ,  $1649$  e  $1652\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, conforme visto no complexo QUE-SbIII SOL ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ).

Figura 16 - Espectros na região do infravermelho por KBr dos sistemas binários: a) QUE-SbIII ROTA, b) QUE-SbIII LIO, c) QUE-SbIII SD



Fonte: Autoria própria

Foram observadas alterações nas bandas características de vibração C=C do fenol nos complexos oriundos dos três processos de secagem.

**Quadro 2 - Comparação entre as diferentes frequências dos produtos analisados por espectroscopia IV**

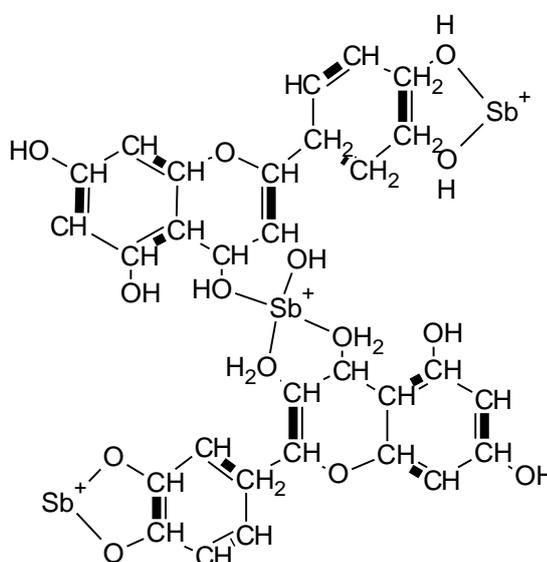
| Composto                | $\nu$ (O-H)                | $\nu$ (C=O)           | $\nu$ (C=C) <sub>fenol</sub>   | $\delta$ (C-OH) <sub>fenol</sub>  | $\nu$ (C-O-C)   | $\nu$ (M-O)/ $\nu$ (O-M-O) |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------|--|---|---|----------------------------|
| <b>Quercetina (QUE)</b> | 3436 cm <sup>-1</sup>      | 1661 cm <sup>-1</sup> | 1589 cm <sup>-1</sup><br>1516 cm <sup>-1</sup><br>1428 cm <sup>-1</sup>                          | 1392 cm <sup>-1</sup><br>1341 cm <sup>-1</sup><br>1320 cm <sup>-1</sup> | 1202 cm <sup>-1</sup><br>1159 cm <sup>-1</sup><br>1107 cm <sup>-1</sup><br>1085 cm <sup>-1</sup><br>1012 cm <sup>-1</sup> | -                          |
| <b>QUE-SbIII (SOL)</b>  | 3367-2955 cm <sup>-1</sup> | 1648 cm <sup>-1</sup> | 1603 cm <sup>-1</sup><br>1558 cm <sup>-1</sup><br>1502 cm <sup>-1</sup><br>1422 cm <sup>-1</sup> | 1343 cm <sup>-1</sup><br>1309 cm <sup>-1</sup>                          | 1196 cm <sup>-1</sup><br>1151 cm <sup>-1</sup><br>1117 cm <sup>-1</sup><br>1003 cm <sup>-1</sup>                          | 750 cm <sup>-1</sup>       |
| <b>QUE-SbIII (ROTA)</b> | 3735-2939 cm <sup>-1</sup> | 1640 cm <sup>-1</sup> | 1516 cm <sup>-1</sup><br>1465 cm <sup>-1</sup>   | 1385 cm <sup>-1</sup><br>1326 cm <sup>-1</sup>                          | 1209 cm <sup>-1</sup><br>1166 cm <sup>-1</sup><br>1136 cm <sup>-1</sup><br>1100 cm <sup>-1</sup><br>1020 cm <sup>-1</sup> | 720 cm <sup>-1</sup>       |
| <b>QUE-SbIII (LIO)</b>  | 3692-2968 cm <sup>-1</sup> | 1632 cm <sup>-1</sup> | 1509 cm <sup>-1</sup><br>1487 cm <sup>-1</sup><br>1450 cm <sup>-1</sup>                          | 1378 cm <sup>-1</sup><br>1333 cm <sup>-1</sup>                          | 1209 cm <sup>-1</sup><br>1166 cm <sup>-1</sup><br>1105 cm <sup>-1</sup><br>1100 cm <sup>-1</sup>                          | 750 cm <sup>-1</sup>       |

|                                 |                               |                       |                       |                       |                       |  |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| <b>QUE-SbIII</b><br><b>(SD)</b> | 3676-2954<br>cm <sup>-1</sup> | 1640 cm <sup>-1</sup> | 1560 cm <sup>-1</sup> | 1355 cm <sup>-1</sup> | 1195 cm <sup>-1</sup> | 691 cm <sup>-1</sup><br>640 cm <sup>-1</sup> |
|                                 |                               |                       | 1487 cm <sup>-1</sup> | 1319 cm <sup>-1</sup> | 1159 cm <sup>-1</sup> |  |
|                                 |                               |                       | 1414 cm <sup>-1</sup> |                       | 1129 cm <sup>-1</sup> |  |
|                                 |                               |                       |                       |                       | 1085 cm <sup>-1</sup> |  |
|                                 |                               |                       |                       |                       | 1005 cm <sup>-1</sup> |  |

Fonte: Aatoria própria

A deformação em C-O-H fenólica, observada em 1314 cm<sup>-1</sup> na quercetina, aparece em 1315 cm<sup>-1</sup> nos complexos na forma de pó. Segundo Bukhari et al. (2009), quando acontece deslocamento desse grupo, há indícios de aumento na ordem da ligação, que é normalmente observado quando a complexação com metais envolve o grupo o-fenólico (O-H) no anel B da quercetina, inferindo-se, assim, que também houve coordenação do metal através da estrutura o-fenólica da quercetina (Figura 17).

**Figura 17 – Estrutura proposta para a ligação entre quercetina e antimônio no sistema binário QUE-SbIII**



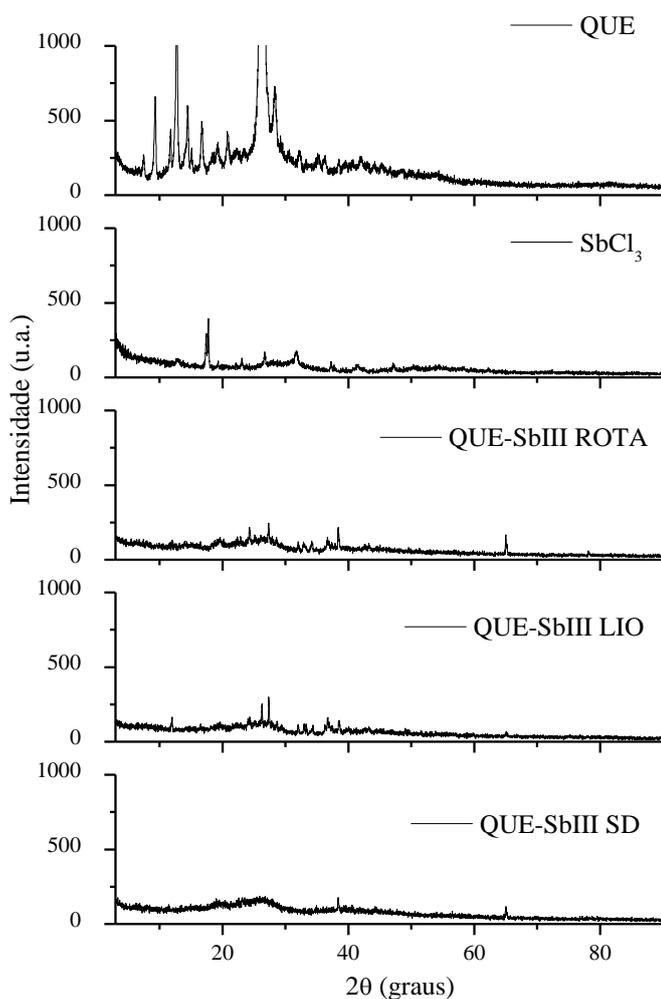
Fonte: Aatoria própria (ACD/ChemSketch)

A presença de vibração em 750 e 741 cm<sup>-1</sup> nos complexos representa (Sb-O), o que confirma a formação do complexo, conforme visto no estudo de Rada et al. (2014), que indica que o intervalo de 550 a 750cm<sup>-1</sup> é atribuído a sobreposição de vibrações de estiramento Sb-O-Sb. As frequências de vibração entre 3.699 e 2.362 cm<sup>-1</sup> indicam a

existência de água no complexo e também nas formas livres (RAVICHANDRAN; RAJENDRAN; DEVAPIRIAN, 2014), provavelmente absorvidos do ambiente.

Resultados de difração de raio X permitiram, ainda, visualizar as diferenças de cristalinidade dos materiais precursores e dos complexos, visualizados na Figura 18.

**Figura 18 - Difratoograma dos complexos QUE-SbIII obtidos por diferentes processos de secagem e de seus precursores**



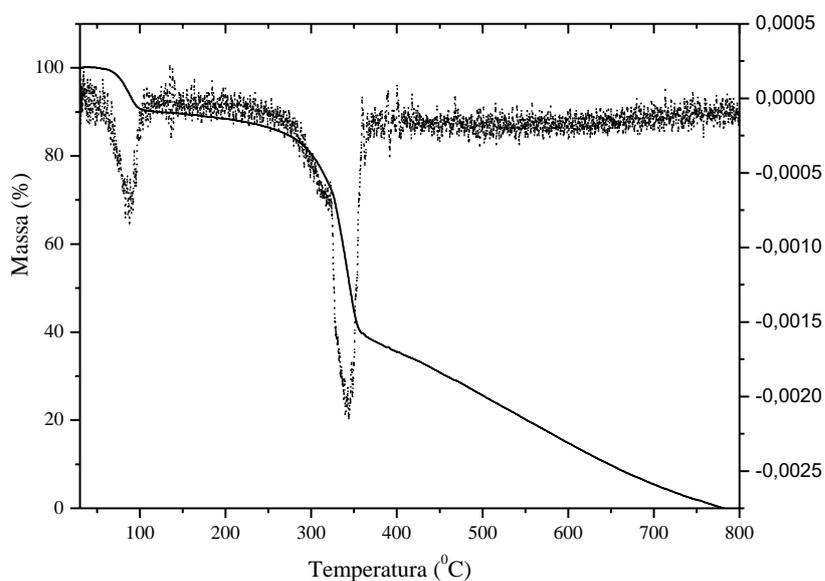
Fonte: Autoria própria

Os precursores tricloreto de antimônio e a quercetina apresentam-se cristalinos (sendo a quercetina mais cristalina do que o tricloreto de antimônio), (Figura 19), visto a presença de picos demarcados; enquanto que os complexos QUE-SbIII mostram redução na cristalinidade, visto a presença de poucos picos. Isto ratifica a formação de novos produtos.

Vale destacar que o complexo QUE-SbIII que passou pelo processo de *spray dried* é o que apresenta maior amorfização, o que nos leva a supor a degradação da quercetina quando esta é exposta a elevadas temperaturas.

A curva termogravimétrica da quercetina (Figura 19) apresentou perda de massa em duas etapas, visto que foram observados dois picos endotérmicos (de acordo com a DTG). A primeira perda de peso, do início até 86°C com perda de 10,2% de massa está relacionada à desidratação (perda de H<sub>2</sub>O de solvatação) e à evaporação de compostos orgânicos; e a segunda, de 279°C a 361,3°C, com perda de massa de 53,10%, referente à liberação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e degradação das moléculas de quercetina (BORGHETTI et al., 2012; COSTA et al., 2002). Nesta segunda etapa, é possível observar que ocorre uma reação secundária durante ou um pouco antes da reação principal. Ao fim da curva, verifica-se que toda a quercetina foi degradada.

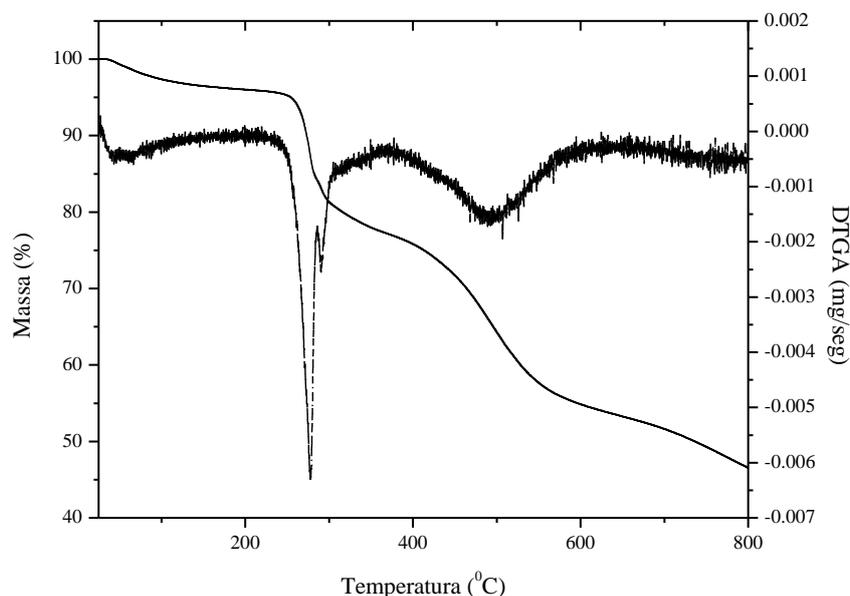
**Figura 19 - Curva termogravimétrica da quercetina**



Fonte: Autoria própria

O perfil de degradação do complexo QUE-SbIII é mostrado nas Figuras 20, 21 e 22 a seguir:

**Figura 20 - Curva termogravimétrica do complexo QUE-SbIII ROTA**



Fonte: Autoria própria

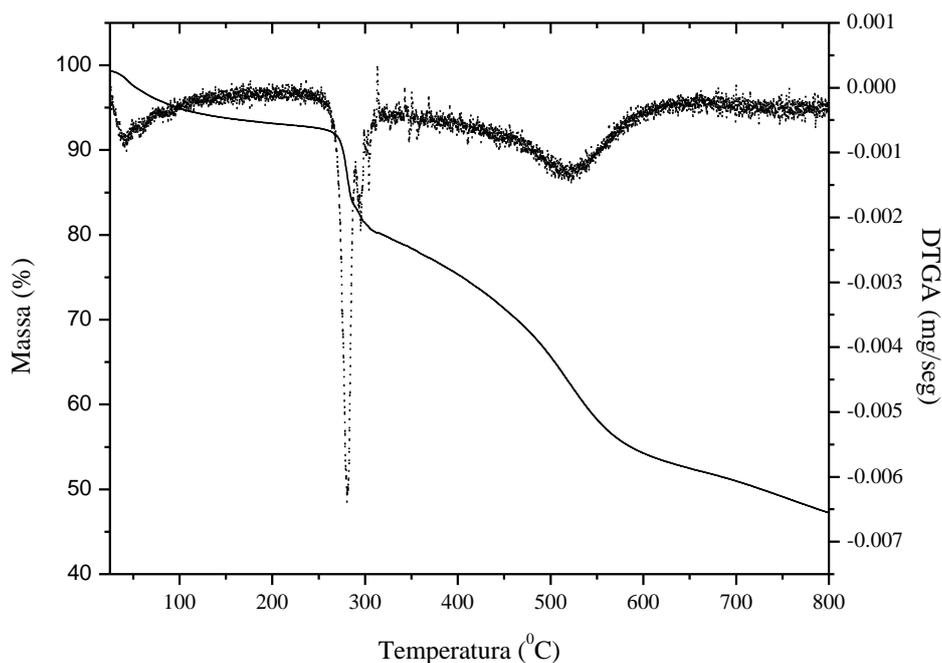
Como já descrito anteriormente, a curva termogravimétrica da quercetina apresentou perda de massa em duas principais etapas. Na curva termogravimétrica do sistema binário QUE-SbIII ROTA também são verificadas duas principais perdas de massa, com a presença de grandes deslocamentos em relação à quercetina: a primeira perda de massa ocorrida para a quercetina ocorreu em torno de 67°C enquanto que no sistema binário QUE-SbIII ROTA, a primeira perda de massa ocorreu em 261°C (com uma perda de 53,45% em massa); na quercetina, a segunda perda de massa ocorreu em torno de 297,7°C na quercetina e no sistema binário QUE-SbIII ROTA ocorreu em torno de 459°C (com uma perda de 28,42% em massa), ambos podem ser observados com o auxílio da derivada e tal comparação confirma a formação de um novo produto.

No entanto, supõe-se que o sistema binário QUE-Sb ROTA não tenha sido totalmente degradado a 800°C, como ocorreu com a quercetina pura porque ainda existem resíduos no final da curva. Supõe-se que a temperatura aplicada não foi capaz de degradar o antimônio, porque este elemento possui ponto de ebulição bastante elevado (1587°C). Ao fim da análise, são observados 46,55% em massa da amostra (QUE-SbIII ROTA), tendo em vista que a quercetina, de acordo com seu perfil termogravimétrico, é

completamente degradada, supõe-se que esta porcentagem esteja relacionada com a quantidade de antimônio presente na amostra.

Na Figura 21 a seguir, observa-se a curva termogravimétrica para o sistema binário QUE-SbIII que passou pelo processo de secagem por liofilização.

**Figura 21 - Curva termogravimétrica do complexo QUE-SbIII LIO**

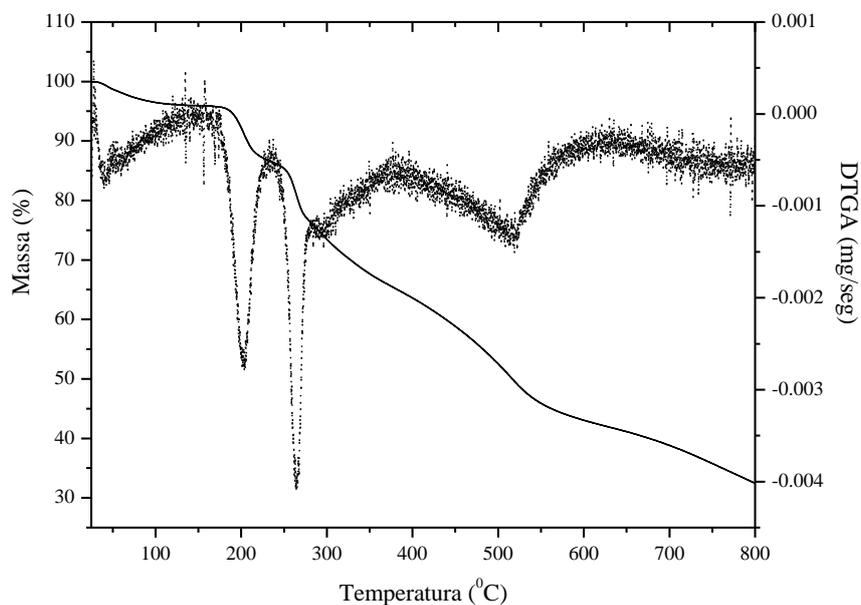


Fonte: Autoria própria

De acordo com a curva, em 269,58°C ocorreu a primeira perda de massa (52,71%) do sistema binário QUE-SbIII LIO e a segunda, em 471,24°C, com perda de 27,13% em massa. Ao fim da análise termogravimétrica, foi observada a presença de 47,25% da massa inicial da amostra submetida à análise e grande semelhança com a curva termogravimétrica obtida para QUE-SbIII ROTA. Assim como para QUE-SbIII ROTA, propõe-se que esta porcentagem esteja relacionada à presença de antimônio.

Na Figura 22 a seguir, observa-se a curva termogravimétrica para o sistema binário QUE-SbIII SD, que foi submetido ao processo de secagem por *spray dried*.

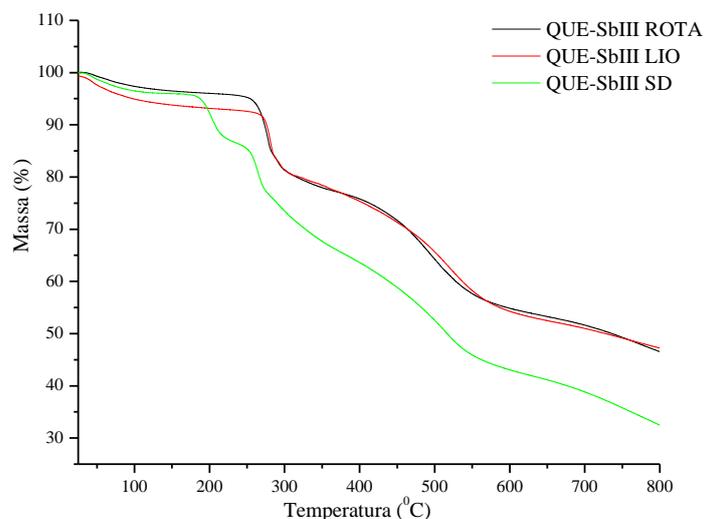
**Figura 22 - Curva termogravimétrica do complexo QUE-SbIII SD**



Fonte: Autoria própria

A curva termogravimétrica demonstra um perfil semelhante aos demais processos de secagem, no entanto, há redução na primeira perda, em comparação com os demais processos de secagem para este sistema binário. Esta primeira perda (67,54%) ocorreu em torno de 219°C e a segunda, ocorreu no mesmo intervalo dos demais sistemas QUE-SbIII (em torno de 470,25°C), com quantidade de perda em massa também semelhante (30,06%). Ao fim da análise, a quantidade de amostra presente foi de 32,46%, um pouco inferior aos demais sistemas binários QUE-SbIII. A Figura 23 demonstra a comparação entre tais sistemas.

**Figura 23 - Curvas termogravimétricas dos complexos QUE-SbIII**

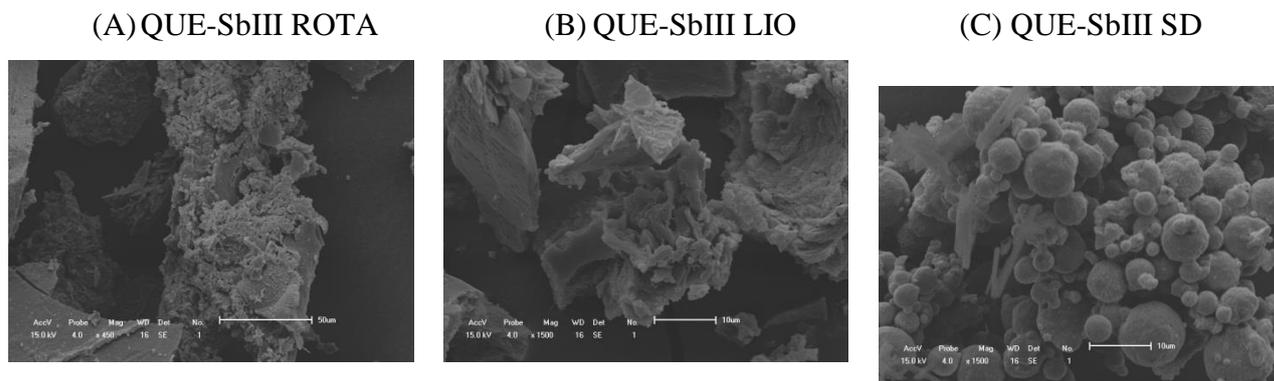


Fonte: Autoria própria

As curvas termogravimétricas dos sistemas binários QUE-SbIII ROTA e LIO demonstram elevado grau de semelhança, enquanto que o sistema QUE-SbIII SD, embora apresente semelhança com os demais sistemas em relação à temperatura, as perdas de massa ocorreram de forma mais acentuada. Supõe-se que tal fato se deve à presença de partículas em tamanhos menores, obtidas pela utilização da tecnologia por aspersão *spray drying*, o que é característico na obtenção de partículas por este método de secagem (OLIVEIRA et al., 2010).

Na Figura 24, podem ser observadas as morfologias dos sistemas binários QUE-SbIII secos pelos três processos de secagem: rotaevaporação, liofilização e *spray dried* por meio de micrografias obtidas por meio de Microscopia eletrônica de Varredura.

**Figura 24 - Micrografia dos sistemas binários (A) QUE-SbIII ROTA, (B) QUE-SbIII LIO e (C) QUE-SbIII SD**



Fonte: Autoria própria

A micrografia do sistema binário seco por rotaevaporação (QUE-SbIII ROTA) mostra a presença de cristais aglomerados com tamanhos (50-100  $\mu\text{m}$ ) e formas variáveis, com superfície irregular (Figura 24A).

A micrografia obtida para o sistema binário seco por liofilização (QUE-SbIII LIO) mostrou semelhança com QUE-SbIII ROTA, porém apresentou aglomerados com tamanho médio de 10 a 50  $\mu\text{m}$  e de superfície menos rugosa do que o sistema binário rotaevaporado (Figura 24B).

O sistema binário seco por *spray drier* mostrou-se bem diferente, morfologicamente, do que os demais complexos QUE-SbIII, pois apresentou-se na forma de microesferas de tamanhos variáveis (1,89 a 13,7  $\mu\text{m}$ ) e de superfície pouco áspera (Figura 24C).

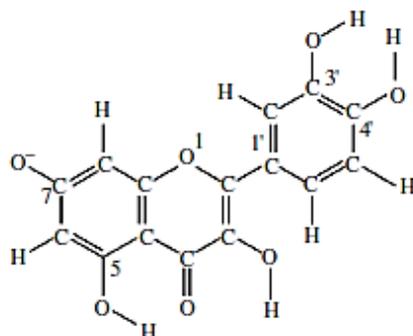
## 5.2 SISTEMA BINÁRIO Mg, Al HDL-QUE

Como relatado na metodologia, foram realizadas curvas de calibração para a determinação da formulação de Mg, Al HDL-QUE a ser utilizada.

De acordo com a curva de calibração (Apêndices 1 e 2), o solvente foi fundamental para a formação do nanocompósito de Mg, Al HDL-QUE, que ocorre rapidamente, em 2 horas (Apêndice 3). O Mg, Al HDL é uma argila lamelar, cujas lamelas são carregadas positivamente (potencial zeta = +21,0, em pH 5,8). Em ambos os sistemas estudados, o pH era superior ao pKa da quercetina (6,74 – Arshad et al., 2009), ou seja, possivelmente

a rápida formação do nanocompósito é justificada pela interação eletrostática entre a quercetina ionizada (Figura 25) e a argila.

**Figura 25 - Fórmula estrutural da quercetina na forma desprotonada**



Fonte: Kazakova et al., 2002

Os sistemas preparados em tampão tiveram rendimento superior ao outro grupo (Tabela 1), mas a partir de 24 horas em solução, foi observada degradação da quercetina, com o escurecimento de sua coloração amarela original, por isso esta variável de tempo reacional não foi apresentada. Em ambos os sistemas, a proporção fármaco-argila estudada pareceu não influenciar o percentual de adsorção/intercalação. Por isso, foi selecionada a formulação 1:1 Mg, Al HDL-QUE preparada em tampão tetraborato de sódio por 2 horas.

**Tabela 1- Rendimento de adsorção/intercalação obtido com as variáveis estudadas**

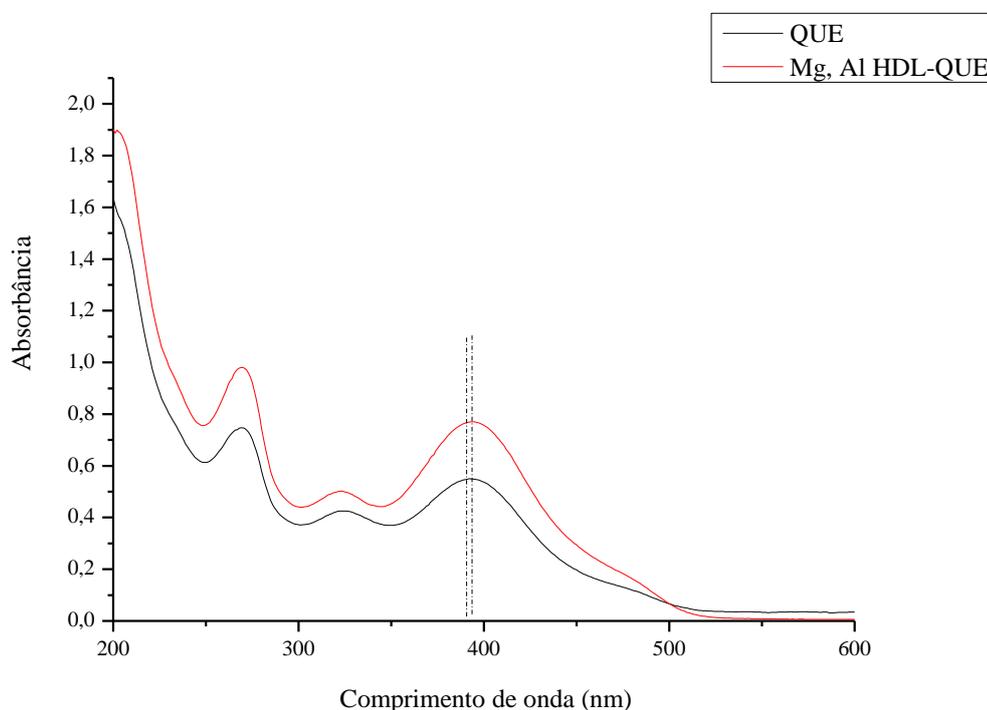
| <b>PROPORÇÃO<br/>M/M Mg, Al<br/>HDL-QUE</b> | <b>SOLVENTE</b>             | <b>TEMPO<br/>REACIONAL</b> | <b>% DE ADSORÇÃO/<br/>INTERCALAÇÃO</b> |
|---|-----------------------------|----------------------------|--|
| 2:2   | Etanol                      | 2h                         | 26,66                                  |
| 1:1   | Etanol                      | 2h                         | 34,46                                  |
| 1:2   | Etanol                      | 2h                         | 33,16                                  |
| 2:1   | Tampão tetraborato de sódio | 2h                         | 66,03                                  |
| 1:1   | Tampão tetraborato de sódio | 2h                         | 65,08                                  |
| 1:2   | Tampão tetraborato de sódio | 2h                         | 66,74                                  |

Fonte: Autoria própria

De forma semelhante ao estudo de Viswanathan, Sriram, Yogeewaran (2000) por UV-Vis, onde as bandas da quercetina livre foram deslocadas de 273 para 438 nm, respectivamente, quando complexada com SbIII; o nanosistema binário Mg, Al HDL-QUE demonstrou ocorrência do mesmo fenômeno (Figura 26), visto que tal nanosistema apresentou um deslocamento batocrômico para 393nm, o que sugere a complexação da quercetina aos metais presentes no nanocarreador.

Tais deslocamentos são explicados por Bukhari et al. (2009) como provocados pela extensão do sistema conjugado quando ocorre a formação da complexação. Viswanathan, Sriram, Yogeewaran (2000) explicam ainda que existe um efeito cooperativo de uma ou mais hidroxilas com o grupamento hidroxila na posição 3 na molécula de quercetina para que haja o desvio batocrômico no espectro UV-Vis, característico da complexação, indicando, pois, que a posição C-3 é um importante requisito para a formação do complexo.

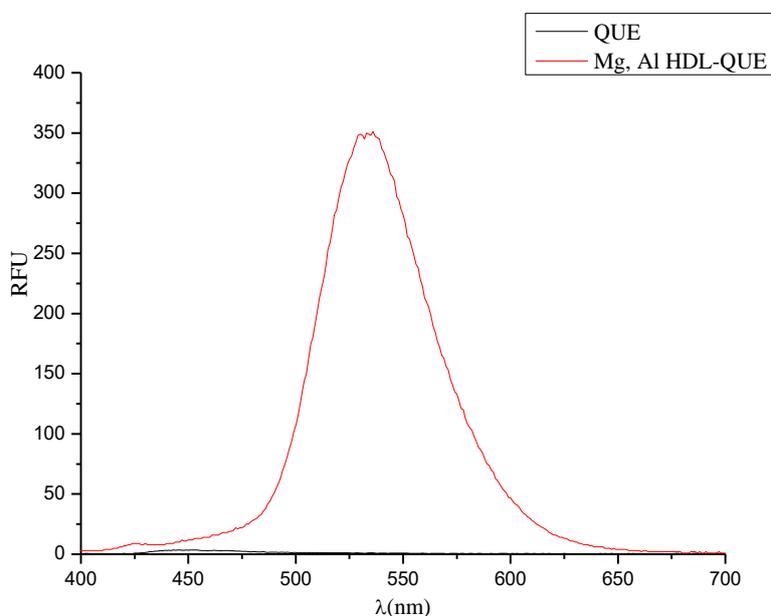
**Figura 26 - Espectro UV-Vis do nanosistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seu precursor QUE**



Fonte: Autoria própria

Sabe-se que a quercetina é caracterizada por sua baixa fluorescência ou ausência, no entanto, Mezzetti et al. (2011) sugerem que a modificação das propriedades da quercetina quando ligada a outras moléculas, como aos (semi)-metais, talvez se dê pela formação de ânions numa significativa fração das espécies de quercetina. Assim, o aparecimento da fluorescência da quercetina quando complexada ocorre pela formação de espécies aniônicas fluorescentes. Desta forma, a análise de fluorimetria (Figura 27) apresentou emissão máxima em 534 nm, com excitação em 370 nm do nanosistema binário, comprovando a formação de complexo entre a quercetina e os metais presentes do Mg,Al HDL (PAVUN et al., 2014; VISWANATHAN et al., 2000), enquanto que a quercetina pura não apresentou fluorescência.

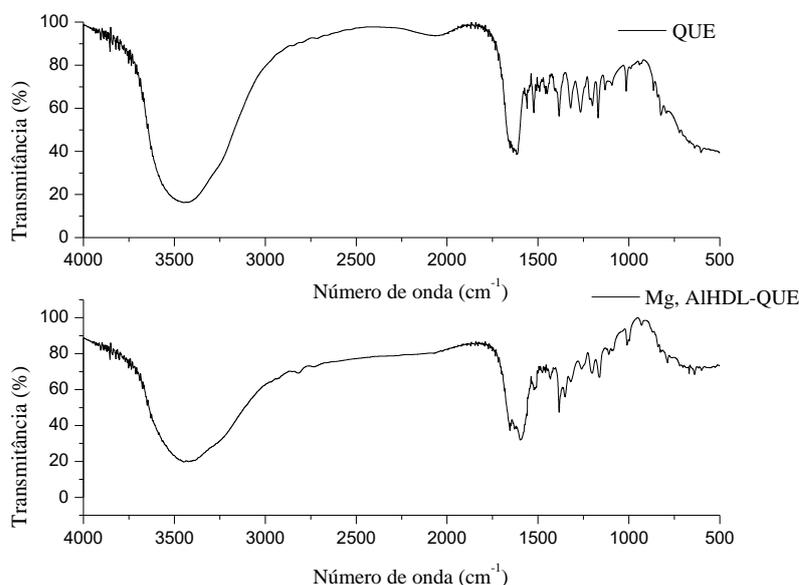
**Figura 27 - Fluorescência do sistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seu precursor QUE**



Fonte: Autoria própria

A partir de análises por espectroscopia IV, obteve-se o espectro da quercetina (Figura 28), no qual se podem observar suas principais bandas: banda intensa em  $3436\text{ cm}^{-1}$  relativa à deformação axial da ligação OH ( $\nu\text{OH}$ ) e às pontes de hidrogênio intramoleculares de grupos hidroxila livres e intermoleculares; estiramento em  $1661\text{ cm}^{-1}$  referente à carbonila ( $\nu\text{C=O}$ ); as bandas  $1589\text{ cm}^{-1}$ ,  $1516\text{ cm}^{-1}$  e  $1428\text{ cm}^{-1}$  referem-se a vibração C=C do fenol (SILVERSTEIN et al., 1962).

**Figura 28 - Espectro obtido por espectroscopia IV por KBr do sistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seus precursores**



Fonte: Autoria própria

As bandas  $1392\text{ cm}^{-1}$ ,  $1341\text{ cm}^{-1}$  e  $1320\text{ cm}^{-1}$  referem-se a vibração angular no plano da ligação O-H do grupamento fenol. A banda em  $1260\text{ cm}^{-1}$  refere-se à vibrações de estiramento axial da ligação C-O em fenóis. As bandas  $1202\text{ cm}^{-1}$ ,  $1159\text{ cm}^{-1}$ ,  $1107\text{ cm}^{-1}$ ,  $1085\text{ cm}^{-1}$  e  $1012\text{ cm}^{-1}$  são referentes a deformação assimétrica de C-O-C (KLOPROGGE et al. 1999; SIMÕES et al., 2013; BENÍCIO et al., 2015). As bandas  $997\text{ cm}^{-1}$  e  $932\text{ cm}^{-1}$  são condizentes à deformação angular fora do plano de C-H aromático (BAKKIALAKSHMI; BARANI, 2013), assim como as bandas localizadas na região de  $900\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$  indicam a absorção de núcleos aromáticos (vibração angular fora do plano de C-H) (SILVERSTEIN et al., 1962).

De acordo com Silverstein et al., (1962), a confirmação do anel aromático é feita na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  a  $1500$ , através das bandas de absorção da ligação C=C do anel.

Deve-se ressaltar também a presença de bandas assimétricas, indicando a presença de diferentes conformações da molécula (BHORGETTI et al., 2012; BERLIER et al., 2013).

O espectro obtido por espectroscopia IV do sistema binário Mg, Al HDL-QUE revela uma larga banda em torno de  $3443\text{ cm}^{-1}$  característica de estiramento ( $\nu\text{OH}$ ) (KLOPROGGE et al. 1999; SIMÕES et al., 2013; BENÍCIO et al., 2015), presente tanto

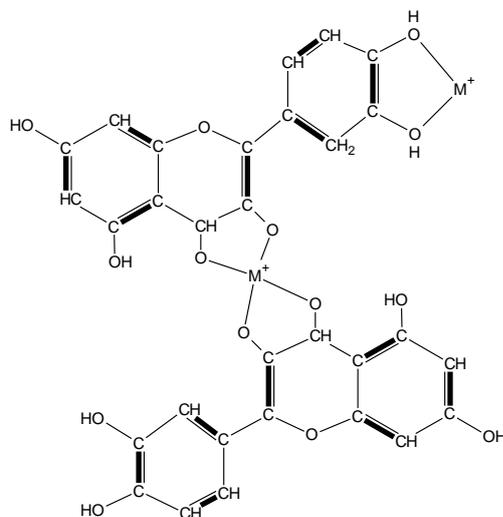
na quercetina pura quanto no nanocarreador Mg, Al HDL; uma banda em  $1618\text{ cm}^{-1}$ , onde verificou-se uma redução da frequência da carbonila característica da quercetina (anteriormente, na molécula de quercetina, em  $1661\text{ cm}^{-1}$ ). Esta redução de frequência, segundo Tong et al., (2016), sugere mudança na molécula da quercetina nesta região.

Zhou et al. (2001), sugere que tal diminuição de frequência esteja relacionada a coordenação do oxigênio da carbonila com o íon metálico (III) e dos grupos 3-OH ou 5-OH do ligante depois da protonação para formar as ligações metal-oxigênio dos complexos. Segundo Simões et al. (2013), como o grupo 3-hidroxil é o mais ácido (a depender do meio), é provável que este seja o primeiro sítio onde ocorre quelação, já que este é considerado o melhor agente quelante, onde a maior deslocalização dos elétrons no grupo 3-OH, facilita a deslocalização dos elétrons  $\pi$ , sendo seguido de complexação na carbonila de posição 4; e portanto estes são os primeiros sítios envolvidos nos processos de complexação (BUKHARI et al., 2009; JURASEKOVA et al., 2009).

As demais bandas também apresentam pequenos deslocamentos em relação à quercetina pura, o que sugere que haja complexação também no grupamento fenol: bandas referentes à reflexão de fenol, em  $1523\text{ cm}^{-1}$  e  $1494\text{ cm}^{-1}$ ; vibração angular no plano da ligação O-H do grupamento fenol, em  $1450\text{ cm}^{-1}$ ,  $1399\text{ cm}^{-1}$ ,  $1385\text{ cm}^{-1}$  e  $1319\text{ cm}^{-1}$ ; vibração de estiramento axial da ligação C-O em fenóis, em  $1268\text{ cm}^{-1}$ ; deformação assimétrica de C-O-C, em  $1202\text{ cm}^{-1}$ ,  $1166\text{ cm}^{-1}$ ,  $1122\text{ cm}^{-1}$  e  $1012\text{ cm}^{-1}$  e de deformação angular fora do plano de C-H aromático, em  $939\text{ cm}^{-1}$ ) (SIMÕES et al., 2013; BAKKIALAKSHMI; BARANI, 2013).

Em relação ao nanocarreador Mg, Al HDL, o produto Mg, Al HDL-QUE, também apresentou similaridade, visto que o carreador também apresenta banda larga e intensa relativa ao estiramento OH em  $3420\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao grupo OH da água adsorvida ou da água interlamelar. E uma banda em  $604\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a ligações M-O ou O-M-O, visto que, de acordo com BOTTAN (2011) e KLOPROGGE et al. (1999), na região de  $644$  a  $543\text{ cm}^{-1}$  são observadas bandas de vibrações referentes aos M-O ou O-M-O caracterizando as ligações entre os cátions e oxigênio. A seguir, na Figura 29, é apresentada a estrutura proposta do sistema binário Mg, Al HDL-QUE.

**Figura 29 – Estrutura proposta de ligação entre metal e quercetina no sistema binário Mg, Al HDL-QUE**

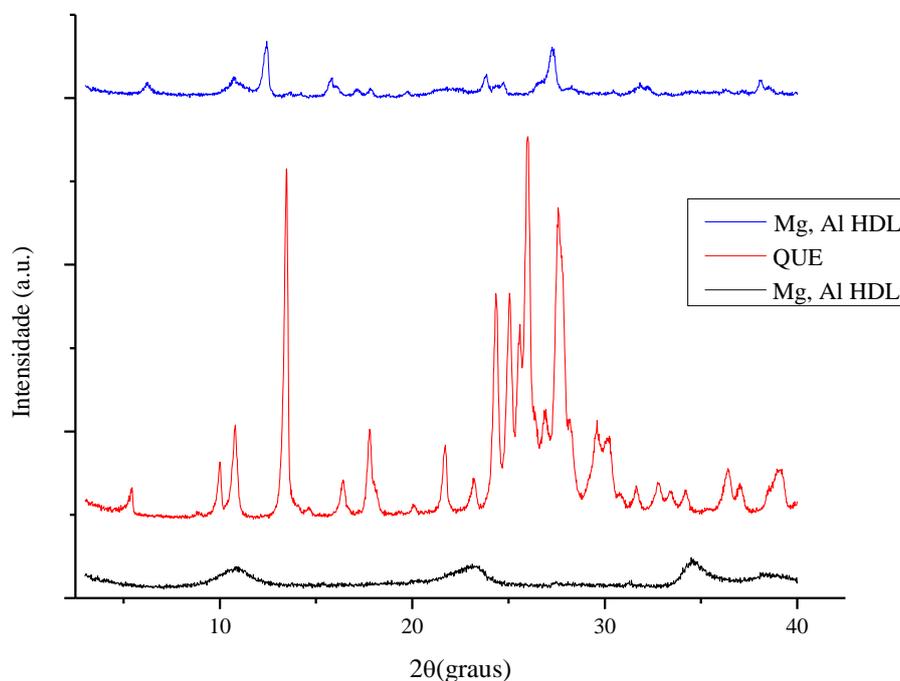


Fonte: Autoria própria (ACD/ChemSketch)

Com isto, verifica-se a formação de um novo produto que contém características mistas de seus precursores e confirma a formação do complexo Mg, Al HDL-QUE já sugerido por UV-Vis.

A difratometria é um parâmetro físico-químico que demonstra a cristalinidade das substâncias. Com isto, os difratogramas do material precursor e do sistema binário Mg, Al HDL-QUE são apresentados na figura 30, a seguir.

**Figura 30 – Difratograma dos precursores e do sistema binário formado Mg, Al HDL-QUE**



Fonte: Autoria própria

O difratograma da quercetina confirma sua alta cristalinidade, conforme já relatado por Kakran et al. (2012) e Borghetti et al. (2012), com a presença de numerosos e distintos picos em: 5,42; 10,00; 10,82; 13,50; 16,41; 17,82; 21,73; 23,29; 24,37; 25,09; 25,62; 26,03; 26,34; 26,95; 27,67; 29,55; 29,63°, correspondentes à quercetina na forma anidra.

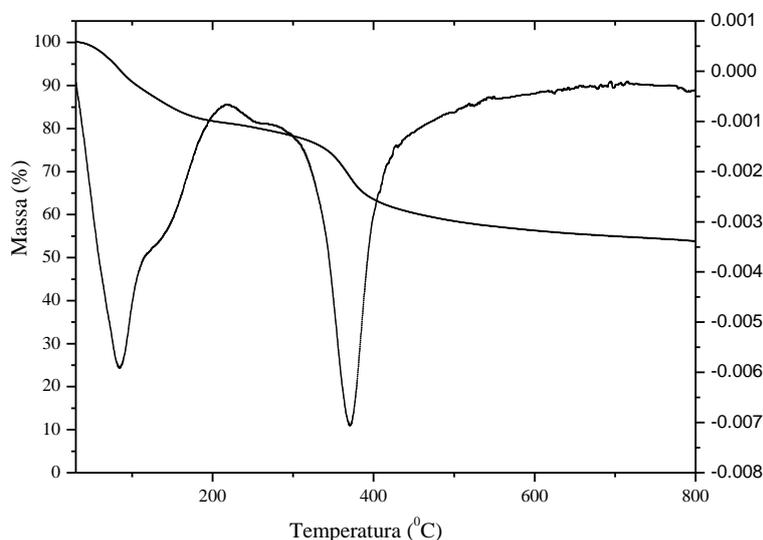
O difratograma do HDL precursor é também apresentado na figura 29 e exibe um material com alta cristalinidade. Os valores da distância basal encontrados foram similares aos considerados como característicos pelos manuais mineralógicos (ALLMANN; JEPSEN, 1969), sugerindo o sucesso da síntese. O valor de espaçamento basal, de 7,76Å, calculado a partir da equação de Bragg, apresenta-se semelhante ao observado por Cavani et al. (1991), quando o cloreto é o ânion interlamelar, podendo variar entre 7,6 e 7,8Å, dependendo do grau de hidratação do material. Além disso, os planos de difração em d(003), d(006) e d(009), em 11,40°; 23,08° e 34,42°,

respectivamente, sugerem que tais estruturas possuem simetria romboédrica característica de hidrotalcitas sintetizadas.

O sistema binário mostrou-se com aspecto cristalino e promoveu aumento do espaçamento basal do HDL para 8,16 Å, sugerindo a intercalação da quercetina com a substituição do cloreto.

Na Figura 31, é mostrada a curva termogravimétrica do Mg, Al HDL. O DTG mostra dois picos endotérmicos, assim caracterizando um padrão característico da estrutura do HDL (CHOUDARY et al., 2002). O primeiro pico, com uma perda de massa de 17,9%, ocorre até 222,9° C e corresponde à água superficial adsorvida e à água interlamelar. O segundo pico ocorreu entre 270,9°C e 464,1°C com uma perda de massa de 19,1%. Nesta última ocorre a desidroxilação estrutural e a consequente perda da estrutura lamelar, acompanhada pela provável formação de HCl líquido (KLOPROGGE et al., 2001; CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009; SILION et al., 2010). Ao fim da curva, foram quantificados 53,91% em massa de Mg, Al HDL.

**Figura 31 - Curva termogravimétrica do Mg, Al HDL**

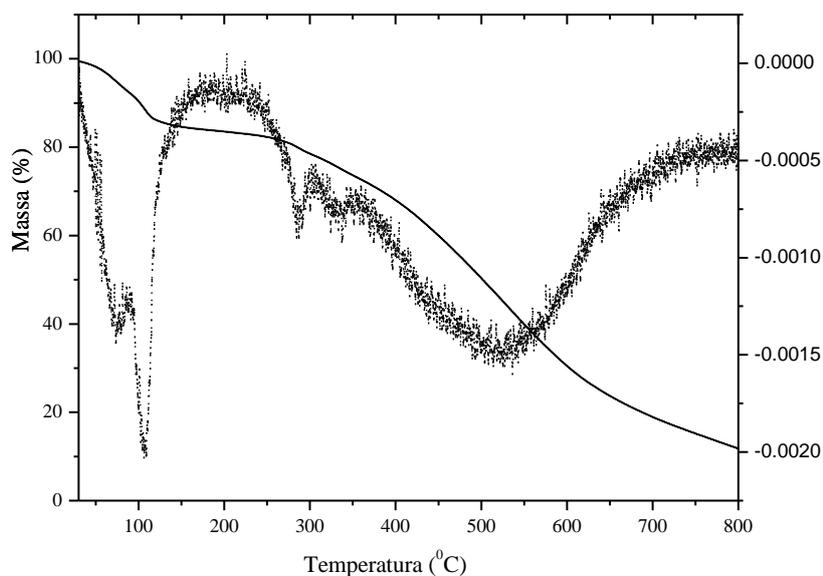


Fonte: Autoria própria

Em comparação com o perfil termogravimétrico da quercetina e do HDL, o sistema binário (Figura 32) apresentou perfil diferente. Foram observadas duas principais perdas de massa: a primeira ocorreu de 25°C até 120°C com perda de 13,88% (pode estar

associada à desidratação ou à evaporação de compostos orgânicos) e a segunda no intervalo de 278,9°C a 532,7°C com perda de 46,44% em massa (pode estar associada à liberação de CO<sub>2</sub>, degradação das moléculas de quercetina e/ou à desidroxilação estrutural do Mg, Al HDL com formação de HCl).

**Figura 32 - Curva termogravimétrica do sistema binário Mg, Al HDL-QUE**

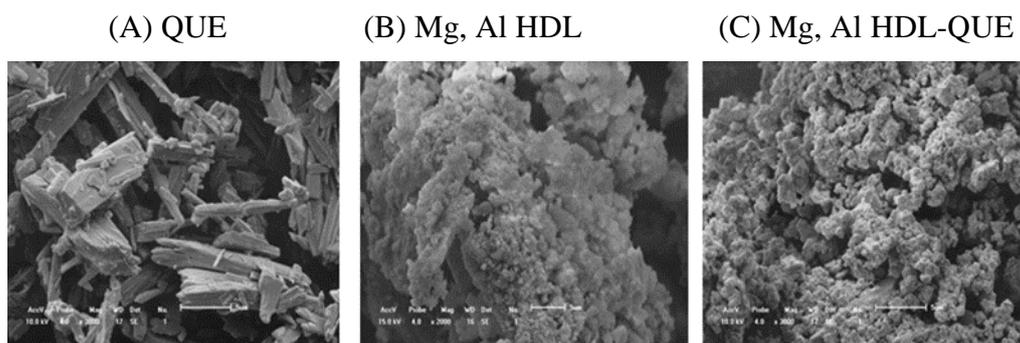


Fonte: Autoria própria

No entanto, assim como para o HDL, observa-se que ao final do perfil termogravimétrico do sistema binário Mg, Al HDL-QUE não houve degradação completa do material que foi submetido à análise, visto que ao fim da análise foi observada a presença de 11,8% em massa do sistema binário Mg, Al HDL-QUE. O que é justificado pelas elevadas temperaturas de degradação de materiais metálicos (IFA, 2016).

A Figura 33 apresenta as micrografias da quercetina, do HDL precursor e do nanosistema Mg, Al HDL-QUE, respectivamente. A quercetina é apresentada como cristais de forma colunar, de tamanho grande e irregular que, em parte, justifica sua baixa solubilidade em água (Borghetti et al., 2012). O HDL apresenta-se na forma de microcristais de tamanho e forma regular.

**Figura 33 - Micrografias do sistema binário Mg, Al HDL-QUE e de seus precursores**



Fonte: Autoria própria

A morfologia do sistema binário Mg, Al HDL-QUE (Figura 33C) ainda apresentou semelhante ao Mg, Al HDL (Figura 33B), no entanto, com a adição da quercetina (Figura 33A) os cristais não permaneceram aparentes, assim sugerindo sua fragmentação com provável aumento da área superficial.

### 5.3 SISTEMA BINÁRIO Mg, Al/Sb HDL-QUE

O sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE consistiu na associação do nanocarreador Mg, Al/Sb-HDL com a quercetina. Diante disto, foi realizada a caracterização deste precursor, mostrada a seguir, juntamente com os resultados de caracterização do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE.

Previamente, assim como o sistema Mg, Al HDL-QUE, foram construídas curvas de calibração, para a determinação da formulação de Mg, Al/Sb HDL-QUE a ser utilizada.

**Tabela 2- Parâmetros de linearidade obtidos com a quercetina em tampão tetraborato de sódio em diferentes proporções**

| SOL-<br>VENTE                                 | COMPRI-<br>MENTO DE<br>ONDA (nm) | PROPORÇÃO<br>m/m Mg, Al/Sb<br>HDL-QUE | FAIXA DE<br>LINEARI-<br>DADE<br>(µg/mL) | EQUA-<br>ÇÃO DA<br>RETA                          | APÊN-<br>DICE |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|---|--|---------------|
| Tampão<br>tetraborato<br>de sódio (pH<br>9,2) | 370                              | 1:1                                   | 25-200                                  | y =<br>4.1478x +<br>0.1643<br><br>(R=<br>0,9930) | [2]           |
| Tampão<br>tetraborato<br>de sódio (pH<br>9,2) | 370                              | 1:2                                   | 25-200                                  | y =<br>3.7978x +<br>0.255<br><br>(R=<br>0,9905)  | [3]           |
| Tampão<br>tetraborato<br>de sódio (pH<br>9,2) | 370                              | 2:1                                   | 25-200                                  | y =<br>4.0876x +<br>0.094<br><br>(R=<br>0,9944)  | [3]           |

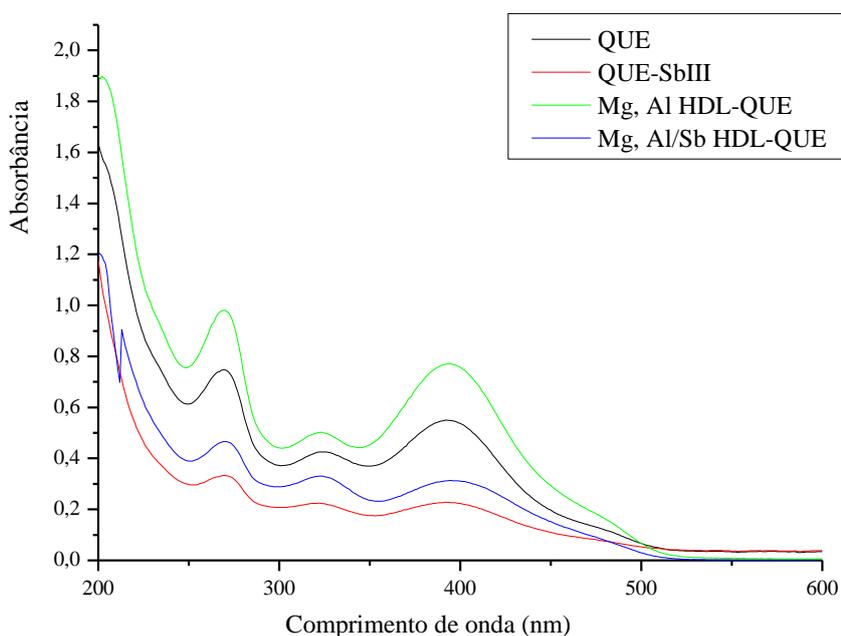
Fonte: Autoria própria

Com base na tabela 2, foi determinada a utilização da formulação de Mg, Al/Sb HDL-QUE da proporção 1:1 m/m.

No espectro UV-Vis, o nanosistema Mg, Al/Sb HDL-QUE, apresentou um deslocamento batocrômico de 28 nm em relação à quercetina (Figura 34) (deslocamento de 368nm da quercetina para 393nm do Mg, Al/Sb HDL-QUE). Tal deslocamento, embora maior, foi relatado por Viswanathan et al. (2000), onde as bandas da quercetina livre foram deslocadas de 273 para 438 nm, quando complexada ao SbIII, devido um efeito cooperativo de uma ou mais hidroxilas com o grupamento hidroxila na posição 3

na molécula de quercetina, indicando assim, que a posição C-3 é um importante requisito para a formação do complexo antimônio-quercetina. Segundo Bukhari et al. (2009), esse deslocamento é provocado pela extensão do sistema conjugado quando ocorre a formação do complexo.

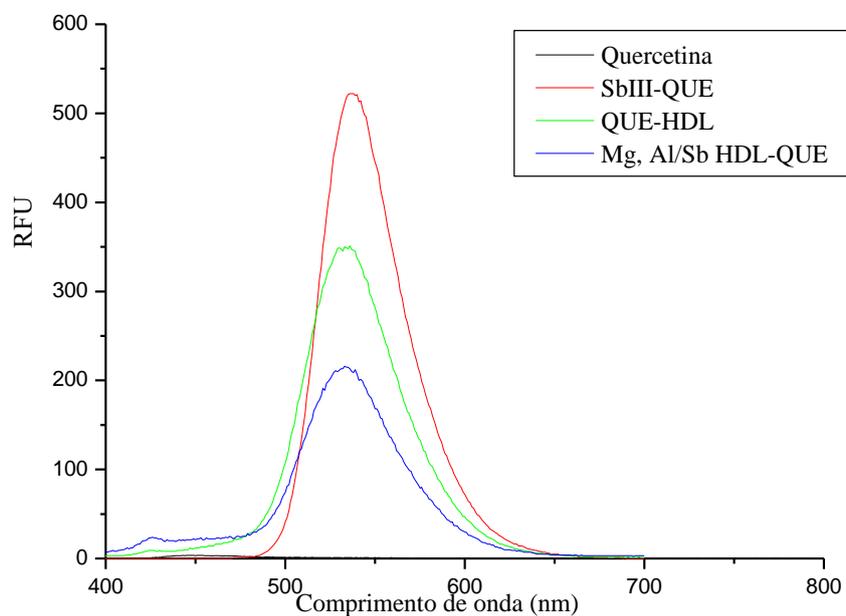
**Figura 34 - Espectros UV-Vis do nanosistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE em comparação com o complexo QUE-SbIII, com a quercetina precursora e com o sistema binário Mg, Al HDL-QUE**



Fonte: Autoria própria

Como já relatado anteriormente, a complexação (semi-)metal-QUE possui como característica a capacidade em emitir fluorescência (VISWANATHAN et al., 2000). Este comportamento também foi observado no nanosistema Mg, Al/Sb HDL-QUE (Figura 35), que apresentou emissão máxima em 532 nm, de forma semelhante ao complexo QUE-SbIII (537 nm). No entanto, é perceptível a redução na intensidade, o que pode estar associado à presença do HDL.

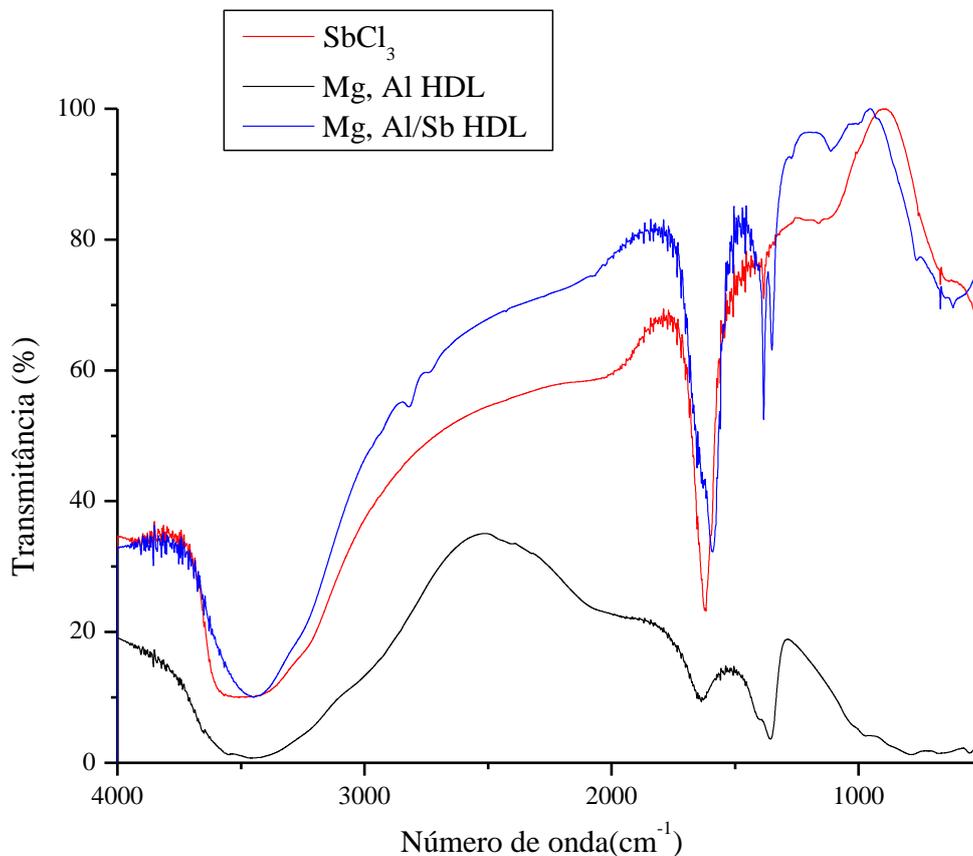
**Figura 35 - Fluorescência do nanossistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE em comparação com o complexo QUE-SbIII, com a quercetina precursora e com o sistema binário Mg, Al HDL-QUE**



Fonte: Autoria própria

O espectro de espectroscopia IV do nanocarreador Mg, Al/Sb HDL possui um elevado grau de similaridade com o Mg, Al HDL, visto que apresenta as principais bandas características deste material, como pode ser observado na Figura 36.

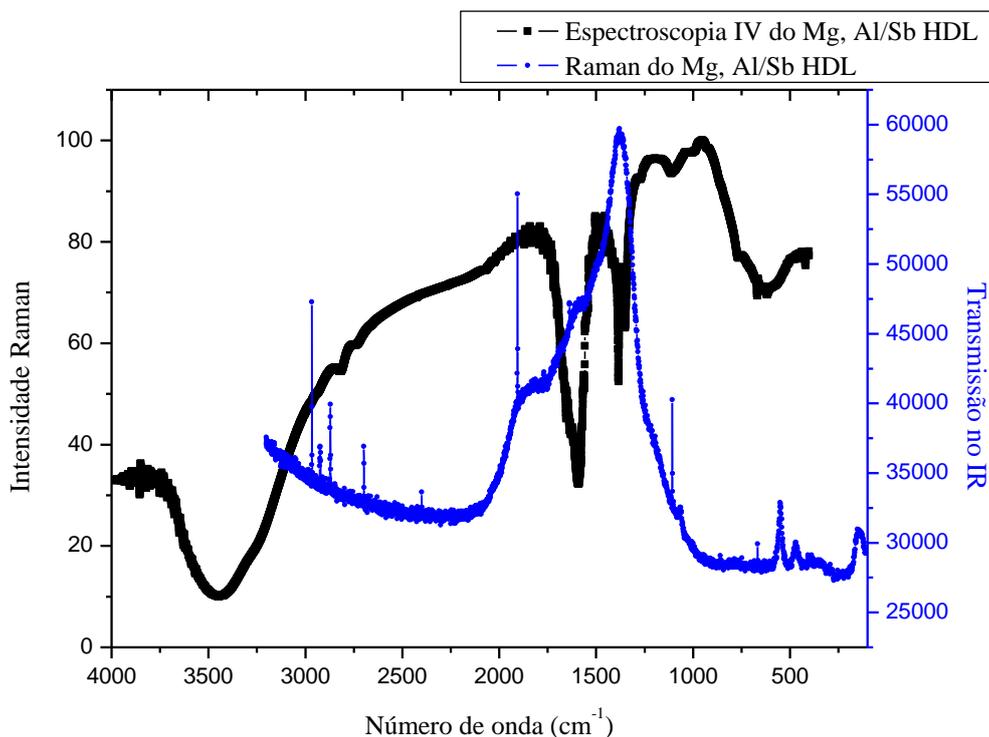
Figura 36 - Espectros de infravermelho por KBr de:  $\text{SbCl}_3$ , Mg, Al HDL e Mg, Al/Sb HDL



Fonte: Autoria própria

Sendo o Raman, considerado por muitos autores uma técnica de confirmação da espectroscopia IV, visto que os deslocamentos de energia observados no espectro Raman são idênticos às energias de suas bandas de absorção IR (quando os modos vibracionais envolvidos são ativos no IR e no Raman pelo fato de que ambas as técnicas são dependentes dos mesmos modos vibracionais) (HOLLER et. al., 2009). Na Figura 37 foi realizada uma comparação entre estas técnicas para a confirmação da síntese do nanocarreador Mg, Al/Sb HDL.

**Figura 37 - Espectros infravermelho e Raman do nanocarreador Mg, Al/Sb HDL**



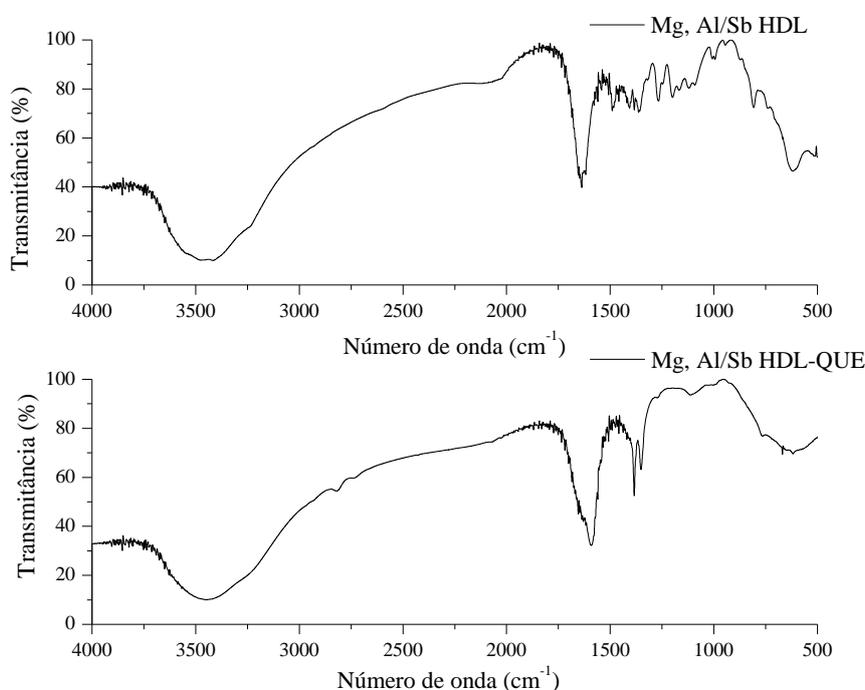
Fonte: Autoria própria

No espectro do Infravermelho, foi detectada uma banda larga em torno de 3454  $\text{cm}^{-1}$  característico de estiramento ( $\nu$ ) OH e um sinal de deformação correspondente ao grupo OH da água adsorvida ou da água interlamelar (flexão de  $\delta\text{H}_2\text{O}$ ) por volta de 1594  $\text{cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN et al., 1962; CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009); banda em 1383  $\text{cm}^{-1}$  que provavelmente ocorre devido ao ânion carbonato [ $\nu(\text{CO}_3^{2-})$ ] que pode ter se formado devido à absorção de gás  $\text{CO}_2$  atmosférico durante o processo de lavagem (ISLAM e PATEL, 2009; XU et al., 2006; SUN e HU, 2011). Na região de 770 a 424  $\text{cm}^{-1}$  são observadas bandas de vibrações referentes aos M–O ou O–M–O caracterizando as ligações entre os cátions Mg, Al e/ou Sb e oxigênio (BOTTAN, 2011; KLOPROGGE et al., 1999a).

No espectro Raman, na região de baixa frequência dois sinais em 305  $\text{cm}^{-1}$  e 382  $\text{cm}^{-1}$  e outros dois a 474  $\text{cm}^{-1}$  e 544  $\text{cm}^{-1}$ . Todos estes picos são típicos de Al-OH (ligação alumínio-hidroxila) ou Mg-OH (magnésio-hidroxila) (KLOPROGGE et al., 1999b; KLOPROGGE, 2004). Neste espectro,  $\nu\text{CO}_3^{2-}$  aparece em 1.066  $\text{cm}^{-1}$ ; e o último pico (1376  $\text{cm}^{-1}$ ), indica a presença da formação de óxidos (KLOPROGGE et al., 2001).

Quanto aos espectros de espectroscopia IV do nanossistema Mg, Al/Sb HDL-QUE, ilustrado na Figura 38, a seguir, observa-se que o espectro apresenta algumas bandas semelhantes ao tricloreto de antimônio, como o intervalo de 3742-2895  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento ( $\nu$ )OH que representa água adsorvida no sistema; outra em torno de 1640  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a ( $\nu$ )C=O, provavelmente oriunda da quercetina, assim como nos demais sistemas, com esta redução da frequência da carbonila, sugerimos que aqui também, a ligação entre Sb e quercetina tenha se dado na carbonila da posição 4 e em C-3 (FICARRA et al., 2002).

**Figura 38 - Espectros de infravermelho por KBr do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE e seu nanocarreador precursor**



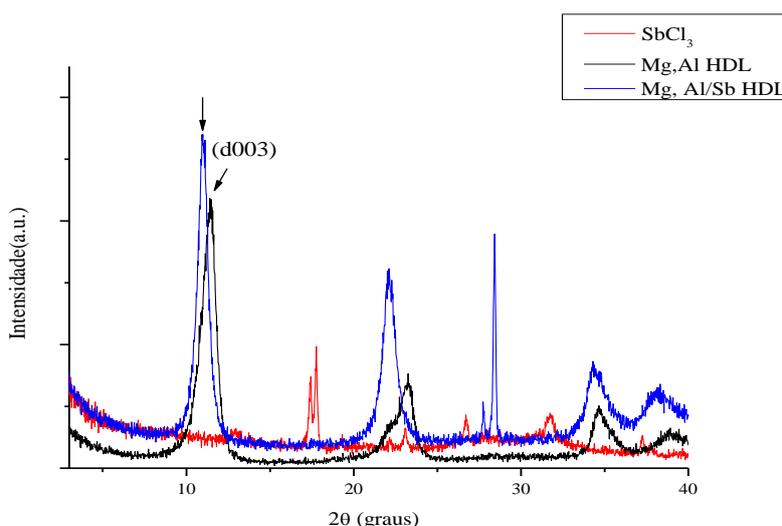
Fonte: Autoria própria

A banda em 1392  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibração angular no plano da ligação O-H do grupo fenol e em 1093 corresponde a deformação assimétrica de C-O-C; ambas não apresentaram modificações em relação a quercetina, o que significa que não houveram alterações/ligações nesta região da molécula de quercetina.

A banda em 677  $\text{cm}^{-1}$  corresponde vibrações referentes aos M-O ou O-M-O caracterizando as ligações entre os cátions e oxigênio (BOTTAN, 2011; KLOPROGGE et al., 1999a).

A Figura 39 apresenta os difratogramas dos produtos obtidos para o Mg, Al/Sb HDL e seus precursores. Este apresentou planos semelhantes ao sintetizado por Kim et al. (2008), cuja presença do Sb foi detectada na composição da lamela do HDL, assim confirmando o sucesso da síntese. É também possível observar por meio da representação das setas, reflexões que foram gradualmente deslocadas em direção ao ângulo mais elevado, mediante, de acordo com Kim et al. (2008), a substituição do SbIII.

**Figura 39 - Difratograma de: SbCl<sub>3</sub>, Mg, Al HDL e Mg, Al/Sb HDL**

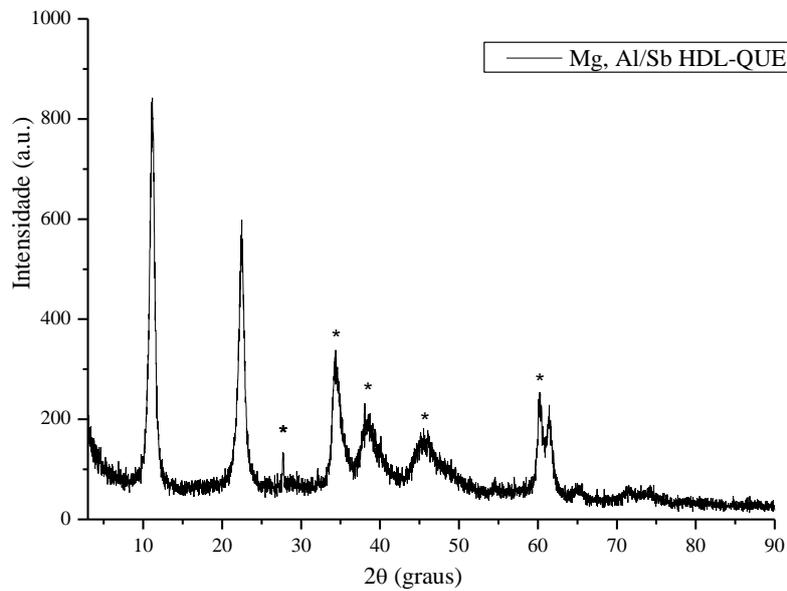


Fonte: Autoria própria

Ao comparar o espaçamento basal d(003) entre HDL precursor e o nanocarreador Mg, Al/Sb HDL, observa-se que o Mg, Al/Sb HDL apresentou um discreto aumento, de 0,33Å ( $d = 8,09 \text{ \AA}$ ), em relação ao Mg,Al HDL, assim como foi obtido por Kim et al. (2008).

O nanosistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE manteve o aspecto cristalino (Figura 40) apresentou espaçamento basal de 7,95 Å, ou seja, quando comparado ao seu nanocarreador precursor Mg, Al/Sb HDL, demonstrou uma discreta diferença (redução) na distância entre o início de uma lamela e o final de outra (0,14 Å), que pode ser devido à quercetina, que pode encontrar-se adsorvida às lamelas, assim comprimindo-as discretamente.

**Figura 40 - Difratoograma do nanosistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE**

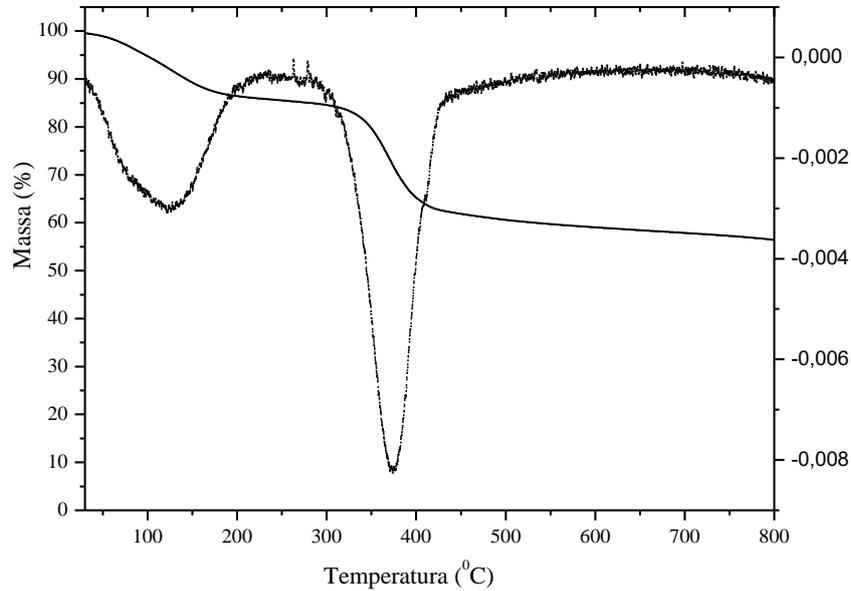


Fonte: Autoria própria

Corroborando com os resultados obtidos por Ma et al. (2004), os planos 28,23°, 34,52°, 38,6°, 45,6° e 60,2° (característicos de  $Sb_2O_3$  em destaque [\*] na Figura 40) permaneceram, com alguns deslocamentos mínimos. Estes resultados mostram que houve a associação do antimônio e da quercetina ao nanocarreador.

Na Figura 41, é demonstrado perfil termogravimétrico do Mg, Al/Sb HDL. Ele descreve o comportamento do Mg, Al/Sb HDL à medida em que é submetido a temperaturas maiores do que a temperatura ambiente, assim traçando seu perfil de degradação.

**Figura 41 - Perfil termogravimétrico do Mg, Al/Sb HDL**



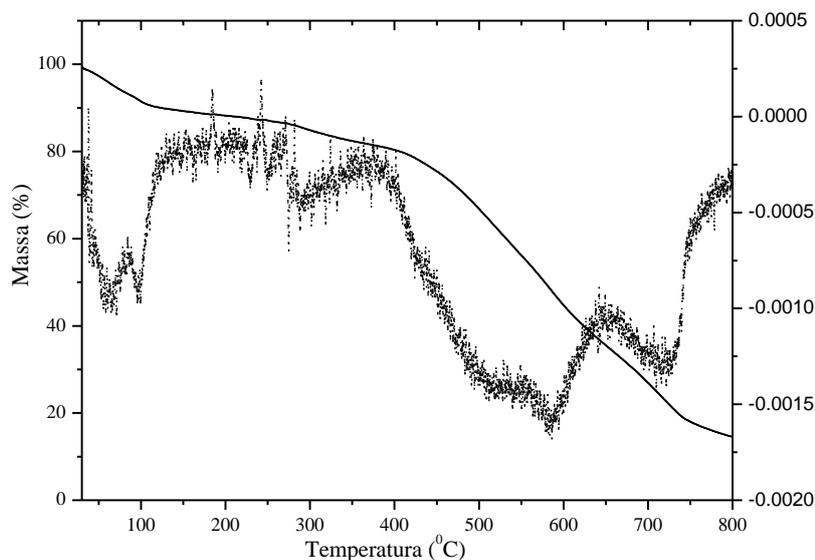
Fonte: Autoria própria

São observados dois decaimentos (ou duas curvas termogravimétricas), o que caracteriza duas perdas de massa; assim caracterizando o padrão da estrutura do Mg, Al HDL (CHOUDARY et al., 2002). O primeiro pico, com uma perda de massa de 17,32%, ocorre até 122,59° C e corresponde à água superficial adsorvida e à água interlamelar.

O segundo pico ocorreu entre 311°C e 431,9°C com uma perda de massa de 25,06% neste intervalo. Nesta última ocorre a desidroxilação estrutural e a consequente perda da estrutura lamelar (KLOPROGGE et al., 2001; CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009; SILION et al., 2010). Ao fim da análise, foram quantificados 56,64% em massa do Mg, Al/Sb HDL, assim como para o Mg, Al HDL, provavelmente essa massa é resultante de íons metálicos.

Na Figura 42 observa-se o perfil termogravimétrico do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE.

**Figura 42 - Perfil termogravimétrico do Mg, Al/Sb HDL-QUE**

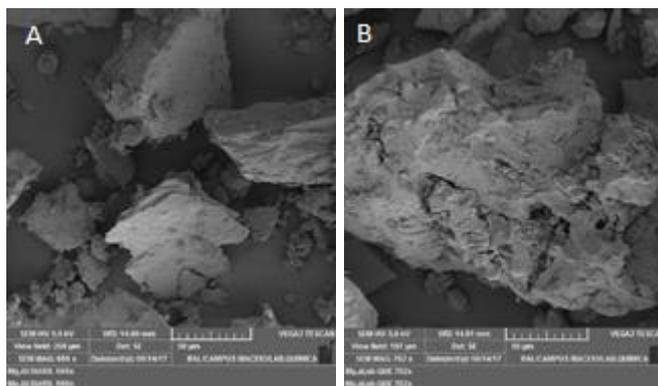


Fonte: Autoria própria

O nanossistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE apresentou duas perdas de massa. A primeira curva, que representa a primeira perda de massa, ocorreu em 106°C, com uma perda de 8,74% da massa inicial e a segunda, ocorreu no intervalo de 330,5°C a 741,29°C, com uma perda de 77,37% no intervalo. Ao fim da curva foram quantificados 14,67% em massa da amostra inicial. Provavelmente, esta quantidade se deve aos íons metálicos presentes na amostra que não foram totalmente degradados.

A seguir, na Figura 43, são apresentadas as micrografias do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE e de seu nanocarreador precursor Mg, Al/Sb HDL, que mostram a morfologia do precursor e do produto formado.

**Figura 43 - Micrografias do Mg, Al/Sb HDL precursor (A) e do sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE (B)**



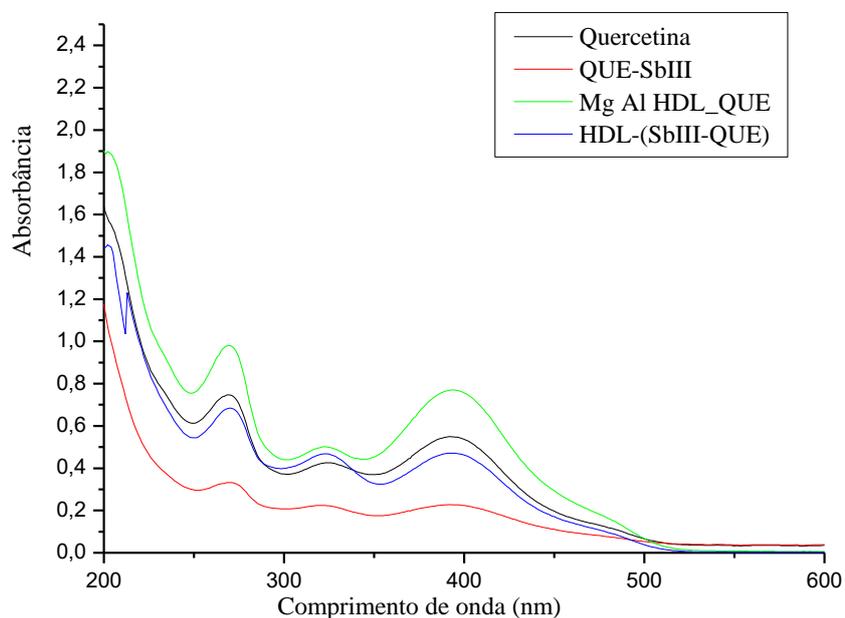
Fonte: Autoria própria

O nanocarreador apresentou morfologia de microcristais robustos, de forma irregular, com tamanho médio de 50 a 80  $\mu\text{m}$ . O sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE também apresentou cristais com estrutura robusta, porém, com aspecto mais rugoso do que o precursor e tamanho médio superior a 100  $\mu\text{m}$ , provavelmente devido à adição do composto orgânico (quercetina).

#### 5.4 SISTEMA TERNÁRIO HDL-(QUE-SbIII)

Por meio da análise UV-Vis, foi observado um deslocamento batocrômico de 368 (quercetina) para 393 nm do nanosistema HDL-(QUE-SbIII) (Figura 44), desta forma, também supomos modificações na posição C-3 na molécula da quercetina.

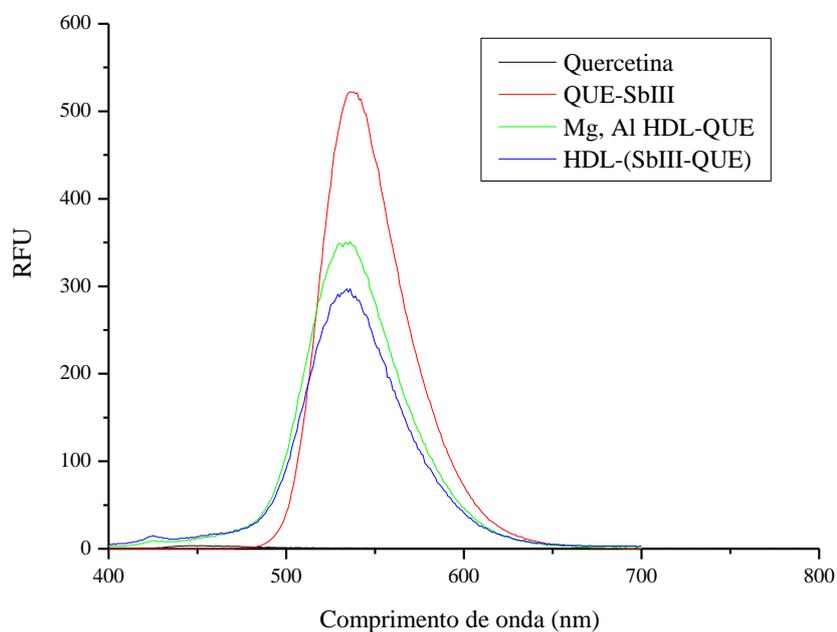
**Figura 44- Espectros UV-Vis do nanosistema ternário HDL-(QUE-SbIII), da quercetina, do complexo QUE-SbIII e do sistema binário Mg, Al HDL-QUE**



Fonte: Autoria própria

O sistema ternário, de forma semelhante como ocorreu para os sistemas binários Mg, Al/Sb HDL-QUE (532 nm) e QUE-SbIII (537 nm), HDL-(QUE-SbIII) apresentou emissão máxima em 533 nm, ratificando a interação do HDL e/ou do SbIII com a quercetina (Figura 45).

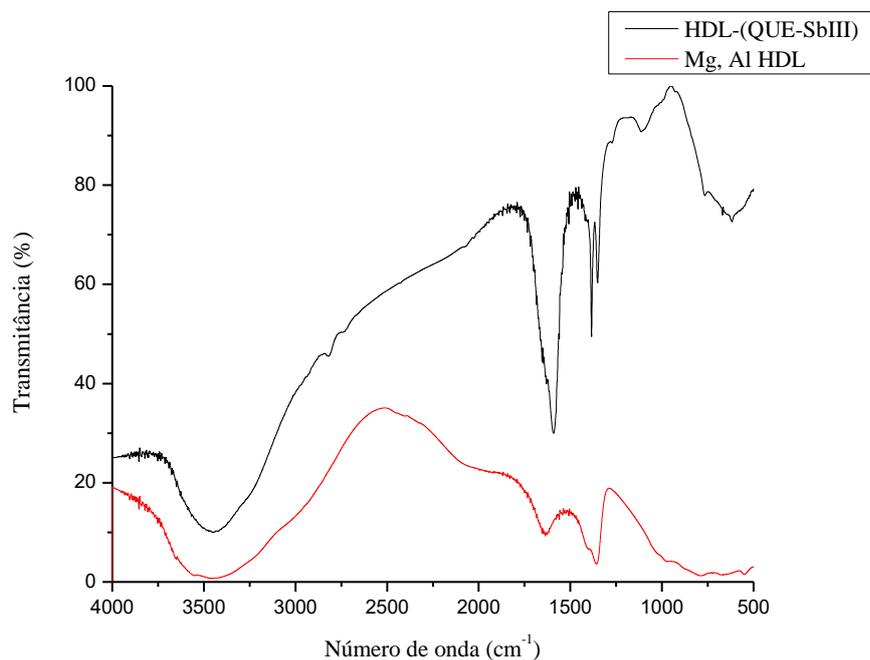
**Figura 45 - Fluorescência do nanossistema ternário HDL-(QUE-SbIII), da quercetina, do complexo QUE-SbIII e do sistema binário Mg, Al HDL-QUE**



**Fonte: Autoria própria**

O espectro infravermelho do nanossistema ternário HDL-(QUE-SbIII) (Figura 46) mostra um intervalo de  $3742 - 2895 \text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento ( $\nu$ )OH, de água adsorvida na superfície do sistema; a banda em  $1640 \text{ cm}^{-1}$  representa ( $\nu$ )C=O, provavelmente da quercetina, do mesmo modo como foi observado nos sistemas analisados anteriormente, cuja redução pode estar relacionada à complexação quercetina-antimônio (posição C-4 e em C-3).

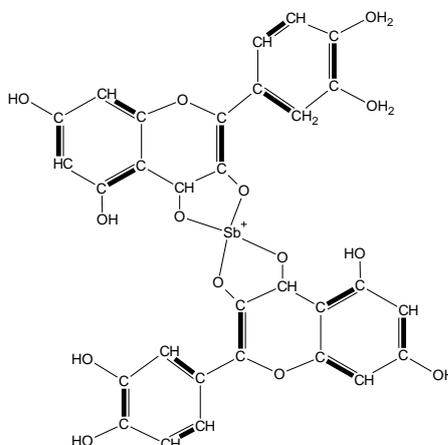
**Figura 46 - Espectros de infravermelho por KBr do nanosistema ternário HDL-(QUE-SbIII) e seu precursor Mg, Al HDL**



Fonte: Autoria própria

A banda  $1392\text{ cm}^{-1}$  é proveniente da vibração angular no plano da ligação O-H do grupamento fenol; a banda em  $1093\text{ cm}^{-1}$  é correspondente ao estiramento (C-O-C) e a banda  $677$  corresponde a ligações metálicas do tipo M-O ou O-M-O. A estrutura proposta para o sistema ternário HDL-(QUE-SbIII) pode ser observada na Figura 47, a seguir.

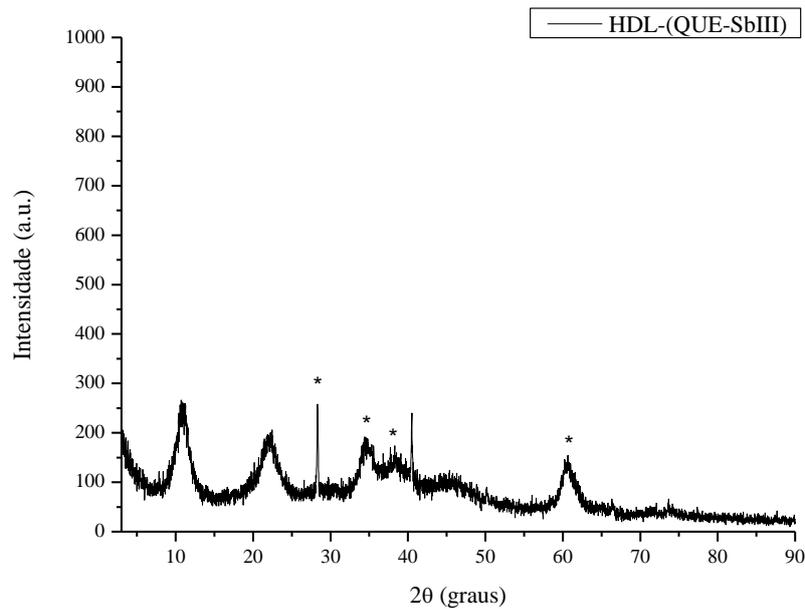
**Figura 47 – Estrutura proposta deligação entre a quercetina e o antimônio no sistema ternário HDL-(QUE-SbIII)**



Fonte: Autoria própria (ACD/ChemSketch)

A análise por difratometria (Figura 48) demonstrou que não houve um aumento relevante (de 7,76 Å para 7,8 Å) do espaçamento basal do nanosistema HDL-(QUE-SbIII) com a adição do HDL precursor ao complexo, sugerindo uma possível dificuldade na intercalação do complexo QUE-SbIII entre as lamelas do HDL. Assim como ocorreu no sistema binário Mg, Al/Sb HDL, alguns dos planos coincidentes (\*) para o  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  foram mantidos (em destaque na Figura 48).

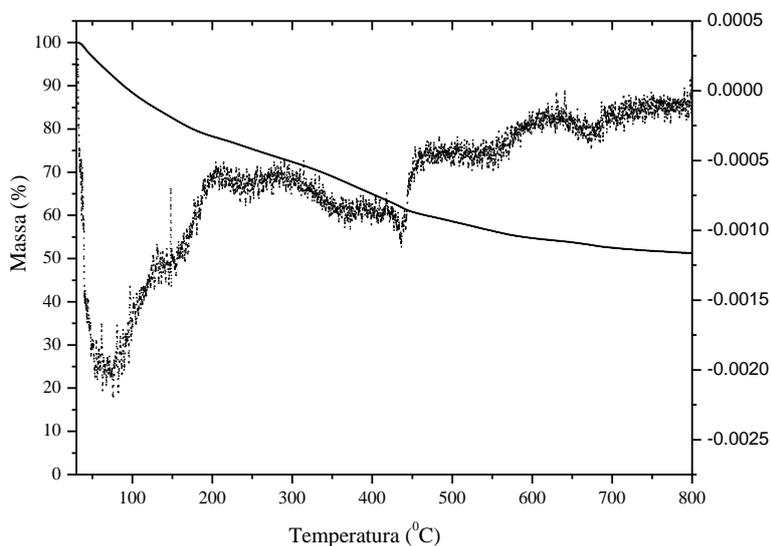
**Figura 48 - Difratograma do nanosistema HDL-(QUE-SbIII)**



Fonte: Autoria própria

O perfil termogravimétrico do nanosistema ternário pode ser visualizado na Figura 49:

**Figura 49 - Perfil termogravimétrico do HDL-(QUE-SbIII)**



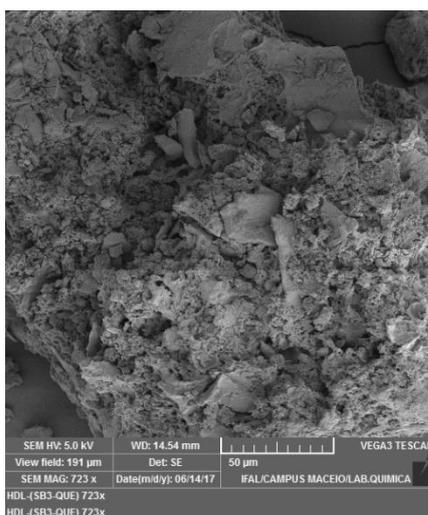
Fonte: Autoria própria

O perfil termogravimétrico do nanosistema ternário confirmou a formação de novo produto visto o perfil traçado por sua derivada.

O nanosistema ternário HDL-(QUE-SbIII) apresentou várias perdas de massa, sendo duas as principais: a primeira até 187°C, com perda de 21,27% em massa e a segunda, no intervalo de 220°C a 451,6°C com 21,65% de perda de massa. Ao fim da análise foram quantificados 51,45% em massa da amostra submetida à análise inicialmente. Provavelmente esta porcentagem esteja relacionada aos íons metálicos presentes na amostra.

A Figura 50 mostra a micrografia do sistema ternário HDL-(QUE-SbIII), que revelou uma morfologia heterogênea, com grande quantidade de aglomerados de tamanhos e formas variados.

**Figura 50 - Micrografia do sistema ternário HDL-(QUE-SbIII)**



Fonte: Autoria própria

## 5.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Inicialmente foi investigada a citotoxicidade das substâncias sobre macrófagos da linhagem J774.A1 (Tabela 3). Os resultados revelaram que as substâncias Mg, Al HDL e HDL-(QUE-SbIII) não apresentaram toxicidade até a concentração máxima testada (300 µg/mL). Sugerimos que para o sistema ternário, tenha havido forte interação entre o HDL e o complexo QUE-SbIII e que o complexo QUE-SbIII tenha sido protegido pelo Mg, Al HDL, justificando a ausência de toxicidade para macrófagos.

Ademais, os compostos  $SbCl_3$ , quercetina, Mg, Al/Sb HDL, QUE-SbIII (o complexo QUE-SbIII ROTA foi o precursor escolhido, assim como para a síntese do sistema ternário, por ter apresentado maior estabilidade térmica, por ser obtido por uma técnica mais simples e de baixo custo), Mg, Al HDL-QUE e Mg, Al/Sb HDL-QUE, apresentaram  $CI_{50}$  de  $5,3 \pm 0,02$ ;  $41 \pm 3,1$ ;  $25,7 \pm 1,6$ ;  $11,3 \pm 1,4$ ;  $33 \pm 6,1$ ;  $210 \pm 3,8$  µg/mL, respectivamente.

Com isto, observamos que houve redução da toxicidade quando associamos SbIII e quercetina e aumento da toxicidade da quercetina quando a associamos ao Mg, Al HDL. Também ocorreu redução da toxicidade quando adicionamos quercetina ao Mg, Al HDL (sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE). Isto pode reforçar a presença do Sb entre as lamelas do HDL, como previsto pelo DRX realizado logo após a síntese do carreador; por fluorescência e pelo MEV, devido à grande semelhança ao Mg, Al HDL. Com isto,

podemos supor que houve forte interação entre o Sb, a quercetina e o HDL, assim resultando em uma proteção dos compostos ativos pelo nanocarreador e portanto, resultando em baixa toxicidade aos macrófagos J774.A1.

#### 5.6 ATIVIDADE LEISHMANICIDA – ENSAIOS *IN VITRO*

Com a finalidade de verificar uma possível atividade leishmanicida direta sobre o parasito, calculou-se a concentração inibitória de 50% ( $CI_{50}$ ) do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, que são as formas parasitárias responsáveis, respectivamente, pela forma cutânea e visceral da doença Brasil (SVS/MS, 2015). Os resultados evidenciaram que todas as substâncias se mostraram ativas contra o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*, com exceção dos nanocarreadores Mg, Al HDL e Mg, Al/Sb HDL. Com destaque para o sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE e o ternário HDL-(QUE-SbIII) que apresentaram com  $CI_{50}$  de  $5,3 \pm 0,4$  e  $9,7 \pm 3,5$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

A avaliação da atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. chagasi*, evidenciou que a substância Mg, Al/Sb HDL-QUE, dentre os sistemas produzidos, mostrou-se mais ativa, com  $CI_{50}$  de  $70,2 \pm 11,3$   $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, o fármaco padrão  $\text{SbCl}_3$  apresentou  $CI_{50}$  de  $4,7 \pm 0,4$  para promastigotas de *L. amazonensis* e  $0,45 \pm 0,08$   $\mu\text{g/mL}$  para promastigotas de *L. chagasi*.

**Tabela 3 – Determinação da citotoxicidade dos produtos em macrófagos da linhagem J774.A1 e em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (48 horas)**

| Substâncias testadas | Viabilidade celular em macrófagos J774.A1 (ensaio MTT) | Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> |  | Promastigotas de <i>L. chagasi</i>    |  |
|----------------------|--|--|--|---------------------------------------|--|
|                      | CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>                  | CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>  | Macrófagos x <i>L. amazonensis</i><br><sup>b</sup> IS para <i>L. amazonensis</i> | CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup> | Macrófagos x <i>L. chagasi</i><br><sup>b</sup> IS para <i>L. chagasi</i> |
| SbCl <sub>3</sub>    | 5,3 ± 0,02   | 4,7 ± 0,4                              | 1,1  | 0,45 ± 0,08                           | 11,8   |
| Mg, Al HDL           | > 300  | > 300                                  | -  | 272 ± 17                              | >1,1   |
| QUE                  | 41 ± 3,1   | 55,2 ± 2,7                             | 0,7  | 53,3 ± 6,1                            | 0,8  |
| Mg, Al/Sb HDL        | 25,7 ± 1,6   | > 300                                  | <0,9   | 138,2 ± 1,9                           | 0,2  |
| QUE-SbIII            | 11,3 ± 1,4   | 274,5 ± 4,5                            | 0,04   | 81 ± 11                               | 0,1  |
| Mg, Al HDL-QUE       | 33 ± 6,1   | 149,3 ± 10,7                           | 0,2  | 79,8 ± 2,9                            | 0,4  |
| Mg, Al/Sb HDL-QUE    | 210 ± 3,8  | 5,3 ± 0,4                              | 39,6   | 70,2 ± 11,3                           | 3,0  |
| HDL-(QUE-SbIII)      | > 300  | 9,7 ± 3,5                              | >30,9  | 107,0 ± 20,0                          | >2,8   |

<sup>a</sup> Concentração Inibitória (IC<sub>50</sub>) calculada por curvas de toxicidade dose-resposta. <sup>b</sup> Índice de Seletividade (IS) calculado pela razão dos valores de IC<sub>50</sub> de macrófagos e promastigotas. (-): Substância não apresentou efeitos deletérios sobre o macrófago ou sobre a espécie de *Leishmania*.

Com base na viabilidade celular para macrófagos J774.A1 e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, foi possível calcular o índice de seletividade (IS) das substâncias. Assim, ao comparar o IS entre macrófagos e promastigotas de *L. amazonensis*, o sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE apresentou seletividade de 39,6 vezes mais para promastigotas de *L. amazonensis*. A substância HDL-(QUE-SbIII) provavelmente é mais seletiva para promastigotas de *L. amazonensis*, no entanto devido não ter apresentado toxicidade para a célula hospedeira não foi possível calcular o IS. Quando comparado o IS entre macrófagos e promastigotas de *L. chagasi*, o fármaco padrão  $SbCl_3$  apresentou-se mais seletivo cerca de 11,8 vezes mais para promastigotas de *L. chagasi*. As substâncias HDL-(QUE-SbIII) e Mg, Al HDL provavelmente são mais seletivas para o parasito, no entanto como não foi possível calcular a  $CI_{50}$  para a célula hospedeira, não foi possível calcular o IS para *L. chagasi*.

## CONCLUSÃO

O objetivo geral, que consistia no preparo de sistemas nanoestruturados antimônio e/ou quercetina – Hidróxidos Duplos Lamelares na forma de pó e investigação de sua potencial aplicação na quimioterapia da leishmaniose; foi satisfeito. Assim como os objetivos específicos do trabalho.

Foi verificado que:

- Carreadores e produtos sintetizados com sucesso;
- O complexo QUE-SbIII ROTA foi o precursor escolhido para síntese do sistema ternário (maior estabilidade térmica, técnica mais simples, menor custo);
- QUE-SbIII e Mg, Al HDL-QUE sofreram complexação nas regiões da carbonila e orto-fenólica, verificado pela técnica de UV-Vis e confirmado por Infravermelho;
- Mg, Al/Sb HDL-QUE e HDL-(QUE-SbIII) sofreram complexação apenas na região da carbonila;
- Por DRX, foi possível visualizar a adsorção da quercetina no sistema binário Mg, Al/Sb HDL-QUE e uma dificuldade na intercalação no sistema ternário HDL-(QUE-SbIII);
- Mg, Al/Sb HDL-QUE e HDL-(QUE-SbIII) mostraram-se pouco tóxicos para macrófagos e apresentaram relevante atividade leishmanicida (sendo que apresentaram maior atividade para promastigotas de *L. amazonensis* em relação a *L. chagasi*);
- Por fim, a Microscopia Eletrônica de Varredura permitiu a visualização morfológica das estruturas dos compostos formados;
- Este estudo favorece ao futuro desenvolvimento de uma forma farmacêutica de baixo custo, com possibilidade de transposição para escala industrial, e, assim, contribuir para o processo de adesão terapêutica do público alvo da doença e, por consequência, reduzir os índices de resistência ao parasito.

### CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

| Atividades  | 2014 <sup>1</sup> |   | 2015 <sup>2</sup> |   | 2016 |   | 2017 <sup>3</sup> |   | 2018 |   |
|---|-------------------|---|-------------------|---|------|---|-------------------|---|------|---|
|   |                   |   |                   |   |      |   |                   |   |      |   |
| Levantamento bibliográfico  | X                 | X | X                 | X | X    | X | X                 | X | X    | X |
| Síntese e caracterização do HDL precursor                                       | X                 |   |                   |   |      |   |                   |   |      |   |
| Preparação e caracterização do sistema binário antimomial-HDL                   | X                 |   |                   |   |      |   |                   |   |      |   |
| Preparação e caracterização do sistema binário quercetina-HDL                   |                   | X | X                 | X | X    |   |                   |   |      |   |
| Preparação e caracterização do complexo (sistema binário) antimomial-quercetina |                   | X | X                 | X | X    |   |                   |   |      |   |
| Preparação e caracterização dos sistemas ternários                              |                   |   |                   |   |      | X | X                 | X |      |   |
| Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i>                            |                   |   |                   |   |      |   |                   |   | X    | X |
| Análise dos resultados  | X                 | X | X                 | X | X    | X | X                 | X | X    | X |
| Créditos  | X                 | X | X                 | X | X    | X | X                 | X | X    | X |

<sup>1</sup>Entrada no Programa de Pós-Graduação PPGCS/UFAL – março/2014

<sup>2</sup>Licença maternidade – novembro/2015 a fevereiro/2016

<sup>3</sup>Licença maternidade – outubro/2017 a janeiro/2018

## PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

### ARTIGOS

1. MENEZES, J.B.; SILVA, T.A.; SANTOS, J.B.; RAMONES, E.L.C.; MENEGHETTI, M.R.; MATTA, C.B.B.; MOREIRA, M.S.A.; MAGALHÃES, N.S.S.; GRILLO, L.A.M.; DORNELAS, C.B. Layered Double Hydroxides (LDHs) as carrier of antimony aimed for improving leishmaniasis chemotherapy. **Applied Clay Science**. v.127, p.91–92, 2014.
2. MENEZES, J. B.; SILVA, T.A.; GRILLO, L. A.M.; DORNELAS, C. B. Therapeutic Arsenal against Leishmaniasis: A Review. **International Journal of Tropical Disease & Health**, v. 5, n.2, p.101-122, 2015.
3. Valcilaine Teixeira Barbosa, Janaína Barros de Menezes, Josué Carinhanha Calda dos Santos, Maria Lysete de Assis Bastos, João Xavier de Araújo-Júnior, Ticiano Gomes do Nascimento, Irinaldo Diniz Basílio-Júnior, Luciano Aparecido Meireles Grillo, Camila Braga Dornelas. Characterization and stability of the antimony-querctin complex. **Advanced pharmaceutical bulletin**. (SUBMETIDO EM AGO/2018).

### APRESENTAÇÕES DE TRABALHOS EM CONGRESSOS

MENEZES, J. B.; MOREIRA, M. S. A. ; MENEGHETTI, M. R. ; GRILLO, L. A. M. ; Dornelas, C. B. . Hidróxidos duplos lamelares (HDLs) na quimioterapia da leishmaniose: Preparação e caracterização de nanossistemas HDL-Sb. Caiite 2014 - Congresso Acadêmico Integrado de Inovação e Tecnologia, 2014, 2014, Maceió. Livro de resumos, 2014.

MENEZES, JANAÍNA; PIMENTEL, A. L. ; SILVA, T. A. ; VIEIRA, D. A. ; SANTOS, J. B. ; MENEGHETTI, M. R. ; BASILIO JUNIOR, I. D. ; FONSECA, E. J. S. ; GRILLO, L. A. M. ; DORNELAS, C. B. . Coated LDH-Sb aiming for an oral therapy in leishmaniasis: a morphological characterization. XIII Brazilian MRS Meeting, 2014, João Pessoa. Livro de resumos, 2014.

SILVA, T. A.; MENEZES, J. B.; RIBEIRO, A. R. B.; FONSECA, E. J. S.; BASILIO JUNIOR, I. D.; MENEGHETTI, M. R.; MOREIRA, M. S. A.; MAGALHAES, N. S. S.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. LDH-Sb Nanosystems aiming for an Oral Therapy in Leishmaniasis. II Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences, 2014, 2014, Búzios. Livro de resumos, 2014.

MENEZES, J. B.; BARBOSA, V. T. ; Grillo, L. A. M. ; BASILIO JUNIOR, I. D. ; SILVA, D. H. C. ; SILVA, M. C. D. ; DE LIMA NETO, C. F. ; Dornelas, C. B. . Avaliação de métodos de secagem para obtenção de complexos quercetina-antimônio (III) na forma de pó. V Congresso Norte Nordeste De Ciências Farmacêuticas, 2015, Maceió. V Congresso Norte Nordeste De Ciências Farmacêuticas, 2015.

MENEZES, J. B.; CARVALHO, H. J.; RIBEIRO, A. R. B.; FONSECA, E. J. S.; BASILIO JUNIOR, I. D.; YATSUZUKA, R.; Grillo, L. A. M.; Dornelas, C. B.

Investigação de nanosistema HDL-SbIII visando à terapia oral da leishmaniose: liberação in vitro e revestimento. in: v congresso norte nordeste de ciências farmacêuticas, 2015, Maceió. V Congresso Norte Nordeste De Ciências Farmacêuticas, 2015.

MENEZES, J. B.; Grillo, L. A. M.; Dornelas, C. B.; BARBOSA, V. T. Investigation of Layered Double Hydroxides as nanocarriers of SbIII and quercetin targeting the alternative in the leishmaniasis chemotherapy. In: XVI Brazilian MRS Meeting, 2017, Gramado. XVI Brazilian MRS Meeting, 2017.

BARBOSA, V. T. ; SOUZA, J. K. C. ; MENEGHETTI, M. R. ; DE LIMA NETO, C. F.; Grillo, L. A. M. ; DORNELAS, C. B. ; MENEZES, J. B. . Green synthesis of silver nanoparticles using red propolis of Alagoas. In: XVI Brazilian MRS Meeting, 2017, Gramado. XVI Brazilian MRS Meeting, 2017.

#### PALESTRAS

- Rotinas Básicas de Farmácia – Circuito de Palestras para alunos do Curso de Atendente de Farmácia do CEBRAC – 2017;
- A profissão farmacêutica – Escola Estadual Profª Benedita de Castro Lima – 2017.

#### PROFESSORA VOLUNTÁRIA

- Disciplina: Química Analítica – junho/2016 a junho/2018
  - Universidade Federal de Alagoas – UFAL;
  - Escola de Enfermagem e Farmácia – ESENFAR;
  - Carga horária: 80 horas;
  - Processo nº 23065.010421/2017-46 – contrato de adesão;
  - Processo nº 23065.033664/2017-52 – prorrogação.

## REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, O.L.; SULEMAN, D.; SAMSON, A.A. Natural products in antileishmanial drug discovery: a review. **Journal of Asian Scientific Research**, v.3, p.157-173, 2013.
- ALEXANDRE, Grazielle Prado. **Validação de métodos para análise de citrato de colina e acetilmetionina em soluções injetáveis por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- ALLMANN, R.; JEPSEN, H. P. **Die struktur des hydrotalkits**. Neues Jahrbuch fur Mineralogie, Monatshefte. p.544–551, 1969.
- ALVAR, J., CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.61, n.1, p.223–274, 2006.
- ALVING, C. R.; STECK, E. A.; CHAPMAN JR., W. L.; WAITS, V. B.; HENDRICKS, L. D.; SWARTZ JR, G. M.; HANSON, W. L. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 75, n. 6, p.2959–2963, 1978.
- ANDRADE, C. R.; KIDO, E. A.; LUNA, L. K. S.; MELO, M. A.; ANDRADE, P. P.; BALBINO, V. Q. **Leishmanioses: manual on-line**. Pernambuco. 2006. Disponível em: <[https://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila\\_on\\_line/nas\\_americas.htm](https://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/nas_americas.htm)>. Acesso em: 24 out. 2016.
- ANUSAVICE, K., J.; SHEN, C.; RAWLS, H. R. Phillips Materiais Dentários. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2013. 592p.
- ARSHAD, N.; JANJUA, N. K.; AHMED, S.; KHAN, A. Y.; SKIBSTED, L. H. Electrochemical investigations of antioxidant interactions with radical anion and dianion of 1,3-dinitrobenzene. **Electrochim. Acta** **54**, 6184–6189, 2009.
- BAKKIALAKSHMI, S. BARANI, V. F. F. Study on the interaction of quercetin and amantadine with egg albumin. **IJPCBS**, v. 3, n. 3, p. 559-564, 2013. ISSN: 2249-9504.
- BALANA-FOUCE R., REGUERA R. M., CUBRIA J. C., ORDONEZ D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**. v.30, p.435-43, 1998.
- BALSAMO, N; MENDIETA, S; OLIVAB, M.; EIMER, G.; CRIVELLO, M. Synthesis and characterization of metal mixed oxides from Layered Double Hydroxides. **Procedia Materials Science**. v.1, p.506 – 513, 2012.
- BANGS, J. D.; RANSOM, D. A.; NIMICK, M.; CHRISTIE, G.; HOOPER, N. M. Cytocidal effects on Trypanosoma brucei and inhibition of Leishmania major GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.114, p.111-117, 2011.
- BEHLING, E.B. et al. Flavonoide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v.15,n. 3, p. 285-292, 2004.

BENÍCIO, L.P.F.; SILVA, R.A.; LOPES, J.A.; EULÁLIO, D.; SANTOS, R.M.M.; AQUINO, L.A.; VERGÜTZ, L.; NOVAIS, R.F.; COSTA, L.M.; PINTO, F.G.; TRONTO, J. Layered Double Hydroxides: nanomaterials for applications in agriculture. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p.1-13, 2015.

BERGAYA, F.; LAGALY, G. Surface modification of clay minerals. **Applied Clay Science**, v.19, p. 1-3, 2001.

BERLIER, G. et al. Stabilization of quercetin flavonoid in MCM-41 mesoporous silica: positive effect of surface functionalization. **J Colloid Interface Sci**, v. 393, p. 109-18, 2013. ISSN 0021-9797.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.3, p. 861-876, 2017.

BORGHETTI, G. S. et al. Physicochemical properties and thermal stability of quercetin hydrates in the solid state. **Thermochimica Acta**, v. 539, n. 0, p. 109-114, 2012.

BOTTAN, R.; NOGUEIRA, T. R.; WYPYCH, F.; LONA, L. M. F. Síntese e Caracterização de Nanocompósitos Esfoliados de Poliestireno – Hidróxido Duplo Lamelar Via Polimerização *In Situ*. **Polímeros**, São Carlos (Impresso), v. 1, p.1-10, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2011. 106 p. – ISBN 978-85-334-1771-7. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=1461&Itemid=965](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=1461&Itemid=965)> Acesso em: 30 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral\\_1edicao.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV**. 1. ed. Brasília: Editora MS, 2015. 109p. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_recomendacoes\\_diagnostico\\_leishmania\\_hiv.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2018.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1 ed. Brasília: Editora MS, 2017. v.3, 751p. Disponível em: <[http://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp//volume\\_3\\_guia\\_de\\_vigilancia\\_em\\_saude\\_2017.pdf](http://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp//volume_3_guia_de_vigilancia_em_saude_2017.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2018.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; MAHROOF-TAHIR, M.; BHANGER, M. I. Synthesis, characterization and antioxidant activity copper–quercetin complex. **Spectrochimica**

**Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 5, 2009, p. 1901-1906, 2009.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease-review. **Fitoterapia**, v.72, p.599-618, 2001

CAVANI, F.; TRIFIRÒ, F.; VACCARI, A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. **Catalysis Today**, v.11, p.173-301, 1991.

CHAN-BACAB, M.J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. Natural Product Reports, v.18, p.674-688, 2001.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; RIBEIRO, T.G.; CASTILHO, R.O.; ODÉLIA, S.; FERNANDES, A.; CARDOSO, V.N. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 48, n. 3, p.235-242, 2015.

CHIEN, S.Y.; WU, Y.C.; CHUNG, J.G.; YANG, J.S.; LU, H.F.; TSOU, M.F.; WOOD, W.G.; KUO, S.J.; CHEN, D.R. Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Human & experimental toxicology**, v.28, n.8, p.493-503, 2009.

CHOUDARY, B. M.; BHARATHI, B.; REDDY, C. V.; KANTAM, M. L. The first example of heterogeneous oxidation of secondary amines by tungstate-exchanged Mg-Al layered double hydroxides: a green protocol. **Green Chemistry**, v.4, p.279–284, 2002.

CORRÊA, R. **Pesquisa visa diagnóstico precoce da leishmaniose**. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas. 2012. Disponível em: <<http://www.fapeam.am.gov.br/noticia.php?not=6055>>. Acesso 24 out. 2016.

COSTA, E.M.; FILHO, J.M.B.; NASCIMENTO, T. G.; MACÊDO, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**, v.392–393, p..79–84, 2002.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Química Nova**. v.21, p.300-311, 1998.

CROFT, S.I.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n.4 ,2002, p.319-342.

CUNHA, V.R.R.; FERREIRA, A.M.C.; CONSTANTINO, V.R.L.; TRONTO, J.; VALIM, J.B. Layered double hydroxides: inorganic nanoparticles for storage and release of species of biological and therapeutic interest. **Química Nova**, v.33, p.159-171, 2010.

DA SILVA E.R., MAQUIAVELI CDO C., MAGALHÃES, P.P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target Leishmania (*Leishmania amazonensis*) arginase. **Experimental Parasitology**, v.130, p.183-188, 2012.

DEMICHELI, C.; OCHOA, R.; SILVA, J.B.B.; DE MELO, A.L.; FALCÃO, C.A.M.; ROSSI-BERGMANN, B.; SINISTERRA, R.D.; FRÉZARD, F. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.100-103, 2004.

Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi). **Por que negligenciadas?** Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas.html>>. Acesso em: 27 jul. 2018.

DUOMO, Z et al. Polymorph control of antimony white (Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) prepared by hydrometallurgy method. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v.7, n.4, p.118-122, 1997.

DUTTA, A.; SARKAR, D.; GURIB-FAKIM, A.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. In vitro and in vivo activity of Aloe Vera leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1235-1242, 2008.

FEITKNECHT, W. Zur Kenntnis der Doppelhydroxyde und basischen Doppelsalze III. Über Magnesium-Aluminiumdoppelhydroxyd, **Helvetica Chimica Acta**, v. 25, p.131, 1942.

FERREIRA, C.S.; MARTINS, P.S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FRÉZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinylglycine, cysteine and glutathione. **BioMetals**, v.16, p.441-443, 2003.

FICARRA, R. et al. Study of flavonoids/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 1005-1014, 2002.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p.167-194, 2006.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J.D.; CANTOCAVALHEIRO, M.M.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **Plos One**, v.6, n.2, e14666, p.1-7, 2011.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química nova**, v.28, n.3, p.511-518, 2005.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BAHIA, A. P. O.; MOYEC, L. L.; DE MELO, A.L. ; PIMENTA, A. M. C.; SALERNO, M.; DA SILVA, J. B. B.; DEMICHELI, C. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.347, n.1-2, p.102-108, 2008.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, v.14, p.2317-2336, 2009.

GANG, W.; JIE, W.J.; PING, Z.L.; MING, S.; YING, L.J.; LEI, W.; FANG, Y. Liposomal quercetin: evaluating drug delivery in vitro and biodistribution in vivo. **Expert opinion on drug delivery**. v.9, n6, p.599-613, 2012.

GOMES, D. C.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.137, n.4, p.613–618, 2010.

GOODWIN, L.G.; PAGE, J.E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **The Biochemical Journal**, v. 37, p.198-209, 1943.

GHOSH, N.; CHAKRABORTY, T.; MALLICK, S.; MANA, S.; SINGHA, D.; GHOSH, B.; ROY, S. Synthesis, characterization and study of antioxidant activity of quercetin–magnesium complex. **Spectrochimica Acta. Part A**, v.151, p.807–813, 2015.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S, R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056p. ISBN 978-85-7780-460-3.

HONGO, T.; WAKASA, H.; YAMAZAKI, A. Synthesis and adsorption properties of nanosized Mg–Al layered double hydroxides with Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> as interlayer anion. **Materials Science-Poland**. v.29, p.86-91, 2011.

IFA. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. Database on hazardous substance. Disponível em: <<http://www.dguv.de/ifa/gestis-stoffdatenbank/index-2.jsp>>. Acesso em 11, dez. 2016.

ISLAM, M.; PATEL, R. Nitrate sorption by thermally activated Mg/Al chloride hydrotalcite-like compound. **Journal of Hazardous Materials**. v.169, p.524–531, 2009.

JURASEKOVA, Z. et al. Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigation of the quercetin interaction with metals: Evidence of structural changing processes in aqueous solution and on metal nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**, v. 918, n. 1–3, p. 129-137, 2009.

KAKRAN, M.; SAHOO, N. G.; LI, L.; JUDEH, Z. Fabrication of quercetin nanoparticles by anti-solvent precipitation method for enhanced dissolution. **Powder Technology**, v.223, p.59–64, 2012.

KAMEDA, T.; SAITO, M.; UMETSU, Y. Preparation and Characterisation of Mg–Al Layered Double Hydroxides Intercalated with 2-Naphthalene Sulphonate and 2,6-Naphthalene Disulphonate. **Materials Transactions**. v. 47, p.923-930, 2006.

KAZAKOVA, O. A.; GUN'KO, V. M.; LIPKOVSKAYA, N. A.; VORONIN, E. F.; POGORELYI, V. K. Interaction of Quercetin with Highly Dispersed Silica in Aqueous Suspensions. **Colloid Journal**, v.64, n.4, p.412–418, 2002.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy Research**, v.15, p.148-152, 2001.

KHALIL, N.M.; DE MATTOS, A.C.; MORAES, M.C.; CRISTINA, T.; LUDWIG, D.B.; MAINARDES, R.M. Nanotechnological Strategies for the Treatment of Neglected Diseases. **Current Pharmaceutical Design**. v. 19, n.41, p.7316-7329. 2013.

KHAN, A. I.; RAVAGAN, A.; FONG, B.; MARKLAND, C.; O'BRIEN, M.; DUNBAR, T. G.; WILLIAMS, G. R.; O'HARE, D. Recent Developments in the Use of Layered

Double Hydroxides as Host Materials for the Storage and Triggered Release of Functional Anions. **Industrial & Engineering Chemistry Research** v.48, p.10196–10205, 2009.

KIM, J.A.; HWANG, S.J.; CHOY, J. H. New antimony substituted Mg-Al Layered Double Hydroxides. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**.v.8, p.5172-5175, 2008.

KLOPROGGE, J. T.; FROST, R. L. Infrared emission spectroscopic study of the thermal transformation of Mg-, Ni- and Co-hydrotalcite catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v.184, p.61-71, 1999a.

KLOPROGGE, J. T.; FROST, R. L. Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Study of the Local Structure of Mg-, Ni-, and Co-Hydrotalcites. **Journal of Solid State Chemistry**, v.146, p.506-515, 1999b.

KLOPROGGE, J. T.; KRISTÓFB, J.; FROST, R. L. Thermogravimetric analysis-mass spectrometry (TGA-MS) of hydrotalcites containing  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  or  $\text{ClO}_4^-$ . **12th, International clay conference - a clay odyssey**, p. 451-458, 2001.

KLOPROGGE, J.T., HICKEY, L., FROST, R.L. FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydrotalcites. **Journal Raman Spectroscopic**, 35, 967–974, 2004.

Leishmaniosis. **Canine Vector-Borne Diseases**. Disponível em: <<http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis/pathogens/>>. Acesso em 24 out. 2016.

LEWIN, G.; COJEAN, S.; GUPTA, S.; VERMA, A.; PURI, S.K.; LOISEAU, P.M. In vitro antileishmanial properties of new flavonoids against *Leishmania donovani*. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v.1, p.168-171, 2011.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.2, p.111-124, 2007.

LIN, Y.; ADEBAJO, M. O.; KLOPROGGE, J. T.; MARTENS, W. N.; FROST, R. L. X-ray diffraction and Raman spectroscopic studies of Zn-substituted carbohydrite-like compounds. **Materials Chemistry and Physics**. v.100, p.174–186, 2006.

LIU, P. et al. Fluorescence enhancement of quercetin complexes by silver nanoparticles and its analytical application. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, n. 0, p. 238-245, 2014.

LOGOTHETIDIS, S. (2012). Principles and Applications in nanostructured materials and their applications. **Nanotechnology**.

MA, X.; ZHANG, Z.; LI, X.; DU, Y.; XU, F.; QIAN, Y. Micro-sized  $\text{Sb}_2\text{O}_3$  octahedra fabricated via a PEG-1000 polymer-assisted hydrothermal route. **Journal of Solid State Chemistry**, v.177, n.10, p.3824-3829, 2004.

MANJOLIN L. C., REIS M. B., MAQUIAVELI, C. C., SANTOS-FILHO O. A., SILVA, ER. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Food Chemistry**, v.141, n.3, p.2253-2262, 2013.

MARQUES, F. Estudo *in vitro* revela composto com alta atividade e seletividade contra o *T. cruzi*. **Agência Fiocruz de notícias**. 08 jul. 2009. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/estudo-in-vitro-revela-composto-com-alta-atividade-e-seletividade-contra-o-t-cruzi>>. Acesso em: 08 ago. 2018.

MARTINS, P. S. **Mecanismos envolvidos no aumento da concentração plasmática de Sb a partir das composições de antimoniato de meglumina com ciclodextrina, visando o tratamento oral das leishmanioses**. 2007. 144p. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia. Instituto De Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2007.

MENEZES, J.B.; SILVA, T.A.; SANTOS, J.B.; RAMONES, E.L.C.; MENEGHETTI, M.R.; MATTA, C.B.B.; MOREIRA, M.S.A.; MAGALHÃES, N.S.S.; GRILLO, L.A.M.; DORNELAS, C.B. Layered Double Hydroxides (LDHs) as carrier of antimony aimed for improving leishmaniasis chemotherapy. **Applied Clay Science**. v.127, p.91–92, 2014.

MENEZES, J. B.; SILVA, T.A.; GRILLO, L. A.M.; DORNELAS, C. B. Therapeutic Arsenal against Leishmaniasis: A Review. **International Journal of Tropical Disease & Health**, v. 5, n.2, p.101-122, 2015.

MEYN, M.; BENEKE, K.; LAGALY, G. Anion-Exchange Reactions of Layered Double Hydroxides. **Inorganic Chemistry**. v. 29, p.5201-5207, 1990.

MEZZETTI, A. et al. Protic equilibria as the key factor of quercetin emission in solution. Relevance to biochemical and analytical studies. **Phys Chem Chem Phys**, v. 13, n. 15, p. 6858-64, 2011. ISSN 1463-9076.

MIEKELEY N., MORTARI S.R., SCHUBACH A.O. Monitoring of total antimony and its species by ICP–MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, p.495-502, 2002.

MITTRA B., SAHA A., CHOWDHURY A.R., PAL C., MANDAL S., MUKHOPADHYAY S. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v.6, p.527-541, 2000.

MOLOO, A.; POSTIGO, J. WHO to implement online epidemiological surveillance for leishmaniasis. **WHO**. Neglected tropical diseases, Geneva, 21 jun 2016. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/news/WHO\\_implement\\_epidemiological\\_surveillance\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO_implement_epidemiological_surveillance_leishmaniasis/en/)>. Acesso em: 18 set. 2018.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A-L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending? **PLoS Medicine**, v.6, n.2, e1000030, 2009.

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

MUZITANO, M.F; CRUZ, E.A.; DE ALMEIDA, A.P.; DA SILVA, S.A.G.; KAISER, C.R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN; B.; COSTA, S.S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v.72, p.81–83, 2006.

MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A.; CRUZ, E. A.; BERGONZI, M. C.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Planta Medica**, v.75, n.4, p.307–311, 2009.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percorso**, v.6, n.1, p. 147-168, 2014.

NEUMANN, M. G.; GESSNER, F.; CIONE, A. P. P.; SARTORI, R. A.; CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, v.23, n.6, p.818-824, 2000.

Novo Lino apresenta o maior número de casos de leishmaniose em Alagoas, **G1 Alagoas**. 20 jul. 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/al/alagoas/noticia/2015/07/novo-lino-apresenta-o-maior-numero-de-casos-de-leishmaniose-em-alagoas.html>>. Acesso em: 19 set. 2018.

NUNES, M.P.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MONTEIRO, B.C. et al. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in *Leishmania*-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Micro. Infect.**, v.7, n. 1, p. 78-85, 2005.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OMS. Leishmaniasis. Ministério da Saúde, Brasil. 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Brazil\\_CP\\_2014.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Brazil_CP_2014.pdf?ua=1)>; Acesso em: 28 set. 2018.

OMS. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **The Weekly Epidemiological Record**, Genebra, Suíça, v.91, n. 22, p. 287-296, 2016a.

Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS/OMS. Epidemiological Report of the Americas. **Leishmaniasis report**, v.4, 2016.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updat**, v.7, p.257-266, 2004.

PAHAL, V.; DEVI, U.; DADHICH, K.S. Quercetin, a secondary metabolite present in methanolic extract of *Calendula officinalis*, is a potent inhibitor of peptide deformylase,

undecaprenyl pyrophosphate synthase and DNA primase enzymes of *Staphylococcus aureus*: an in vitro and in silico result analysis. **MOJ Drug Des Develop Therapy**, v.2, n.4, p. 216–225, 2018.

PAVUN, L.; ĐURĐEVIĆ, P.; JELIKIĆ-STANKOV, M.; ĐIKANOVIĆ, D.; ĆIRIĆ, A.; USKOKOVIĆ-MARKOVIĆ, S. Spectrofluorimetric determination of quercetin in pharmaceutical dosage forms. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v.33, n. 2, p. 209–215, 2014.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v.39, p.839 – 847, 2007.

PÉREZ-RAMÍREZ, J.; MUL, G.; MOULJIN, J. A. In situ Fourier transform infrared and Raman spectroscopic study of the thermal decomposition of Co-Al and Ni-Al hydroxalicates. **Vibrational Spectroscopic**, v. 27, p. 75-88, 2001.

PONTE-SUCRE, A.; PADRÓN-NIEVES M. **Drug resistance in Leishmania parasites: consequences, molecular mechanisms and possible treatments**. Venezuela: Springer, 2018.

PRASAD, B. E.; KAMATH, P. V.; VIJAYAMOHANAN, K. Anion Exchange Reaction Potentials as Approximate Estimates of the Relative Thermodynamic Stabilities of Mg/Al Layered Double Hydroxides Containing Different Anions. **Langmuir**. v.27, p.13539–13543, 2011.

PRIMIYRI, A. et al. Understanding zinc (II) chelation with quercetin and luteolin: a combined NMR and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 83-95, 2015.

PUND, S.; JOSHI, A. **Nanoarchitectures for Neglected Tropical Protozoal Diseases: Challenges and State of the Art**. Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication, 2017, p.439-480.

RADA, S.; RUS, L.; RADA, M.; ZAGRAI, M.; CULEA, E.; RUSU, T. Compositional dependence of structure, optical and electrochemical properties of antimony(III) oxide doped lead glasses and vitroceramics. **Ceramics International**, v.40, p.15711–15716, 2014.

RAULF, A.; IMRAN, M.; KHAN, I.A. et al. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. **Phytoterapy research**. 2018.

RAVICHANDRAN, R.; RAJENDRAN, M.; DEVAPIRIAM, D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. **Food Chemistry**, v. 146, n. 0, p. 472-478, 2014. ISSN 0308-8146.

REDDY, J. R. et al. Antimony potassium tartrate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 2, p. 1321-1327, 2014.

REIS, M. J. **Síntese, caracterização e aplicação de hidróxidos duplos lamelares**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2009.

RICHARDS R.M. **Nanoscale materials in chemistry**. 2nd ed. New Jersey: John Wiley and Sons; 2009.

ROBERTS, W.L.; BERMAN, J.D., RAINEY, P.M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1234-1239. 1995.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. Review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p.514-535, 2005.

ROCHA, T. J. M.; SILVA, K. K. M.; OLIVEIRA, V. C.; SILVEIRA, L. J. D.; WANDERLEY, F. S.; CALHEIROS, C. M. L. Perfil epidemiológico relacionado aos casos de letalidade por leishmaniose visceral em Alagoas: uma análise entre os anos de 2007 a 2012. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.1, p. 17-20, 2015a.

ROCHA, T. J. M.; BARBOSA, A. C. A.; SANTANA, E. P. C.; CALHEIROS, C. M. L. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n.4, p. 49-54, 2015b.

ROJAS, C. et al. High sensitivity adsorptive stripping voltammetric method for antimony(III) determination in the presence of quercetin-5'-sulfonic acid. Substituent effect on sensitivity. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 185, n. 0, p. 560-567, 2013. ISSN 0925-4005.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas (Impresso)**, v.37, n.1, p.1-17, 2001.

SAN ROMÁN, M. S.; HOLGADO, M. J.; SALINAS, B.; RIVES, V. Characterisation of Diclofenac, Ketoprofen or Chloramphenicol Succinate encapsulated in layered double hydroxides with the hydrotalcite-type structure. **Applied Clay Science**, v.55, p.158–163, 2012.

SANCHARI, D.; ARDHENDU, M.K.; APARAITTA, G.; SUBHAMAY, P.; NIRMALENDU, D.; SIBANI, S. Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. **Current Aging Science**. v. 1, n.3, p. 169-174, 2008.

SILION, M.; HRITCU, D.; POPA, M. I. Preparation and characterization of ketoprofen-layered double hydroxide compounds. **Journal of optoelectronics and advanced materials**. v.12, n. 10, p.2150-2156, 2010.

SILVA, A.M.; TAVARES, J.; SILVESTRE, R.; OUAISSI, A.; COOMBS, G. H.; SILVA, A.C. Characterization of *Leishmania infantum* thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. **Parasite Immunology**, v.34, n.6, p.345-50, 2012.

SIMÕES, V.D.N.; FAVARIN, L.R.V.; CABEZA, N.A.; OLIVEIRA, T.D.; FIORUCCI, A.R.; STROPA, J.N.; RODRIGUES, D.C.M.; CAVALHEIRO, A.A.; ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**, v. 36, p. 495-501, 2013.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. Ed. São Paulo: C. Learning, 2010.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n.2, p.139-149, 2004.

SOUZA, L. G. **Estudo da remoção de ânions de soluções aquosas por meio de sorção em Hidróxidos Duplos Lamelares**. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

SUN, L.; HU, C. Facile synthesis via a solvothermal route and characterization of Mg–Al layered double hydroxide (LDH) 3D micro–nano structures. **Materials Research Bulletin**, v.46, p.1922–1927, 2011.

TAKELE Y., ABEBE T., WELDEGEBREAL T., HAILU A., HAILU W., HURISSA Z., ALI J., DIRO E., SISAY, Y., CLOKE T., MODOLELL M., MUNDER M., TACCHINI-COTTIER F., MÜLLER, I., KROPF P. Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.1, p.1-7, 2013.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARD, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUNC, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. **Antimicrobial Agents and Chemother**, v.4, p1352-1364, 2006.

TIUMAN, T. S., et al. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrob. Agents Chemother**. V. 49, p. 176–182, 2005.

TIUMAN, T.S.; BREZAN, M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (–)mammea A/BB. **Phytomedicine**, v.19, p.1196-1199, 2012

TONG, L.; ZHANG, J.; LIU, Q.; ZHAI, G. Sb(III)–Quercetin Complex : Synthesis, Characterization And Antioxidant Activity. **Life Science Journal**, v.13, n.7, 2016.

VELOZO, D.; CABRAL, A.; RIBEIRO, M. C. M.; DA MOTTA, J. O. C.; COSTA, I. M. C.; SAMPAIO, R. N. R. Leishmaniose mucosa fatal em criança. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.81, n.3, Rio de Janeiro, 2006.

VERMELHO, A.B.; SUPURAN, C. T.; CARDOSO, V.; MENEZES, D.; SILVA, J. R. A.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, I. A. Leishmaniasis:

Possible New Strategies for Treatment. **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. David M. Claborn, 2014. 534p.

VIANNA, G. O. Tratamento de leishmaniose tegumentar por infecções intravenosas de tártaro emético. **Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia**, v.4, n. 426, 1912.

VIEIRA, L. S. **Leishmaniose visceral**. MedFoco. 2012. Disponível em: <<http://www.medfoco.com.br/leishmaniose-visceral-calazar/>>. Acesso 24 out. 2016.

VILA-NOVA, N.S.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; RONDON, F.C.M.; WILSON, M.E. et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p.1164-1168,2012.

VISWANATHAN, P.; SRIRAM, V.; YOGEE SWARAN, G. Sensitive Spectrophotometric Assay for 3-Hydroxy-Substituted Flavonoids, Based on Their Binding with Molybdenum, Antimony, or Bismuth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, n.7 2000. World Health Organization. Leishmaniasis: background information.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p. 12-23, 2018.

XU, Z.P., STEVENSON, G., LU, C.-Q., LU, G.Q. Dispersion and Size Control of Layered Double Hydroxide Nanoparticles in Aqueous Solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.110, n.34, p.16923-16929, 2006.

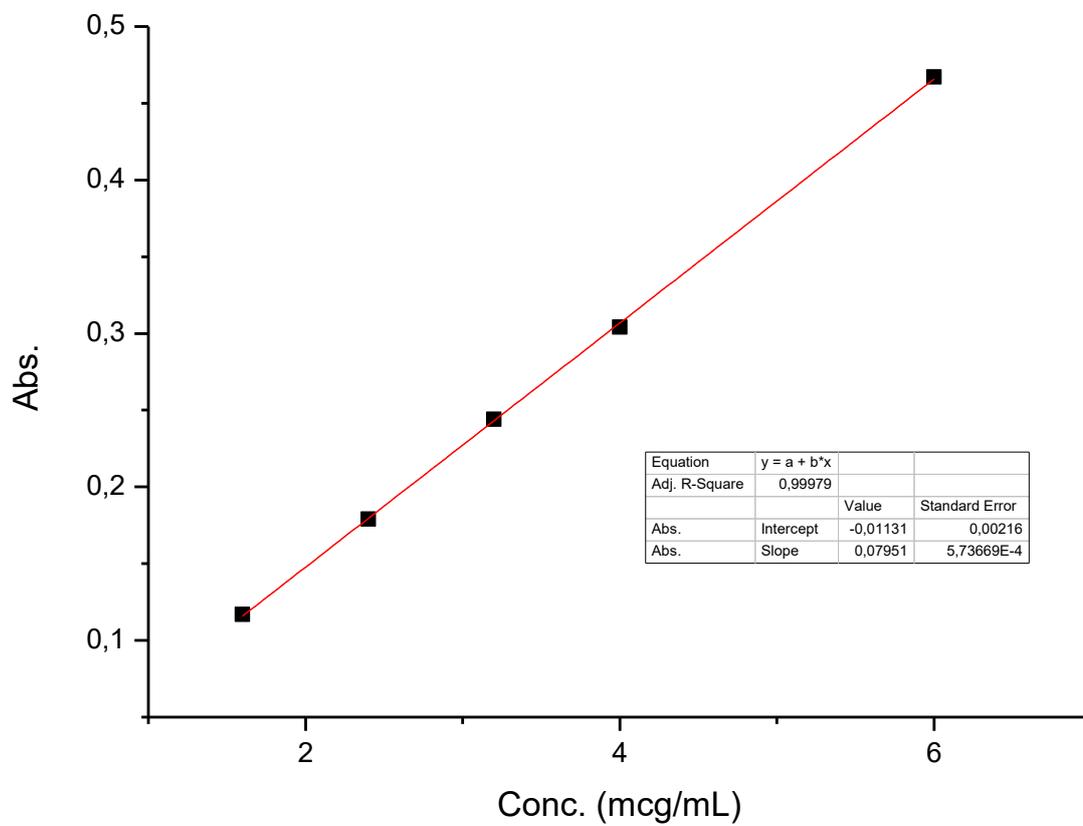
YUAN, Z.; WANG, H.; HU, Z.; HUANG, Y.; YAO, F.; SUN, S.; WU, B. Quercetin inhibits proliferation and drug resistance in KB/VCR oral cancer cells and enhances its sensitivity to vincristine. **Nutrition and cancer**, v. 67, n.1, p.126-136, 2015.

ZHAO, S.; WU, X.; GUO, W.; DU, Y.; YU, L.; TANG, J. N-(2-hydroxyl) propyl- 3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a novel delivery system for parathyroid hormone-related protein 1-34. **International Journal of Pharmaceutics**, v.393, p.269-273, 2010.

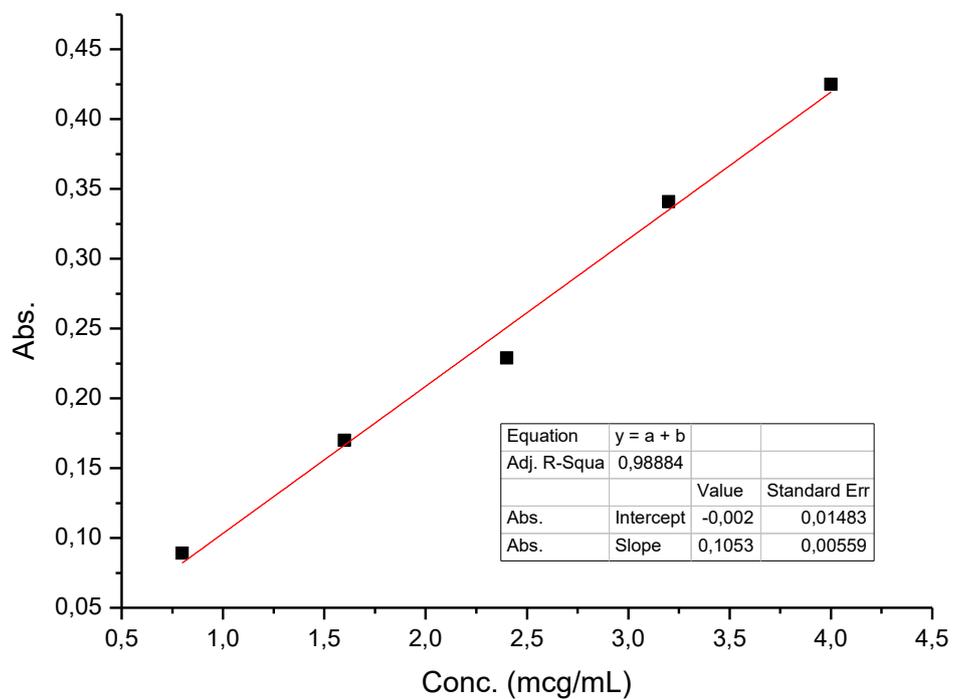
ZHOU, J. et al. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. **Transition Metal Chemistry**, v. 26, n. 1-2, p. 57-63, 2001.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109–110, 1983.

APÊNDICE 1 – Curva de calibração de quercetina em etanol ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ )



APÊNDICE 2 – Curva de calibração de quercetina em tampão tetraborato de sódio ( $\lambda = 370 \text{ nm}$ )



APÊNDICE 3 – Parâmetros de linearidade obtidos com a quercetina em diferentes solventes

Tabela - Parâmetros de linearidade obtidos com a quercetina em diferentes solventes

| SOLVENTE                             | COMPRIMENTO DE ONDA (nm) | FAIXA DE LINEARIDADE (µg/mL) | EQUAÇÃO DA RETA                         | APÊNDICE |
|--------------------------------------|--------------------------|------------------------------|---|----------|
| Etanol                               | 370                      | 0,4-6,0                      | $y = 0,07951x - 0,0113$<br>(R = 0,9999) | [1]      |
| Tampão tetraborato de sódio (pH 9,2) | 370                      | 0,8-4,0                      | $y = 0,1054x - 0,0021$<br>(R = 0,9944)  | [2]      |

Fonte: Autoria própria