



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JANAÍNA BARROS DE MENEZES

**Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) como carreadores de antimônio
visando uma alternativa na quimioterapia da leishmaniose**

Maceió

2014

JANAÍNA BARROS DE MENEZES

**Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) como carreadores de antimônio
visando uma alternativa na quimioterapia da leishmaniose**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profa. Dra. Camila Braga Dornelas

Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Maceió

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

M543h Menezes, Janaína Barros de.
Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) como carreadores de antimônio visando uma alternativa na quimioterapia da leishmaniose. / Janaína Barros de Menezes. – 2014.

75 f.

Orientadora: Camila Braga Domelas

Co-orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)– Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 60-73.

Apêndices: f. [74]

Anexos: f. [75]

1. Hidróxidos duplos lamelares. 2. Antimônio. 3. Sistema binário. 4. Nanotecnologia. 5. Leishmaniose. I. Título.

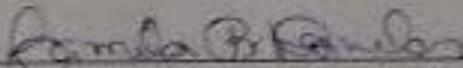
CDU: 616.993.161

Folha de Aprovação

Janaina Barros de Menezes

Hidróxidos duplos lamelares (HDLs) como carreadores de antimônio visando uma alternativa na quimioterapia da Leishmaniose

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 06 de março de 2014.

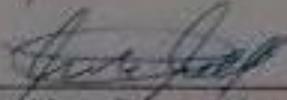

Prof.ª Dr.ª Camila Braga Dornelas (Orientador)


Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo (Co-orientador)

Banca Examinadora


Prof.ª Dr.ª Nereide Stela Santos Magalhães – (UFPE)


Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Moreira – (UFAL)


Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti - (UFAL)

*Dedico este trabalho à Deus,
ao meu pai José Menezes (in memoriam)
à minha mãe, Francinelza e
à minha irmã, Jamille, que são tudo pra mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que esteve presente em toda a minha vida, me guiando, iluminando e confortando.

Aos meus pais, por todo o cuidado, amor, educação e incentivo.

Aos meus irmãos, Jamille e Carlos Alberto que em muito me ajudaram para que eu chegasse até aqui, por toda paciência, carinho e atenção.

À minha família, em especial aos meus tios Paulo, Maurício e Tuta que sempre acreditaram e apoiaram meu trabalho.

Ao dr. Ricardo Camelo que cuidou com muito carinho da minha joia preciosa, nos trouxe muito apoio, conforto e esteve conosco da melhor forma possível.

Às minhas amigas Camilla, Talita, Lara, Lisllie e Katyane que passaram por todo esse processo ao meu lado e que souberam compreender a minha ausência em alguns momentos.

Ao meu noivo, Johnatan, pelo amor, força e apoio.

Aos meus orientadores Camila Dornelas e Luciano Grillo por toda confiança, carinho, apoio e amizade.

Aos meus amigos pessoais e de laboratório Tamires, Anderson, Danilo, Erlan, Valcilaine, Nayara, Rafael, Josiel, Mariana, Diogo e Antonio Thomás por toda a experiência trocada e por todos os momentos que passamos juntos.

Aos professores Irinaldo, João, Ticiano, Mario (Meneghetti), Rusiene, Magna e Maria Cristina (Delgado), que me acolheram, aconselharam, cederam espaço e estiveram presentes durante todo o trabalho.

À ESENFAR e IQB.

Ao GCAR, Laboratório Optma, Laboratório de Fotônica e à Fiocruz por toda a ajuda e suporte.

Aos queridos Edgar Catari, Jailma Barros, Nereu, Leandro e Cantídio que em muito auxiliaram e facilitaram durante todas as etapas do trabalho.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de aprendizado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A leishmaniose é uma antropozoonose de relevância mundial, classificada como categoria I do Programa de Doenças Tropicais, referente a doenças emergentes e fora de controle (MS, 2006), e no contexto nacional (especialmente regional), com notificação no período de 2010 a 2012, de 52.862 novos casos. A OMS preconiza como principal medida de controle para todas as formas da doença o uso de quimioterápicos, os fármacos de primeira escolha, os antimoniais. Embora sejam usados há quase 100 anos, apresentam uma série de limitações, dentre elas, a incômoda administração por via parenteral. Este trabalho propõe a investigação de Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs) como matriz hospedeira bidimensional de antimônio para o desenvolvimento de estratégias na quimioterapia da leishmaniose, visando à terapia oral. Tal escolha justifica-se pelo seu baixo custo, facilidade de síntese laboratorial, capacidade significativa de troca iônica e biocompatibilidade. Desta forma, ao longo do trabalho, foram realizadas sínteses de vários lotes de HDL precursor através do método de coprecipitação e caracterizados por meio de algumas técnicas. Foram realizados ensaios biológicos com o HDL precursor, onde foram avaliadas a citotoxicidade e a endocitose em macrófagos peritoneais. Posteriormente foi realizado o preparo dos sistemas binários via troca iônica, onde foram estudadas as variáveis concentração (1:2 e 2:1) do fármaco antimonial de partida (tartarato de antimônio III e potássio) e tempo reacional (2, 24, 48, 72 e 96 horas), e por fim, o revestimento destes nanossistemas. Por meio das técnicas de caracterização, foi confirmada a síntese e a robustez da metodologia de preparo dos HDL. O ensaio de citotoxicidade realizado para os HDLs comprovou a ausência da ocorrência desta enquanto o ensaio de endocitose comprovou sua ocorrência em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. A formação dos sistemas binários na forma de pó foi comprovada com o auxílio das técnicas de caracterização utilizadas, assim como foi identificada a formação do óxido de antimônio com simetria octaédrica. O revestimento com o polímero também foi realizado e avaliado por MET. Além do baixo custo e da facilidade de síntese laboratorial da argila, os sistemas produzidos são promissores, com base na escolha de HDL como um nanocarreador de Sb^{3+} , designado como responsável pela ação leishmanicida dos antimoniais. Além disso, não induz citotoxicidade e, de forma análoga à corrente de antimônio-carboidratos drogas, o HDL desempenharia o papel dos hidratos de carbono ao se submeter à endocitose por macrófagos (local de infecção).

Palavras-chave: Hidróxidos duplos lamelares. Antimônio. Nanotecnologia. Sistema binário. Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a global relevance anthroponosis, classified as category I on Brazilian Tropical Diseases Program, concerning emerging and out of control diseases, and in a national context (especially regional), with reporting in the period from 2010 to 2012, of 52,862 new cases. The WHO recommends as main control measure to all diseases forms the use of chemotherapy, among these, the first choice drugs are antimonials. Although its use for almost 100 years, they have a number of limitations, including the uncomfortable parenteral administration route. This study proposes a research of Layered Double Hydroxides (LDHs) as bidimensional host matrix to antimonials drugs to research on Leishmaniasis chemotherapy, in order to use the oral therapy. The choice for LDHs is justified by its low cost, easy to synthesize in laboratory, significant ion exchange and biocompatibility. Thus, along this study, there were several lots synthesis of HDL precursor and characterized by means and some techniques. Biological assays were performed with the HDL precursor, where endocytosis and cytotoxicity in peritoneal macrophages were evaluated. Subsequently the preparation of binary systems via ion exchange was performed, where the variables concentration (1:2 and 2:1) antimony parent drug (tartrate of antimony and potassium III) and reaction time (2, 24, 48, 72 and 96 hours) were studied, and finally coating these nanosistemas. Through the characterization techniques the synthesis and robustness of the methodology of preparation of HDLs were confirmed. The formation of binary systems in powder form was confirmed with the aid of the techniques used for characterizing, as well as identifying the formation of antimony oxide with octahedral symmetry. The coating polymer was produced and also evaluated by TEM. Besides the low cost and easily laboratorial synthesis of the clay, the systems produced are promising, based on the choice of LDH as a nanocarrier of Sb^{3+} , designated as responsible for antileishmanial action in the antimonials drugs. Furthermore, it does not induce cytotoxicity and, analogously to current antimony-carbohydrates drugs, LDH would play the role of carbohydrates while undergoing endocytosis by macrophages (site of infection).

Keywords: Layered double hydroxides. Antimony. Nanotechnology. Binary system. Leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Inseto <i>Lutzomyia</i> , vetor da leishmaniose.....	13
Figura 2 – 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.....	15
Figura 3 – Distribuição global da leishmaniose.....	17
Figura 4 – Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Alagoas (2001 – 2010).....	18
Figura 5 – Média anual de casos de Leishmaniose Visceral em Alagoas (2001 a 2010).....	19
Figura 6 – Ciclo evolutivo do parasito (<i>Leishmania</i>).....	20
Figura 7 – <i>Leishmania</i> – (a) Forma flagelada ou promastigota e (b) forma aflagelada ou amastigota.....	20
Figura 8 – Representação esquemática da estrutura dos HDLs.....	30
Figura 9 – Estrutura química da <i>Konjac glucomannan</i>	33
Figura 10 – Esquema de um equipamento de <i>spray dryer</i> com atomizador pneumático. (1) Bico pneumático. (2) Aquecedor elétrico. (3) Câmara de secagem. (4) Ciclone e coletor. (5) Filtro. (6) Aspirador para geração do fluxo	35
Figura 11 – Difratoograma do HDL precursor	48
Figura 12 – Representação esquemática do Mg-Al-Cl HDL.....	48
Figura 13 – Termograma do HDL precursor (linha contínua), acompanhado de sua derivada (linha pontilhada).....	49
Figura 14 – Espectro FT-IR do Mg, Al HDL precursor.....	50
Figura 15 – Espectro Raman do HDL precursor.....	51

Figura 16 – Estrutura e morfologia das formulações obtidas nas análises de MEV e de MET. Onde, (A) MEV de HDL em um aumento de 2000x, (B) MET de HDL em um aumento de 50000x.....	51
Figura 17 – Efeito dos HDLs em macrófagos peritoneais e viabilidade celular determinada por ensaio MTT	52
Figura 18 – Concentração-dependente de endocitose de HDL em macrófagos peritoneais viáveis	53
Figura 19 – Quantidade de antimônio (%) encontrada em F1 e F2 em diferentes tempos reacionais	55
Figura 20 – Espectros DRX. A) e C) F1; B) e D) F2.....	56
Figura 21 – Termogramas de F1, F2 e do fármaco puro	57
Figura 22 – Dados de FT-IR obtidos	58
Figura 23 – Espectros Raman obtidos de F1 e F2	59
Figura 24 – Estrutura e morfologia das formulações obtidas nas análises de MEV e de MET. Onde, (A) MEV de F1 em um aumento de 2000x, (B) MET de F1 em um aumento de 50000x, (C) MEV de F2 em um aumento de 2000x e (D) MET de F2 em um aumento de 50000x	60
Figura 25 – Micrografias dos nanocompósitos revestidos, onde A, B (170°C), C e D (200°C) representam a micrografia da primeira condição de revestimento e E, F (170°C), G, H (200°C) representam a segunda condição de revestimento	61

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Estrutura dos compostos contendo Sb^{5+} atualmente utilizados no tratamento da leishmaniose.....22
- Quadro 2** – Estrutura dos fármacos de segunda escolha empregados no tratamento da leishmaniose.....23
- Quadro 3** – Combinações de cátions que podem compor as lamelas dos HDLs.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs – Antiinflamatórios Não Esteroidais

ATP – do inglês, *Adenosine Triphosphate*

DATASUS – Departamento de Informática do SUS

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*

DNDi – do inglês, *Drugs for Neglected Diseases Initiative*

DRX – Difração de Raios X

EDL – Espalhamento Dinâmico de Luz

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HDL – Hidróxido Duplo Lamelar

HIV – do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*

ICP-AES – do inglês, *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*

LC – Leishmaniose Cutânea

LM – Leishmaniose Mucosa

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

RiFi – Reação da Imunofluorescência Indireta

Sb³⁺ ou Sb (III) – antimônio trivalente

Sb⁵⁺ ou Sb (V) – antimônio pentavalente

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificações

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

SRE – Sistema Retículo Endotelial

TGA - Termogravimetria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Leishmaniose	13
2.1.1	Definição e classificação	13
2.1.1.1	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	15
2.1.1.2	Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar	16
2.1.2	Epidemiologia	17
2.1.3	Ciclo evolutivo	19
2.1.4	Tratamento da leishmaniose	22
2.1.4.1	Antimoniais	23
2.1.4.2	Anfotericina B	25
2.1.4.3	Isotionato de pentamidina	26
2.1.4.4	Paromomicina e metilfosina	27
2.2	Materiais nanoestruturados na quimioterapia da leishmaniose	27
2.2.1	Argilas lamelares	29
2.2.2	Hidróxidos Duplos Lamelares	30
2.2.3	Revestimento de HDLs	32
2.2.3.1	Glicomanana	33
2.2.4	Técnicas de revestimento.....	34
2.2.4.1	<i>Spray drying</i>	34
2.3	Técnicas de caracterização utilizadas	35
2.3.1	Difração de Raios X de Pós	35
2.3.2	Termogravimetria	36
2.3.3	Espectroscopia no Infravermelho	37
2.3.4	Espectroscopia Raman	38
2.3.5	Microscopia	39
2.3.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	40
2.3.5.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	40
1	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
2	METODOLOGIA	42
4.1	Materiais	42
4.2	Preparo do HDL precursor	42
4.3	Preparo dos sistemas binários HDL-antimonial	42
4.4	Revestimento dos nanocompósitos	43
4.5	Ensaio biológicos com o HDL precursor	43
4.5.1	Isolamento de macrófagos peritoneais e cultura celular	43
4.5.2	Ensaio de citotoxicidade	44
4.5.3	Ensaio de endocitose	44
4.6	Caracterização	45
4.6.1	Caracterização do HDL precursor	45
4.6.2	Caracterização dos nanocompósitos	46

4.6.3	Caracterização dos nanocompósitos revestidos	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Preparação do HDL precursor	47
5.2	Caracterização do HDL precursor	47
5.2.1	Difração de Raios X	47
5.2.2	Termogravimetria	49
5.2.3	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	49
5.2.4	Espectroscopia Raman	50
5.2.5	Microscopia Eletrônica	51
5.3	Ensaio biológicos	52
5.3.1	Ensaio de citotoxicidade	52
5.3.2	Ensaio de endocitose	53
5.4	Caracterização dos sistemas binários HDL-Sb	54
5.4.1	Espectrofotometria UV-Vis: quantificação indireta de Sb	54
5.4.2	Espectrometria de Emissão Atômica Indutivamente Acoplada ao Plasma	54
5.4.3	Espectrofotometria UV-Vis: especiação do Sb	55
5.4.4	Difração de Raios X	56
5.4.5	Termogravimetria	57
5.4.6	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	58
5.4.7	Espectroscopia Raman	59
5.4.8	Microscopia Eletrônica	60
5.5	Caracterização dos sistemas binários HDL-Sb revestidos	61
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS	64
8	APÊNDICES	
9	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, 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 *Tripanosomatidae*. É classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como de categoria I do Programa de Doenças Tropicais, referente a doenças emergentes e fora de controle (MS, 2006). As leishmanioses são endêmicas em 88 países, dos quais 72 estão em processo de desenvolvimento, mas seu impacto na saúde pública mundial é subestimado, visto que a declaração da doença é compulsória em apenas 32 dos países afetados pela mesma.

Um estudo recente sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas revelou que menos de 5% deste financiamento foi investido neste grupo de doenças parasitárias, ainda que mais de 500 milhões de pessoas sejam ameaçadas pelas mesmas (MS, 2012). Isso justifica que os fármacos antimoniais tenham uso na quimioterapia da leishmaniose há 100 anos, até hoje pouco se conhece a respeito dos seus mecanismos de toxicidade e de ação, e que continuem sendo os medicamentos de primeira escolha para tal (FRÉZARD et al., 2008). O fato é que seu uso acompanha grandes limitações, como: alta incidência de efeitos tóxicos, alto custo do tratamento, necessidade de um longo período de tratamento e a via de administração empregada (parenteral). Em vista disso, estudos encontram-se em fase investigativa visando o melhoramento da quimioterapia com os antimoniais, mas ainda são poucos os que têm sucesso na tentativa de redução destes efeitos tóxicos inerentes ao fármaco. A nanotecnologia pode, então, se apresentar como uma alternativa na redução de toxicidade e melhoramento da biodisponibilidade de fármacos, conferindo-lhes uma proteção parcial através da utilização de nanocarreadores (BERGAYA e LAGALY, 2001).

Assim, considerando-se (i) as características estruturais dos fármacos antimoniais, normalmente encontrados sob a forma de sais ionizáveis; e (ii) as características das argilas aniônicas ou hidróxidos duplos lamelares (HDLs), como: facilidade de síntese laboratorial, dispersibilidade em água, baixo custo, biocompatibilidade, e, em especial, sua propriedade de troca (an)iónica; o presente trabalho visa à avaliação inédita dos HDLs como nanocarreadores inorgânicos de antimônio como alternativa na quimioterapia da leishmaniose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

2.1.1 Definição e classificação

As leishmanioses são doenças zoonóticas causadas por protozoários parasitos intracelulares obrigatórios, do gênero *Leishmania*. Tais protozoários pertencem à família Trypanosomatidae e se alojam no compartimento fagossomal do macrófago, célula sanguínea com função de defesa de hospedeiros vertebrados (MS, 2007; NGURE et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2012;)

A leishmaniose infecta os seres humanos através da picada de flebotomíneos, insetos hematófagos (Figura 1), que se reproduzem em áreas de florestas, cavernas e casas de tijolos de adobe (GOODWIN, 1980). Tais insetos transmissores da doença são pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), infectados por estes protozoários (MS/SVS, 2007; NGURE et al., 2009; PAVLI et al., 2010). A transmissão pode ocorrer ainda, através da doação ou transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou ainda de forma congênita (PAVLI et al., 2010).

Figura 1 – Inseto *Lutzomyia*, vetor da leishmaniose



Fonte: Fiocruz (2006).

Tal patologia é considerada um problema grave de saúde pública no mundo, onde 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença. Estima-se que cerca de 12 milhões de

pessoas estão atualmente infectadas e cerca de 2 milhões de novos casos ocorrem anualmente (HERNÁNDEZ et al., 2012).

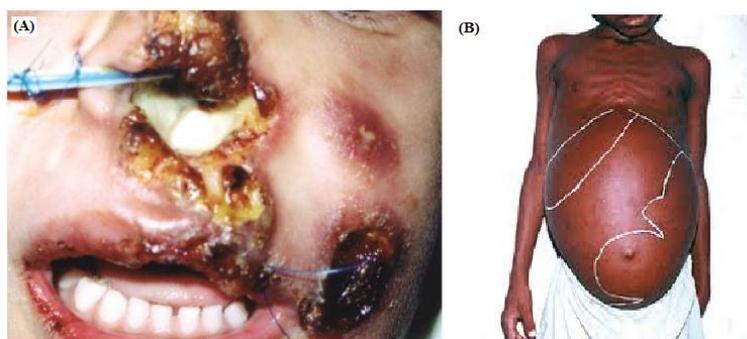
O tipo de leishmaniose que pode acometer o indivíduo varia de acordo com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção, área de aquisição e fatores do hospedeiro, como, por exemplo, a resposta imune específica do hospedeiro (NGURE et al., 2009; PAVLI et al., 2010). Apesar de a infecção poder apresentar-se de forma assintomática (PAVLI et al., 2010), a leishmaniose é caracterizada pela OMS (WHO, 2013), levando em consideração o espectro de suas manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada em:

- Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), é também conhecida como úlcera de Bauru, ferida brava, entre outras, e inclui as formas a seguir (MS, 2000).
 - Leishmaniose cutânea (LC): lesões cutâneas ulcerativas na região da picada do inseto transmissor, geralmente em áreas expostas como pernas, braços e face, sendo que tais lesões costumam curar espontaneamente após alguns meses, resultando em cicatrizes (MS, 2009).
 - Leishmaniose cutâneo-difusa (LCD): derivação da LC, com apresentação de múltiplos nódulos não-ulcerativos semelhantes às lesões da hanseníase virchowiana e são bastante difíceis de tratar (MS, 2009).
 - Leishmaniose Mucosa (LM): derivação da LC, com presença de inflamação destrutiva na mucosa. Também denominada leishmaniose mucocutânea (EL-HASSAN et al., 2001; PAVLI et al., 2010), causa lesões que podem destruir parcial ou totalmente as mucosas do nariz, da boca e da garganta cavidades e tecidos circundantes. Esta forma da doença é considerada pelo Ministério da Saúde, uma fase tardia da forma cutânea da doença (MS, 2013).
- Leishmaniose visceral (LV) é também conhecida como Calazar e se caracteriza por febre alta, perda substancial de peso, inchaço do baço e do fígado, e anemia. Se não tratada, a taxa de mortalidade da doença pode chegar a 100% dentro de 2 anos (MS, 2009).

As leishmanioses estão incluídas no conceito de “doenças negligenciadas” (SOUZA, 2010). De acordo com Lotrowska e Zackiewicz (2005), uma doença pode ser considerada negligenciada quando as opções de tratamento são inadequadas ou quando não existem; quando seu mercado potencial de fármacos é insuficiente para provocar uma pronta resposta

do setor privado e, por fim, quando a disposição do governo em lutar contra este tipo de doença é insuficiente, ou seja, há falha de mercado e de política pública. Estes autores fazem ainda uma distinção entre as doenças negligenciadas e as doenças extremamente negligenciadas, pela qual as últimas acometeriam pacientes com tão pouco poder aquisitivo, que não têm capacidade de compra e, conseqüentemente, não conseguem estimular o interesse da indústria farmacêutica. A doença do sono, leishmaniose visceral e doença de Chagas (DNDi, 2013) são exemplos de doenças extremamente negligenciadas (WHO, 2013). Assim, a LC é considerada como a forma mais comum no mundo e a LV como a forma mais grave (WHO, 2013) (Figura 2).

Figura 2 – 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



Fonte: VELOZO et al. (2006);VIEIRA (2012).

2.1.1.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

É definida pelo Ministério da Saúde do Brasil (2007), como uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas; sendo a forma mucosa, a evolução da forma cutânea (MS, 2009). Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente (MS, 2007).

De acordo com Hernández et al. (2012), até o ano de 2005 foram reconhecidas na América onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L.*

(*V. lindenberg*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*. As três últimas são consideradas como as principais espécies (MS, 2009).

Existe um período de incubação da doença no ser humano e este ocorre, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos (MS/SVS, 2007). Os pacientes infectados geralmente desenvolvem de leves a graves lesões ulcerativas limitadas a apenas uma única (leishmaniose localizada) ou a várias lesões na pele, resultando em desfiguração grave, deficiência e estigma social e psicológico (HERNÁNDEZ et al. 2012).

Vários são os métodos de diagnóstico que podem ser utilizados para a confirmação da leishmaniose, havendo sempre uma fundamental importância na realização da correlação entre o diagnóstico clínico e o laboratorial (MS, 2011b).

Para a LC, normalmente o Ministério da Saúde (2011b) recomenda os procedimentos de escarificação, de punção aspirativa ou de biópsia das lesões cutâneas, de linfonodos ou de mucosas (sendo estes dois últimos, utilizados em casos de leishmaniose cutâneo-mucosa).

2.1.1.2 Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar

É causada por *L. donovani* (na Ásia e África) e *L. infantum/L. chagasi* (no sul da Europa e no Brasil) (GONTIJO e MELO, 2004; SILVA, 2007; CROFT et al., 2011).

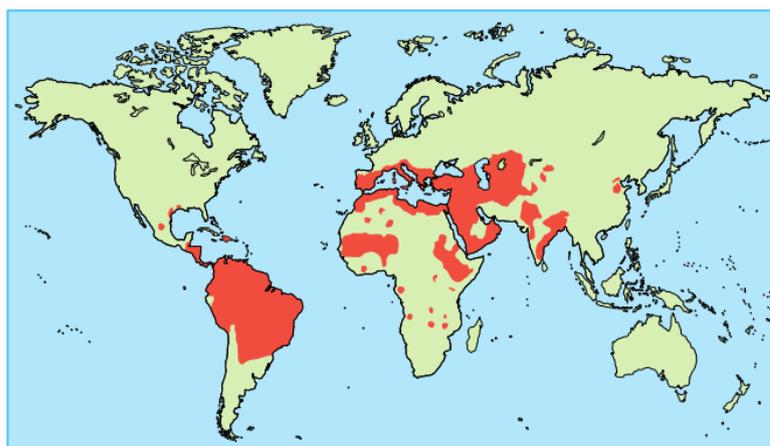
As manifestações clínicas apresentam-se em intensidades variáveis e o período de incubação ocorre, em média, por cerca de três meses. A grande maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática por toda a vida, porém na forma clássica da doença pode ocorrer febre, hepatoesplenomegalia discreta e palidez cutâneo-mucosa, podendo estar presentes tosse e diarreia. Se não tratado, o paciente pode evoluir para o período de estado caracterizado por hepatoesplenomegalia volumosa, linfadenomegalia, persistência da febre, piora da palidez cutâneo-mucosa, taquicardia e emagrecimento progressivo (PASTORINO et al., 2002). No período final da doença ocorre uma associação a infecções bacterianas, desnutrição proteico-energética grave, epistaxe, sangramentos cutâneos ou digestivos, sendo as infecções bacterianas responsáveis pela maioria dos óbitos (PAVLI et al., 2010; MS, 2011b). No entanto, para o desenvolvimento e progressão da doença, alguns fatores como a idade, o estado nutricional e as características imunogenéticas do indivíduo acometido determinam a intensidade das manifestações clínicas (MS, 2011b).

Diante da suspeita de LV, o Ministério da Saúde (2011a) recomenda a coleta de sangue para sorologia. A seguir, recomenda hemograma (com contagem de plaquetas); velocidade de hemossedimentação; creatinina; ureia; alanina aminotransferase; aspartato aminotransferase; atividade de protrombina; albumina; globulina; fosfatase alcalina; bilirrubinas e amilase sérica. Adicionalmente, devido à alta e comum prevalência de co-infecção HIV-leishmania, visto que a SIDA pode manifestar-se como doença oportunista em pacientes imunodeprimidos, recomenda, também, oferecer o teste de HIV a todo paciente com diagnóstico confirmado de LV. São também recomendados o aspirado de medula óssea ou a obtenção das células nucleadas (leucócitos) do sangue periférico, além da possibilidade de realização de biópsia ou punção de órgãos do sistema fagocítico mononuclear (SFM) – baço, fígado ou linfonodos (MS, 2011b).

2.1.2 Epidemiologia

Com base na distribuição geográfica (Figura 3), a leishmaniose é dividida em Novo Mundo e Velho Mundo (PAVLI et al., 2010). Tal divisão geográfica decorre da regionalização do ponto de vista histórico, onde o Velho Mundo é uma expressão usada para designar a visão de mundo que os europeus detinham por volta do século XV, quando eram conhecidos apenas os continentes europeu, africano e asiático. Já o Novo Mundo, expressão também criada pelos europeus, se refere ao continente americano (FREITAS, 2010).

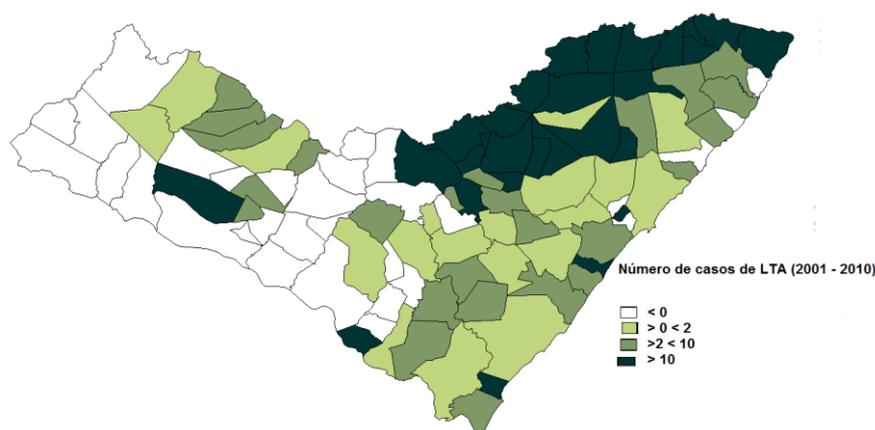
Figura 3 – Distribuição global da leishmaniose



Fonte: DAVIES et al., 2003.

De acordo com o Ministério da Saúde (2013), no Brasil, no período de 2008 a 2013, a LTA apresentou 9.712 notificações, sendo 8.879 apenas no ano de 2013, com cinco óbitos causados pela doença (SINAN, 2014). Em relação à notificação de casos de LTA no estado de Alagoas, o mapa apresentado na figura 4 retrata este histórico entre 2001 e 2010. Conforme o mapa, as cidades mais atingidas pela LTA são Palmeira dos Índios, Quebrangulo, Chã Preta, Paulo Jacinto, Viçosa, Santana do Mundaú, São José da Laje, Colônia Leopoldina, Ibateguara, União dos Palmares, Novo Lino, Jundiá, Campestre, Jacuípe, São José da Tapera e Traipu.

Figura 4 – Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Alagoas (2001 – 2010)

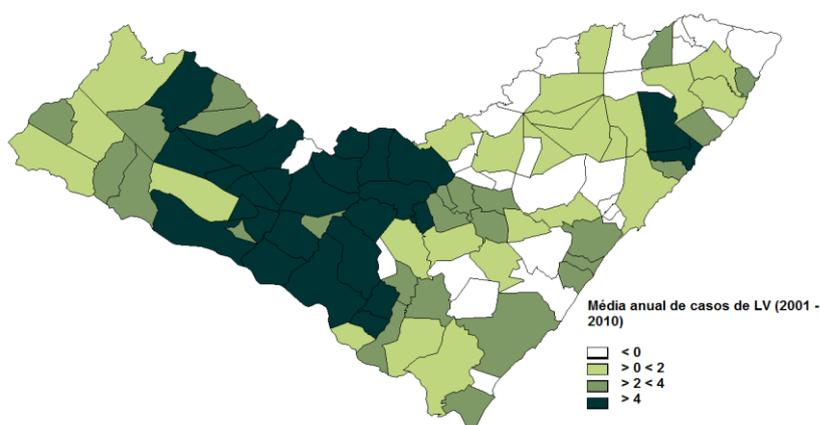


Fonte: DATASUS / MS (informações obtidas em abril de 2012).

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde/MS (2012), a LV apresenta um comportamento cíclico epidemiológico, com aumento no número de casos aproximadamente, a cada cinco anos. No período de 2008 a 2013, foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2014) 1.415 casos confirmados de LV no Brasil, sendo que 1.105 destes casos foram notificados apenas no ano de 2013, com a evolução de 88 óbitos no país por LV registrados no período de 2012 a 2013, sendo que 1 óbito por LV foi notificado no ano de 2012 no estado de Alagoas. A região nordeste ainda apresenta elevada quantidade de casos letais da doença (40 casos), com destaque para o estado do Ceará (14 casos notificados apenas no ano de 2013). Em segundo lugar no “ranking” mais atual, a região centro-oeste, apresentou 29 casos letais de leishmaniose do tipo visceral (notificadas no período de 2012 a 2013), seguida pela região sudeste, com 16 casos letais; e pela região norte com 13 casos letais notificados pelo SINAN (2014) dentro do mesmo período. Já a região sul do Brasil, desde o ano de 2007 até o ano de 2013, não registrou nenhum caso letal, provavelmente pelo ambiente desfavorável à propagação e manutenção do ciclo da doença

(SINAN, 2014). Quanto à notificação de casos de LV no estado de Alagoas, o mapa apresentado na figura 5 retrata a média anual de casos compreendendo o intervalo de tempo entre 2001 e 2010. Conforme o mapa, as cidades alagoanas mais atingidas pela LV são Passo de Camaragibe, Canapi, Poço das Trincheiras, Santana do Ipanema, Cacimbinhas, Minador do Negrão, Palmeira dos Índios, Estrela de Alagoas, Major Izidoro, Craíbas, Igaci, Arapiraca, Campo Grande, Olho d'Água Grande, Lagoa da Canoa, Traipu, Palestina, Pão de Açúcar, Senador Rui Palmeira, Olivença e Olho d'Água das Flores.

Figura 5 – Média anual de casos de Leishmaniose Visceral em Alagoas (2001 a 2010)

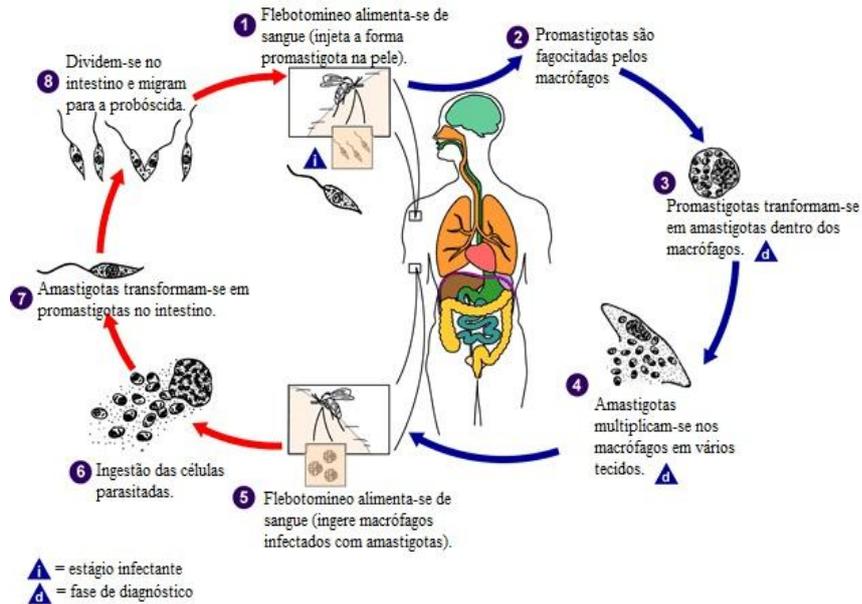


Fonte: DATASUS / MS (informações obtidas em abril de 2012).

2.1.3 Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo da *Leishmania spp.* (Figura 6) é heteroxênico, envolvendo o inseto vetor (flebotomíneo) e os reservatórios vertebrados, que podem ser os animais domésticos e silvestres e, acidentalmente, o homem (MS, 2007).

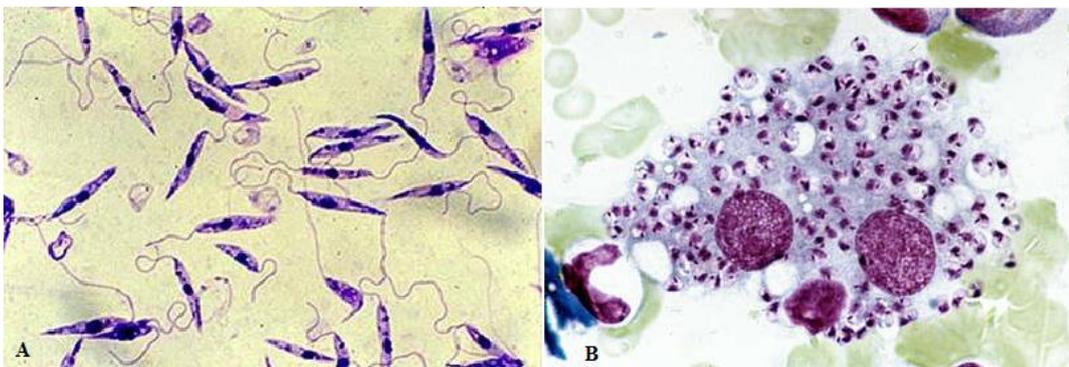
Figura 6 – Ciclo evolutivo do parasito (*Leishmania*)



Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention DPDx*, 2009. *Leishmaniasis*. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>. (adaptado).

O flebotomíneo ou flebótomo, que é o hospedeiro invertebrado, possui hábito crepuscular e realiza hematofagia quando as temperaturas encontram-se acima dos 18°C e na ausência de chuva ou vento (ALVAR et al., 1995). Por meio da hematofagia realizada, o inseto adquire a forma amastigota através da linfa intersticial ou do sangue circulante. No tubo digestivo deste inseto ocorre uma série de mudanças nos aspectos morfológicos, bioquímicos e moleculares no protozoário parasito *Leishmania spp.*; sendo a principal mudança a transformação da forma amastigota em promastigota (Figura 7), com o decorrer do ciclo de vida do parasito (ALVAR et al., 1995; SARAIVA et al., 2005; NETO et al., 2008).

Figura 7 – *Leishmania* – (a) Forma flagelada ou promastigota e (b) forma aflagelada ou amastigota



Fonte: (a) CORRÊA, R. (2012); (b) Canine Vector-Borne Diseases (2013).

As amastigotas podem estar dentro ou fora dos macrófagos adquiridos no ato da hematofagia. Apresentam formas arredondadas, com citoplasma azul pálido, núcleo excêntrico e cinetoplasto em forma de bastonete, de cor idêntica à do núcleo (MS/SVS, 2011b). Já as promastigotas apresentam um formato mais alongado e um flagelo, cujo tamanho depende do estágio de evolução (SARAIVA et al., 2005).

No hospedeiro vertebrado (chacais, raposas, cães) e no homem (antropozoonose), a transmissão do protozoário *Leishmania* é feita pela picada do flebótomo (ALVAR et al., 1995). No momento da picada as formas promastigotas são regurgitadas e introduzidas na derme do hospedeiro vertebrado ou do homem (reservatório). Juntamente com as *Leishmanias* regurgitadas, a saliva contendo peptídeos inflamatórios é também inoculada, promovendo uma reação inflamatória imediata que atrai células fagocíticas para o local (NETO et al., 2008). A forma promastigota é fagocitada por células do SFM, principalmente células de Kupffer do fígado, células reticulares e macrófagos do baço, da medula óssea e dos gânglios linfáticos, ou ainda, em menor grau, dos rins, suprarrenais, intestino, pulmões e pele, multiplicando-se o protozoário no ambiente ácido dos lisossomas secundários (OMS, 1997). A partir deste momento, multiplicam-se por divisão binária dentro de fagolisossomas das células do hospedeiro (BERENGUER et al., 1998; REY, 2001), escapando, em um primeiro momento, de mecanismos específicos de defesa, como a lise através do sistema complemento (NETO et al., 2008). Após a multiplicação, os macrófagos se rompem liberando grande número de parasitos que invadem outras células e podem, dessa maneira, atingir outros locais do organismo. O mecanismo de transmissão pela picada do inseto é o de maior importância epidemiológica, no entanto existem outros, como via transplacentária, venérea e transfusão de sangue (CRUZ et al., 2002; BASSET et al., 2005; PAGLIANO et al., 2005).

A maioria dos indivíduos consegue conter a infecção (infecção inaparente) e estabelecer uma imunidade duradoura; outros desenvolvem uma forma oligossintomática da infecção que também pode ser resolvida espontaneamente ou evoluir para a doença clássica (NETO et al., 2008). O local de disseminação é determinado por características do parasito, como sensibilidade à temperatura (REITHINGER & DAVIES, 2002), tropismo pelo tecido (ZHANG et. al., 2003) e capacidade de imunoevasão (MCDOWELL et al., 2002).

2.1.4 Tratamento da leishmaniose

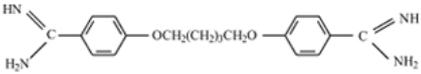
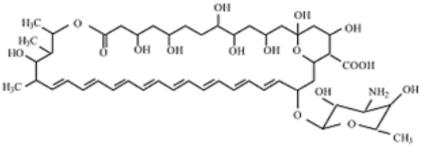
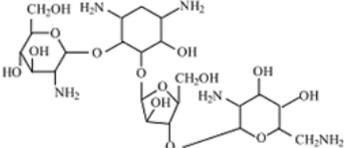
Independente do tipo de leishmaniose, o tratamento é feito com quimioterápicos. Segundo manuais elaborados pelo Ministério da Saúde (MS, 2007; MS, 2011a; PORTAL DA SAÚDE, 2013) o antimônio pentavalente (Quadro 1) é o fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimônio pentavalente, os fármacos de segunda escolha recomendados são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina), podendo também ser utilizadas a paromomicina e o metilfosina (Quadro 2) (RATH et al., 2003). A escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez, co-morbidades e a doença (LV, LMC ou LC).

Quadro 1 – Estrutura dos compostos contendo Sb^{5+} atualmente utilizados no tratamento da leishmaniose

Fórmula estrutural proposta	Nome químico Nome comercial
$ \begin{array}{c} CH_2NHCH_3^+ \\ \\ HCOH \\ \\ HOCH \\ \\ HCOH \\ \\ HCOH \\ \\ CH_2OH \end{array} \cdot (OH)_2Sb_2O^- $	Antimoniato de N-metilglucamina Glucantime®; Antimoniato de meglumina
$ \left[\begin{array}{ccc} \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ CHOH \\ \\ HCO \\ \\ HCO \\ \\ HCO \\ \\ COO^- \end{array} & \begin{array}{c} OH \\ \\ Sb - O - Sb \\ \\ O^- \end{array} & \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ CHOH \\ \\ OCH \\ \\ OCH \\ \\ OCH \\ \\ COO^- \end{array} \end{array} \right] Na_3,9H_2O $	Gluconato de antimônio (V) sódico ou Estibogluconato de sódio Pentostam® Solustibosan®

Fonte: RATH et al. (2003).

Quadro 2 – Estrutura dos fármacos de segunda escolha empregados no tratamento da leishmaniose

Fórmula estrutural	Nome Químico/ Nome comercial
	Isetionato de pentamidina
	Anfotericina B
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Miltefosine
	Paromomicina

Fonte: RATH et al. (2003).

2.1.4.1 Antimoniais

Os antimoniais pentavalentes são os fármacos de primeira escolha preconizados pela OMS. Hoje, podem ser utilizados: o antimoniato de meglumina (Glucantime[®], Sanofi Aventis, França) comercializado em países de língua latina, como o Brasil; e o estibogluconato de sódio (Pentostan[®], Glaxo Wellcome, Reino Unido) distribuído em países de língua inglesa (MARTINS, 2007). A diferença na escolha da utilização destes fármacos se deve não somente as várias espécies de *Leishmania spp.* causadoras da doença, mas também à diferença intrínseca na sensibilidade das espécies aos fármacos disponíveis e ao local de infecção (forma cutânea, mucocutânea ou visceral), assim, impondo diferentes necessidades farmacocinéticas aos fármacos (CROFT e COOMBS, 2003).

O Glucantime[®] é comercializado em ampolas de 5 mL, que contêm 1,5g do antimoniato bruto e 405 mg/Sb⁵⁺, ou seja, cada mL contém 81 mg de Sb⁵⁺. De acordo com a OMS, a posologia deve ser calculada em mg de Sb⁵⁺/kg/dia com o objetivo de uniformizar o tratamento. Em 1982, a OMS sugeriu a dose ótima de 20 mg/kg/dia com a dose máxima de 850 mg de Sb por dia e o máximo de 28 dias; sendo esta dosagem bem tolerada por crianças e desnutridos. Deve ser administrado preferencialmente pela via endovenosa por injeção lenta

durante 5 minutos, podendo ser administrado também pela via intramuscular na região glútea. Por cerca de seis décadas, o tratamento parenteral com antimonial pentavalente foi realizado para leishmaniose cutânea e visceral. No entanto, existem dificuldades no que concerne ao uso destes fármacos em indivíduos que adquiriram resistência ao mesmo e à impossibilidade de tratamento de pacientes co-infectados com HIV (DAVIES et al., 2003; MS, 2011a).

O Ministério da Saúde (2011a) relata a possibilidade de ocorrência de efeitos adversos, com manifestação única ou em pluralidade, na seguinte ordem de frequência: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. São também contraindicados em pacientes gestantes pelo fato de atravessarem a barreira transplacentária. Neste caso, podem afetar o tecido nervoso do feto, ocasionando síndromes severas de retardamento mental. Há também contraindicação para pacientes portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas (MS/SVS, 2011a).

Embora a extensa relação de efeitos adversos, vale ressaltar que os antimoniais pentavalentes foram adotados por exibir menor toxicidade que os fármacos antimoniais originais, 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, 2011a). 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.

Apesar do uso clínico dos antimoniais há mais de 100 anos, o mecanismo de ação e base para toxicidade seletiva destes agentes leishmanicidas permanecem pouco conhecidos (SOARES-BEZERRA, 2004). 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 ocorre em tecidos como baço e fígado, sendo este acúmulo o responsável pelos efeitos tóxicos relacionados à administração do antimonial (MS/SVS, 2011a). Tais resultados reforçam algumas hipóteses que afirmam que existe uma conversão metabólica intramacrofágica do Sb^{5+} em Sb^{3+} , sendo o último, então, o elemento tóxico à *Leishmania* no estado intracelular (GIL et al., 2007; SERENO et al., 1998). Esta teoria foi proposta pela primeira vez por Goodwin e Page (1943), pela qual o Sb^{5+} poderia atuar como um pró-fármaco que teria que ser convertido em seu ativo, o Sb^{3+} .

A forma pentavalente não se liga ao eritrócito, portanto, atingem maiores níveis de concentração plasmática do que os compostos trivalentes. 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); 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).

Finalmente, visando à redução do abandono ao tratamento de pacientes infectados com leishmaniose que fazem a utilização de antimoniais, seria ideal a obtenção e administração de uma forma farmacêutica oral em função dos benefícios ao paciente e vantagens econômicas que esta via representa. No entanto, Marsden (1985) relata que antimoniais pentavalentes convencionais não podem ser administrados por via oral, devido à sua má absorção e/ou inativação no estômago. A administração parenteral destes fármacos requer um regime de dose múltipla devido à rapidez de sua depuração renal. Quando administradas várias doses consecutivas, o regime de dose não é cumprido, assim resultando na resistência ao medicamento. É, portanto, desejável desenvolver métodos para melhorar a biodisponibilidade de antimoniais por via oral (FRÉZARD et al., 2009).

2.1.4.2 Anfotericina B

A anfotericina B (Fungizone[®], Bristol Meyers Squibb, Estados Unidos) é um antibiótico poliênico produzido naturalmente pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus* com ampla utilização no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN e SOUZA, 2006). É o medicamento de primeira escolha para o tratamento de gestantes e o medicamento de segunda escolha no caso de não obtenção de resposta ao tratamento com antimonial ou na impossibilidade da utilização deste (MS, 2007). A anfotericina B possui um elevado potencial e espectro de ação, o que resulta numa maior confiabilidade de uso (FILIPPIN e SOUZA, 2006; MS, 2007).

Atualmente são comercializadas três formulações: a anfotericina B lipossomal (AmBisome[®]; Gilead Sciences, Estados Unidos), o complexo lipídico anfotericina B (ABL; Abelcet[®], Enzon Pharmaceuticals, Estados Unidos) e a dispersão coloidal anfotericina B

(ABCD; Amphotec™, InterMune Corp, Canadá) (SUNDAR E CHAKRAVARTY, 2010); porém o primeiro é o fármaco de recomendação pela OMS (WHO, 2013).

Esta formulação evidenciou sua utilidade em pacientes co-infectados com Leishmania-HIV, embora ainda não hajam estudos comparativos entre tais formulações com os antimoniais e a anfotericina B convencional (MS/SVS, 2011a). A anfotericina B e sua forma lipossomal possuem afinidade por órgãos componentes do Sistema Reticuloendotelial (SRE), justificando seu acúmulo em órgãos como fígado, medula óssea e baço, e, portanto, a hepatotoxicidade que pode vir a ocorrer em casos de administrações sucessivas de AmBisome®, trazendo como benefícios, porém, a diminuição da toxicidade renal e cardíaca (COHEN, 1998; FILIPPIN e SOUZA, 2006).

No Brasil, a dose preconizada é de 1 mg/kg/dia, durante 14 a 20 dias consecutivos, não devendo ultrapassar a dose máxima diária de 50 mg (MS, 2007); para a forma lipossomal, devem ser administrados 3mg/kg/dia, durante 7 dias ou 4mg/kg/dia, durante cinco dias por infusão venosa, em dose única diária (MS, 2006).

2.1.4.3 Isotionato de pentamidina

O isotionato de pentamidina, conhecido comercialmente como Pentcarinat® (Sanofi-Aventis, França) é basicamente uma diamidina aromática, que figura como um medicamento de segunda escolha no tratamento da leishmaniose (MS, 2007). Segundo Rath et al. (2003), tal substância é particularmente útil em casos que não responderam aos antimoniais ou para pacientes com Calazar que sejam hipersensíveis ao antimônio (BALAÑA-FOUCE, 1998; MS, 2009).

O modo de ação é controverso e ainda não foi completamente compreendido. Feurestein et al. (1991) descrevem-no como uma estrutura catiônica que possui forte interação com o parasito em pH fisiológico, assim promovendo efeitos tóxicos ao parasito. O isotionato de pentamidina seria, então, endocitado por um mecanismo dependente de energia concentrada no interior do parasito, o qual compete com o transportador ativo de nucleosídeo (CARTER e FAIRLAMB, 1993), causando a morte do parasito.

Um fator complicante, assim como os demais fármacos já citados, é o elevado grau de toxicidade que apresenta. Devido à interferência no metabolismo da glicose, pode haver hipoglicemia seguida de hiperglicemia quando do seu uso (MS/SVS, 2007), além de

hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e até mesmo morte repentina (RATH et al., 2003).

A recomendação da OMS para o tratamento com Pentamidina[®] é de 4 mg/kg/dia, aplicados por via intramuscular ou endovenosa três vezes por semana com duração de 10 a 20 aplicações em dias alternados.

2.1.4.4 Paromomicina e metilfosina

A paromomicina, comercializada como Humatin[®] (Pfizer, Estados Unidos), e o metilfosina (Impavido[®], Paladin Labs, Canadá) são também medicamentos de segunda escolha.

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo ativo contra espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo*, que, dada sua nefro e ototoxicidade, este fármaco, também de administração parenteral, tem seu emprego limitado no caso de comprometimento das funções renais (POLI et al., 1997).

O metilfosina é um medicamento anticâncer alquilfosfolipídico, também ativo contra *Leishmania spp, in vitro* e *in vivo* e o único com possibilidade de administração oral (RATH et al., 2003). Apesar de não se conhecer exatamente como age no organismo humano como leishmanicida, ele interage com a membrana celular do protozoário, eliminando-o. Isto é atribuído à grande semelhança entre a membrana plasmática do protozoário e a humana (FRAGA, 2007). Este medicamento teve a formulação oral recentemente introduzida no mercado farmacêutico alemão (UKMi, 2013).

2.2 Materiais nanoestruturados na quimioterapia da leishmaniose

Intercalação é um termo utilizado para descrever a inserção de espécies hóspedes móveis (átomos, moléculas ou íons) em uma estrutura cristalina hospedeira, desde que esta possua sítios livres para a acomodação da primeira (MARANGONI, 2005). O sistema, tal como apresentado, constitui-se como um sistema nanoestruturado carreador de fármacos. De acordo com Bergaya e Lagaly (2001), a nanotecnologia por meio de materiais nanoestruturados carreadores de fármacos tem sido um recurso muito utilizado, dentre outras aplicações, na redução da toxicidade de fármacos. Tais materiais têm como principal

característica a dimensão da ordem de nanômetros, em ao menos uma direção, o que lhes confere características peculiares. Na Tecnologia Farmacêutica dispomos de diferentes tipos de potenciais nanocarreadores com uma, duas ou três dimensões manométricas, a exemplo das lamelas, tubos ou fibras e nanopartículas, respectivamente (FALLEIROS et al., 2011).

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, como já apresentado no capítulo 2.1.4.2. Mas, na literatura podem ser encontrados diversos estudos com esta abordagem de encapsulamento em lipossomas utilizando os fármacos antimoniais.

Como exemplo, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio foram encapsulados em lipossomas e administrados por via intravenosa em *golden hamsters* e, como resultado, apresentam 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 β -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.

Tendo em vista que os carreadores até então relatados, estes apresentam custos elevados (VEIGA e SALTÃO, 2001; FRÉZARD et al., 2005), torna discutível sua aplicabilidade prática para uma doença negligenciada, como a leishmaniose. Diante deste contexto, dentre as diferentes fontes de nanomateriais de origem natural, têm se destacado as argilas minerais, que apresentam inúmeras aplicações e ampla diversidade de uso, o que se deve à facilidade com que estes materiais são modificados. A utilização de argilas lamelares em aplicações farmacêuticas vem crescendo em função da capacidade dos mesmos, através da formação de nanocompósitos tipo intercalados ou esfoliados, de promover alteração na(s) propriedade(s) inicial(is) de um fármaco (BERGAYA e LAGALY, 2001).

2.2.1 Argilas lamelares

A definição clássica designa argila como um material natural, terroso, de granulação fina, que, quando umedecido com água, apresenta intumescimento (NEUMANN et al., 2000). Sendo que algumas se apresentam na forma de lamelas, ou seja, argilas lamelares.

De acordo com Neumann et al. (2000), a nomenclatura para os tipos de camadas (ou lamelas) da argila é uma simples expressão da razão entre as folhas tetraédricas e as folhas octaédricas. Assim sendo, um argilomineral (material, geralmente de origem mineral, responsável pela formação da argila) com camada 1:1 tem uma folha tetraédrica e uma folha octaédrica, enquanto que em um argilomineral do tipo 2:1 existem duas folhas tetraédricas e uma folha octaédrica interna. Podem ainda ocorrer substituições (de átomos de Si^{4+} das folhas tetraédricas por átomos de Al^{3+}), denominadas substituições isomórficas, pelo fato de causarem distorção na estrutura das lamelas. Tais substituições geram um excesso de carga negativa nas camadas das argilas, proporcionando um alto grau de capacidade de troca catiônica (presença de cátions trocáveis entre as lamelas) que é responsável por algumas das propriedades interessantes das argilas (ROSETTO et al., 2009; BOTELHO, 2006).

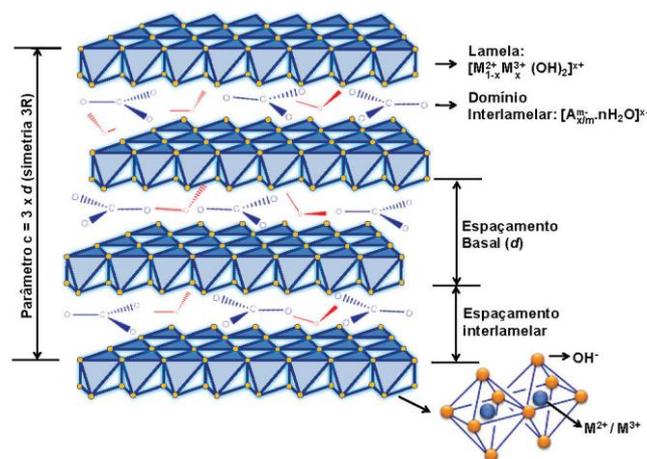
Em muitas classes de sólidos lamelares, as lamelas possuem carga elétrica devido a substituições isomórficas de íons de carga diferente na rede, resultando, genericamente, nas chamadas argilas catiônicas e as aniônicas. As primeiras caracterizam-se, quando em solução, pela ocupação de cátions na região interlamelar para a estabilização estrutural de suas lamelas negativamente carregadas, ao contrário do outro grupo. Todas têm capacidade de troca iônica, maior ou menor, e é com base nesta característica que podem ser gerados os compostos de intercalação com fármacos. Ao se adicionar um fármaco, a depender da sua estrutura, este pode ser intercalado em uma destas argilas (BOTELHO, 2006; COELHO et al., 2007).

Dentre as argilas aniônicas naturais, a mais conhecida é a hidrotalcita natural, com estrutura semelhante à brucita (ROMÁN et al., 2012) – hidróxido de magnésio, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, em que os átomos de magnésio estão octaedricamente coordenados por grupos hidróxidos (FORANO, 2004). Na Tecnologia Farmacêutica, os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDLs), ou compostos do tipo hidrotalcita ou do tipo brucita (por apresentarem semelhança com estas argilas naturais) (RIVES, 2013; SANTOS, 2007) vêm ganhando destaque.

2.2.2 Hidróxidos Duplos Lamelares

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 contrabalaneadas negativamente; podem apresentar em sua estrutura lamelar elementos distintos (Figura 8) (Crepaldi e Valim, 1998). São representados pela fórmula geral $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^{p+}(X^{n-})_{p/n} \cdot yH_2O$, onde 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.

Figura 8 – Representação esquemática da estrutura dos HDLs



Fonte: CUNHA et al., 2010.

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 compor as lamelas (Quadro 3) (LIN et al., 2006; PRASAD et al., 2011).

Quadro 3 – Combinações de cátions que podem compor as lamelas dos HDLs

	Al	Fe	Cr	Co	Mn	Ni	Sc	Ga	Ti
Mg	X	X	X				X		
Ni	X	X	X	X		X			
Zn	X		X						
Cu	X		X						
Co	X			X					X
Mn	X				X			X	
Fe	X	X							
Ca	X								
Li	X								

Adaptado de: Crepaldi e Valim (1998).

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, 2004); 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 BARROS 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. E desta forma, o HDL parece apresentar um equilíbrio favorável entre estabilidade química e biodegradabilidade (CUNHA et al., 2010).

Cunha et al. (2010) publicaram uma revisão que reúne trabalhos com espécies de interesse medicinal intercaladas em HDLs (sendo que em alguns deles, o HDL foi utilizado com sucesso na liberação controlada de fármacos), como diclofenaco, gemfibrozil, ibuprofeno, naproxeno, ácido 2-propilpentanoico, ácido 4-bifenilacético, ácido tolfenâmico em Li, Al HDL; ibuprofeno, ácido salicílico, ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido aspártico, indometacina, cetoprofeno, ácido tioprofênico, ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfônico, ácido

cítrico, ácido folínico, diclofenaco, fenbufeno, captotecina, naproxeno, ácido ferúlico, 5-fluorouracil, fenoximetilpenicilina, cordicepina (ou 3-Desoxiadenosina), ácido mefenâmico, gramicidina, anfotericina, ampicilina, curcumina, heparina, L-DOPA e metotrexato em Mg, Al HDL. Neste estudo são também relatadas intercalações 2-carboxilato-indol, tirosina, gramicidina, anfotericina, em Zn, Al HDL, entre outras. A maioria dos HDLs produzidos e utilizados na área farmacêutica apresentam em sua estrutura lamelar os cátions magnésio e alumínio (Mg, Al HDL) devido à baixa toxicidade, visto que Mg^{2+} e Al^{3+} são íons comuns ao organismo (CUNHA, 2010).

Zhang et al. (2006) intercalaram captopril em Mg, Al HDL e avaliaram sua liberação *in vitro* e propriedades térmicas. O sistema resultante apresentou estabilidade térmica e os estudos de liberação apontaram a possibilidade de distinção do mecanismo de liberação do ativo em diferentes valores de pH. Em pH 4,6 a liberação foi rápida, fato este atribuído à dissolução parcial da camada de HDL em soluções ácidas e, a seguir, com o aumento do pH, o processo de liberação tornou-se mais lento com a liberação de 66,7%, 85,1% e 94,2% em 1, 10 e 140 minutos, respectivamente.

Não há relato de intercalação de antimoniais em HDLs.

2.2.3 Revestimento de HDLs

A depender do propósito de utilização, a degradação estomacal não é requerida. Daí a necessidade de revestimento.

Segundo Remington (2004), o revestimento de formas farmacêuticas é um dos mais antigos processos farmacêuticos ainda existentes, sendo um importante passo no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas ou na otimização das existentes; visto que é uma técnica que promove uma liberação modificada do fármaco e pode evitar sua interação com o suco gástrico (ROCIO et al., 2012). O processo de revestimento ocorre pela adição de um material sobre a superfície externa de uma partícula sólida (ROLIM et al., 2009). Os polímeros são materiais muito utilizados com esta finalidade, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manipular e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos, assim possibilitando sua utilização em meio biológico (BARBANTI E ZAVAGLIA, 2005).

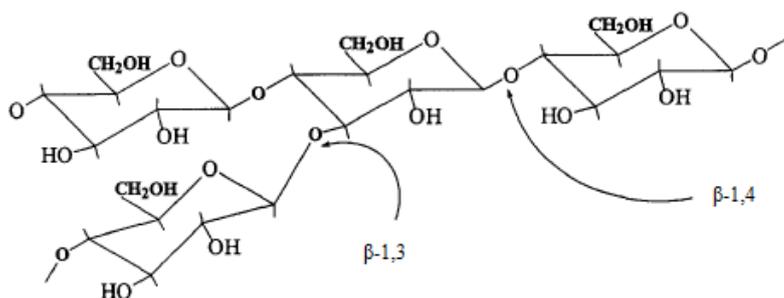
Li et al. (2004) realizaram a intercalação de fenbufeno em Mg, Al HDL, e, de posse da conhecida falta de resistência do mesmo frente ao pH estomacal, fez o recobrimento do seu sistema resultante com o polímero Eudragit® S 100 (ácido metacrílico e metil metacrilato). Como resultado, foi obtida a liberação sustentada do fenbufeno no intestino delgado, após passagem do sistema pelo trato gastrointestinal, como consequência do revestimento com o polímero.

O mesmo recurso foi utilizado na intercalação do enalaprilato em HDL, utilizando-se como material de revestimento a xiloglucana (RIBEIRO, 2008). Materiais naturais ou modificados, como os polissacarídeos, tais como amilase, pectina, goma guar e glicomanana, são extensamente investigados como matrizes para a entrega prolongada de medicamentos por via oral para o cólon (RAI et al., 2012).

2.2.3.1 Glicomanana

Amorphophallus konjac K. Koch é uma herbácea que cresce em montanhas ou em regiões montanhosas subtropicais, principalmente no Sudeste da Ásia, e tem sido utilizada na alimentação e medicina de chineses e japoneses há mais de 1000 anos (ZHANG et al., 2005). *Konjac glucomannan* (KGM), ou glicomanana, é um polissacarídeo natural abundante, que pode ser extraído a partir de tubérculos da *Amorphophallus konjac*. É constituído principalmente por unidades de D-manose e D-glicose através de ligações β -1,4 em uma razão molar de 1,6:1, com um baixo grau de grupos acetilo (LUO et al., 2013) (Figura 9). A glicomanana é capaz de formar uma estrutura de gel radicular, resultante das fortes interações das ligações de hidrogênio (LUO et al., 2013) em uma faixa de pH entre 11,3 e 12,6 (YOSHIMURA e NISHINARI, 1999).

Figura 9: Estrutura química da *Konjac glucomannan*



Fonte: DAVE et al., 1998.

É um polímero neutro que apresenta elevada viscosidade mesmo em baixas concentrações, excelente capacidade de espessamento e formação de gel (com processo de gelificação em uma faixa de pH 11,3 a 12,6), firmeza, degradação em meio biológico e estabilidade de armazenamento (CHAO et al., 2012). Portanto, é bastante aplicado na área farmacêutica em sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery*), para melhoramento de propriedades bioadesivas, terapias celulares e como material de enchimento para implantes de próteses (ZHANG et al., 2005).

2.2.4 Técnicas de revestimento

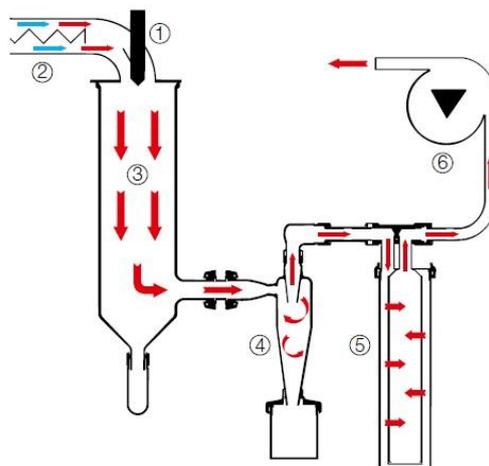
De acordo com Ramos (2006), são descritos diferentes métodos de revestimento: métodos mecânicos (suspensão no ar, centrifugação multiorifício, revestimento em turbinas e atomização com secagem ou *spray drying*), físico-químicos (evaporação do solvente, fusão-emulsificação e coacervação ou separação de fases) e químicos (policondensação interfacial, polimerização interfacial e gelificação).

2.2.4.1 *Spray drying*

Dentre as técnicas utilizadas para secagem por meio da pulverização, há destaque para esta pelo fato de ser assistida por aerossol e por produzir eficientemente o pó seco a partir de um líquido ou pasta. É um processo bastante versátil que é compatível com uma variedade de materiais. Partículas com elevado grau de pureza podem ser obtidas através deste processo de forma econômica, rápida e contínua. Este método pode produzir ainda partículas de forma esférica, evitando a formação de aglomerados, com tamanhos relativamente menores, sendo assim um método bastante útil para o processamento de materiais (SOUZA et al., 2010; NANDIYANTO e OKUYAMA, 2011).

Por esta técnica, as gotículas que são atomizadas a partir da solução inicial são introduzidas no evaporador (forno elétrico, chama ou secador de difusão). A evaporação do solvente, difusão do soluto, secagem e precipitação ocorrem no interior do equipamento até a obtenção do produto final em forma de pó (NANDIYANTO e OKUYAMA, 2011). A figura 10 ilustra um equipamento de *spray dryer* com atomizador pneumático.

Figura 10 – Esquema de um equipamento de *spray dryer* com atomizador pneumático. (1) Bico pneumático. (2) Aquecedor elétrico. (3) Câmara de secagem. (4) Ciclone e coletor. (5) Filtro. (6) Aspirador para geração do fluxo



Fonte: Modificado do Manual do fabricante. Mini *Spray dryer* B-290.

Sendo a atomização (*spray drying*) um método bem estabelecido para o preparo de biopolímeros de baixa umidade (BUREY et al., 2009), esta foi a técnica escolhida neste estudo.

Alguns estudos relatam a utilização da pulverização em *spray dryer* para o revestimento por filme e obtenção do produto seco, como por exemplo Petrovick (2006). Ele desenvolveu e avaliou o revestimento polimérico do granulado de *Achyrocline satureioides* seco por *spray drying* com redução da liberação dos compostos em pH 1,2 em 90 minutos após administração (cerca de 18 a 29%), assim representando a influência do filme de revestimento sobre o perfil de liberação dos flavonoides.

Além disso, Yang (2009) mostrou uma boa capacidade de encapsulação (ou revestimento) da glicomanana ao revestir pós por *spray drying*. Neste estudo, os pós revestidos com glicomanana apresentaram forma esférica e superfície homogênea (ausência de poros visíveis).

2.3 Técnicas de caracterização utilizadas

2.3.1 Difração de Raios X de Pós

A difração de raios X é uma maneira prática e conveniente para a obtenção de informações quali e quantitativas de compostos presentes em amostras sólidas (cristalinas), visto que cada composto cristalino possui um padrão único de difração de raios X (BRUGEMANN e GERNDT, 2004).

Para o estudo analítico de difração, a amostra cristalina é triturada até a obtenção de um pó fino e homogêneo, devido à necessidade da orientação dos pequenos cristais em todas as possíveis direções. Dessa forma, quando um feixe de raios X passa através da amostra (sólido), um número significativo de partículas é orientado de forma que preencha as condições de Bragg para a reflexão de cada espaço interplanar possível. A amostra é então, colocada em um porta-amostras de vidro fosco dotado de uma depressão/cavidade que a acomoda (HOLLER et al., 2009).

A identificação de uma espécie a partir do padrão de difração de pó é feita com base na posição das linhas e em suas intensidades relativas. A interpretação do gráfico obtido (difratograma) consiste em identificar os índices de Miller dos planos correspondentes a cada valor de d (distância basal) obtido, sendo o ângulo de difração (2θ) determinado pelo espaçamento entre um conjunto particular de planos. Através da equação de Bragg ($n\lambda=2.d.\text{sen}\theta$), d é calculada a partir do comprimento de onda conhecido da fonte e do ângulo medido. Tais linhas de intensidade variam de acordo com o número e o tipo dos centros atômicos de reflexão em cada conjunto de planos (HOLLER et al., 2009; BRUGEMANN e GERNDT, 2004). Para os HDLs, a distância d_{003} é chamada distância interlamelar ou distância interplanar basal, que é também o parâmetro utilizado para classificar as diferentes argilas (NEUMANN et al., 2000).

Esta técnica apresenta como vantagens a simplicidade, rapidez e confiabilidade do método, visto que cada sólido cristalino possui um perfil de difração característico (ALBERS et al., 2002).

2.3.2 Termogravimetria

A termogravimetria, ou TGA (*Thermogravimetric Analysis*), baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do

tempo ou da temperatura. Pode então, ser definida como um processo contínuo que mede a variação de massa de uma substância ou material como uma função de temperatura e/ou tempo (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

Nesta técnica, a massa de uma amostra é submetida a uma atmosfera controlada e é registrada de forma contínua em função da temperatura ou do tempo à medida que a temperatura desta amostra é aumentada (de forma linear ao tempo). A TGA monitora a massa do analito em função da temperatura, porém não é capaz de identificar as espécies responsáveis. Esta também é limitada às reações de decomposição e oxidação e aos processos físicos (vaporização, sublimação). Entre as aplicações mais importantes estão as análises de composição e os perfis de decomposição de sistemas multicomponentes (HOLLER, 2009).

O gráfico gerado por esta análise é denominado termograma, curva de decomposição térmica, curva termólise, curva pirólise ou curva de análise termogravimétrica (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009; HOLLER, 2009). Tal curva proporciona informação sobre estabilidade térmica e composição da amostra original, estabilidade térmica e composição de algum composto intermediário que pode ter sido formado; e ainda, dados à respeito da decomposição de resíduos, quando houver.

É uma técnica bastante utilizada na caracterização do perfil de degradação de uma gama de materiais, onde a temperatura elevada pode, em alguns casos, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (MOTHÉ e AZEVEDO, 2009).

2.3.3 Espectrometria no Infravermelho

Esta análise é fundamentada na medida de energia absorvida pela vibração de cada uma das ligações químicas presentes nos materiais analisados. Através desta medida de energia absorvida pela ligação química, são caracterizados os materiais sintetizados, determinando e identificando os principais grupos funcionais existentes em suas moléculas (BOTTAN et al., 2011).

A região espectral do infravermelho (IR, do inglês *infrared*) compreende a radiação com número de onda que varia de cerca de 12.800 a 10 cm⁻¹. Usualmente, o espectro IR é subdividido em três regiões: IR-próximo, IR-médio e IR-distante, de acordo com o tipo de aplicação de instrumentação (HOLLER et al., 2009).

Estão atualmente disponíveis três tipos de instrumentos para medidas de absorção no IR: (1) espectrofotômetros dispersivos, que utilizam monocromador baseado em rede de difração; (2) espectrômetros com transformada de Fourier, que empregam um interferômetro e (3) fotômetros não-dispersos, que empregam um filtro ou um gás absorvente (HOLLER et al., 2009).

Pelo fato de apresentar maior rapidez, confiabilidade, vantajosa razão sinal/ruído e conveniência, os espectrômetros com transformada de Fourier vêm sendo mais utilizados em análises em comparação com os demais tipos (HOLLER et al., 2009).

O FTIR-ATR (Infravermelho com transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada) é uma técnica que tem sido utilizada extensivamente com o objetivo de investigar reações de adsorção em superfícies e interfaces. Pelo fato de ser uma técnica bastante simples, quando comparada com fluorescência, radiomarcção e detecção eletroquímica, possui aplicações potenciais na área biológica e elevado grau de sensibilidade (LIAO et al., 2006).

Na caracterização de nanocompósitos, é importante a observação de deslocamentos e/ou alterações nas principais bandas de absorção em relação aos materiais de partida. Como a escala destas análises é em torno de micras, os dados a serem gerados condizem com a macroestrutura do material compósito (BOTTAN et al., 2011).

2.3.4 Espectroscopia Raman

Segundo Holler et al. (2009), embora existam consideráveis similaridades entre os espectros Raman e os espectros no Infravermelho (IR), existem diferenças entre os tipos de grupos que são ativos no IR e ativos no Raman, o que os tornam técnicas complementares, ao invés de competitivas.

A espectroscopia Raman é utilizada quali e quantitativamente para determinar a composição molecular de amostras sólidas, líquidas e gasosas (TU e CHANG, 2012). Apresenta como vantagem em relação à técnica de Infravermelho, o fato de a água ser um

solvente bastante utilizado, se apresenta como um pobre dispersor, e desta forma, os alongamentos hidroxilo das unidades M-OH podem ser observados (LIN et al., 2006). Além disso, os sinais são geralmente nas regiões visível ou IR-próximo, podem ser utilizadas células de vidro ou quartzo, evitando o inconveniente de manipular janelas de cloreto de sódio ou outro material atmosféricamente instável (HOLLER et al., 2009; TU e CHANG, 2012; SMITH e CLARK, 2004).

No caso deste estudo, a espectroscopia Raman mostra-se relevante por tratar de uma investigação a base de um material inorgânico. Sistemas inorgânicos possuem energias de vibração de ligações metal-ligante na faixa de 100 a 700 cm^{-1} , uma região do IR que é experimentalmente difícil de estudar (HOLLER et al., 2009).

Os estudos Raman são também fontes de informações potencialmente úteis com relação à estrutura, composição e estabilidade de compostos de coordenação (SMITH e CLARK, 2004; TU e CHANG, 2012).

2.3.5 Microscopia

Segundo Holler et al. (2009), uma grande variedade de métodos foi desenvolvida para a caracterização de superfícies durante o último século. Os métodos clássicos, que ainda são importantes, fornecem muitas informações úteis sobre a natureza física das superfícies, porém poucas sobre a natureza química. Estes métodos envolvem também a obtenção de imagens de microscopia óptica e eletrônica de superfícies.

A microscopia óptica é considerada o método clássico para a obtenção de informações detalhadas no que diz respeito à natureza física de superfícies. Entretanto, a resolução da microscopia óptica é limitada ao comprimento da luz de forma aproximada, devido a efeitos de difração. A microscopia eletrônica é um método que fornece informações com resolução muito superior à microscopia óptica, sendo os principais, a de varredura e a de transmissão (HOLLER et al., 2009).

2.3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um dos instrumentos mais versáteis atualmente disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas, devido à utilização de um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional (NAGATANI et al. 1987; DEDAVID et al, 2007).

Outra característica importante da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, em particular, para o desenvolvimento de novos materiais, que tem exigido um número de informações bastante detalhado das características microestruturais (DEDAVID et al., 2007).

De acordo com Maliska (2013), o filamento de tungstênio vem sendo a fonte mais utilizada nos últimos 50 anos pela maioria dos microscópios eletrônicos, apesar da existência de outras fontes emissoras; como o Hexaboreto de Lantâneo (LaB6), o *Field Emission Gun* (FEG), que apresenta fonte de elétrons de emissão por campo. Este apresenta brilho mais intenso e é utilizado para imagens de alta resolução, alta corrente e baixo ruído (SHIMADZU, 2014).

2.3.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

No microscópio eletrônico de transmissão, forma-se uma imagem bidimensional do interior desta sobre uma tela, pela passagem de um o feixe de elétrons através de cortes extremamente finos da amostra. A imagem é formada diretamente a partir da impressão do feixe de elétrons na tela de observação, após a passagem pela amostra (MELO, 2002). Tais elétrons transmitidos sofrem espalhamento elástico (espalhamento de Rutherford) sendo, então, os responsáveis pela formação da imagem dos Microscópios Eletrônicos de Transmissão (DEDAVID et al., 2007).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permite a visualização direta de imagens com alta resolução, formando imagens em nível atômico; auxiliando na observação detalhada da morfologia das partículas e da estrutura cristalina. Na prática, o intervalo de aumentos deste microscópio varia de 1.000 a cerca de 200.000 vezes (GALLETI, 2003).

Embora os métodos de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão possuam bastante similaridade, a MEV fornece imagens de morfologia externa, similar àquelas vistas pelo olho humano; já a MET investiga a estrutura interna de sólidos e fornece informações sobre detalhes microestruturais que não são habituais (HOLLER et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver produto intermediário antimônio – Mg, Al Hidróxidos Duplos Lamelares na forma de pó para terapia oral, com finalidade leishmanicida.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparar Mg, Al – HDL;
 - Caracterizar o produto sintetizado;
- Realizar ensaios biológicos com o HDL precursor;
 - Avaliar citotoxicidade e endocitose;
- Preparar intercalados antimônio – HDL;
 - Investigar a técnica mais eficiente;
 - Caracterizar a formação dos produtos obtidos;
- Revestir a formulação eleita com o polímero glicomanana;
 - Caracterizar o produto revestido (MEV).

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

Cloreto de alumínio hexahidratado e cloreto de magnésio, utilizados no preparo do HDL foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA). O fármaco, tartarato de antimônio e potássio, e o vermelho de bromopirogalol, utilizado para a curva de calibração, foram adquiridos da Vetec/Sigma-Aldrich Co. (Rio de Janeiro, Brasil); a glicomanana foi adquirida da farmácia de manipulação Ao Farmacêutico.

4.2 Preparo do HDL precursor

O Mg, Al HDL precursor foi preparado por via direta pelo método de co-precipitação. Uma solução composta de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ em uma proporção m/m de Mg/Al igual a 2:1 foi preparada em água deionizada sob agitação constante em placa agitadora, à temperatura ambiente, e o pH ajustado para 10, formando então um precipitado branco. O produto foi mantido em repouso a temperatura ambiente por um período de 24 horas, e a seguir, foi lavado 6 (seis) vezes com água deionizada através do processo de centrifugação (3.000 rpm/5 minutos, cada lavagem) e depois levado para secagem em estufa a 60° C por 24 horas, para posterior caracterização do pó resultante (HONGO et al, 2011).

4.3 Preparo dos sistemas binários HDL-Antimonial

As reações de troca aniônica foram conduzidas em solução utilizando água deionizada e o pH ajustado para 9 com auxílio de NaOH 1M. Foram preparadas amostras, onde foram avaliadas como variáveis: proporção m/m fármaco-HDL, de 1:3 (Formulação 1 – F1) ou 3:1 (Formulação 2 – F2) e tempo reacional, de 96, 72, 48, 24 ou 2 horas. Após respectivos períodos de agitação em placa agitadora (Biovera[®], Rio de Janeiro, Brasil) a temperatura ambiente, os produtos foram centrifugados, lavados 4 (quatro) vezes com água deionizada (4.000 rpm/30 minutos, cada ciclo), secos em dessecador e reservados para posterior caracterização.

4.4 Revestimento dos nanocompósitos

Foram avaliadas duas condições: a primeira dispunha de 0,6 g de F1 e 1,2 g de glicomanana em 150 mL de água Milli-Q; e a segunda, 0,6 g de F1 e 1,3 g do mesmo polímero em 300 mL de água Milli-Q. Ambas as condições avaliadas foram submetidas a agitação constante (120 rpm) por 1 hora. A seguir, em separado, foram submetidas ao processo de secagem por atomização em *spray dryer*, com os seguintes parâmetros: temperatura de entrada com avaliação de variação a 170 ou a 200° C, temperatura de saída variando de 75 a 85° C, bomba (alimentação) 33% e aspirador 85%.

4.5 Ensaios biológicos com o HDL precursor

4.5.1 Isolamento de macrófagos peritoneiais e cultura celular

Os ensaios foram realizados utilizando camundongos da linhagem Swiss, com 6-8 semanas de idade, pesando 20-25 g. Os animais foram mantidos de acordo com a Comissão de Ética Internacional para a manipulação de animais (Zimmerman, 1983) e o ensaio foi aprovado pelo comitê de ética para manipulação de animais da Universidade Federal de Alagoas, Brasil. Foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento e a quantidade de animais utilizados.

Para obter os macrófagos camundongos foram estimulados (elicitados) com 1 mL de meio tioglicolato (3%) por injeção intraperitoneal. Após 72h os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com salina tampão fosfato (PBS) gelado para retirada dos macrófagos peritoneais. Foi tomado cuidado para não causar hemorragia interna durante a coleta de macrófagos nos exsudatos.

As células foram mantidas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor, L-glutamina (2 mM), aminoácidos não-essenciais (0,1 mM) e gentamicina (50 ug/mL) durante 24 horas a 37 °C com 5 % de CO₂. As células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS gelado, de modo que apenas os macrófagos aderentes permaneceram nas garrafas de cultura. Estas células obtidas foram usadas para executar os protocolos experimentais de citotoxicidade e endocitose descritos a seguir (Davies e Gordon, 2004).

4.5.2 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade do Mg,Al - HDL em relação a células foi determinada utilizando o método bioquímico de MTT em macrófagos murinos peritoneais, com base no protocolo descrito pela primeira vez por Mossmann (1983).

As células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min, ressuspensas em meio DMEM, contadas utilizando um hemocítmetro e diluídas. O número de células desejado (2×10^5 célula/poço) foi colocado em placa de cultura de 96 poços e foram incubadas durante 2h a 37 °C com 5 % de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com Mg, Al -HDL (10 , 30 e 100 uM) e incubadas novamente por 48 h. Após este tempo, o meio em contato com as células foi substituído por 100 µL de MTT (0,5 mg /mL) e as células foram novamente incubadas por 4h. Nos poços de controle de morte celular as células foram lisadas com 1% Triton X – 100, 1h antes da adição do MTT.

DMSO (dimetilsulfóxido) foi então adicionado às células, com o objetivo de dissolver os cristais de formazan (formados pela conversão do MTT pelas mitocôndrias das células viáveis), antes de ser analisado por um leitor de placas (ELISA) na faixa de 530 nm de absorvância. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a viabilidade celular percentual foi expressa como absorvância em relação às células tratadas apenas com o meio (controle).

4.5.3 Ensaio de endocitose

Para este ensaio, macrófagos peritoneais na concentração de 1×10^6 foram deixados em lamínulas de vidro dispostas em placas de 24 poços em DMEM, para que pudessem se aderir a estas, à 37 °C com 5% de CO₂ por 1h.

Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi descartado e o Mg,Al - HDL foi adicionando nas seguintes concentrações: 10 , 30 e 100 µM . Após 24 h de incubação, tempo suficiente para permitir a endocitose, as partículas de Mg,Al-HDL não endocitadas foram removidas por lavagem dos poços com PBS estéril.

Logo em seguida, as lamínulas foram fixadas com metanol, coradas com May-Grunwald/Giemsa e o índice de endocitose (IE) foi determinado da seguinte forma: 100 células/lamínula foram observadas em microscópio óptico e o número de partículas Mg,Al-HDL endocitada/macrófago foi contado. O IE foi calculado pela fórmula: IE = (número de

macrófagos que ingeriu pelo menos uma partícula de Mg,Al-HDL) / (média do número de partículas de Mg, Al- HDL ingerida por macrófagos) ÷ 100 (Fadok et al, 1998). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Caracterização

4.6.1 Caracterização do HDL precursor

Os difratogramas foram obtidos de um difratômetro DRX 3000 Shimadzu (Kyoto, Japão) com uma fonte de Cu a 25°C no Laboratório de Síntese de Catalisadores (LSCat/UFAL). 0,1g da amostra foi colocada no porta-amostras e analisados com as seguintes condições: 30 kV, 30 mA CuK_α ($\lambda = 0,15406$ nm). As amostras na forma de pó foram analisadas em intervalos de 0,02° (2 θ) na faixa de 0 a 40°.

Os termogramas foram obtidos em equipamento Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo DTG-60 com uma taxa de aquecimento de 20°C/min onde cada amostra correu em uma taxa de temperatura de 20°C/min, de 25° a 800°C e comparada aos perfis de perda observados para os materiais de partida sob as mesmas condições de análise.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrômetro Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo SSU-8000 e os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro Renishaw (Gloucestershire, Reino Unido), por meio de um laser Hene e um comprimento de onda de 775 nm.

A termogravimetria, a espectroscopia do infravermelho e a espectroscopia Raman foram realizadas no Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCAR/UFAL).

As micrografias de MEV foram obtidas de microscópios: Shimadzu (Kyoto, Japão) modelo SSX-550 Superscan; Hitachi TM 3000 e JEOL T-200. As análises foram realizadas nos laboratórios Optma (UFAL), Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-PE), respectivamente. Para o MET, foi utilizado um microscópio Jeol, 100 CX II, com dispersão prévia em etanol. Estas análises foram realizadas Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.6.2 Caracterização dos nanocompósitos

As análises de termogravimetria, espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia Raman, MEV e MET foram realizadas de forma semelhante à caracterização do HDL precursor, já descritas no item anterior.

Nas análises de DRX as amostras na forma de pó foram analisadas em intervalos de $0,02^\circ$ (2θ) em faixas variáveis, a depender do objetivo das análises.

Para a quantificação de Sb presente nas amostras, foram realizados dois ensaios.

A princípio, foi realizada a quantificação por UV-Vis (cálculo de intercalação/absorção) em espectrofotômetro Shimadzu (Kyoto, Japão) UV mini-1420 (Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias – LAFA/UFAL) com leitura no comprimento de onda 560 nm através de uma alíquota do sobrenadante resultante do processo de intercalação do Sb em HDL, com base na reação do Sb^{3+} com o vermelho de bromopirogalol (BPR) na proporção de 1:1 em solução neutra (RATH et al., 2003). Para isto, foi preparada anteriormente uma curva de calibração a partir de uma solução-mãe de $2,5 \times 10^{-6}$ M em água deionizada com branco contendo 20 mL de tampão fosfato 0,1 M, 2 mL de tartarato de sódio e potássio e 10 mL de vermelho de bromopirogalol.

Com base na metodologia da Farmacopeia Britânica (2007), foi realizada a Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES) para a quantificação de antimônio provavelmente contido nos sistemas binários obtidos, através da 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 1 mg), produto final resultante da intercalação. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni (GraphPad PRISM, GraphPad Software, Inc., San Diego).

Para confirmar a valência do antimônio intercalado, visto que este apresenta mais de um estado de oxidação, os produtos de sistemas binários foram expostos posteriormente a um ataque ácido na presença de HCl, durante 2 horas visando a degradação do HDL (RODRIGUES, 2007) e a liberação do composto de intercalação. Em seguida, o pH foi

neutralizado, uma alíquota foi recolhida e foi realizada a análise em espectrofotômetro UV-Vis com objetivo de confirmar a valência do antimônio (RATH et al., 2003).

4.6.3 Caracterização dos nanocompósitos revestidos

A análise de MEV foi realizada conforme descrito no item 4.4. Foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do HDL precursor

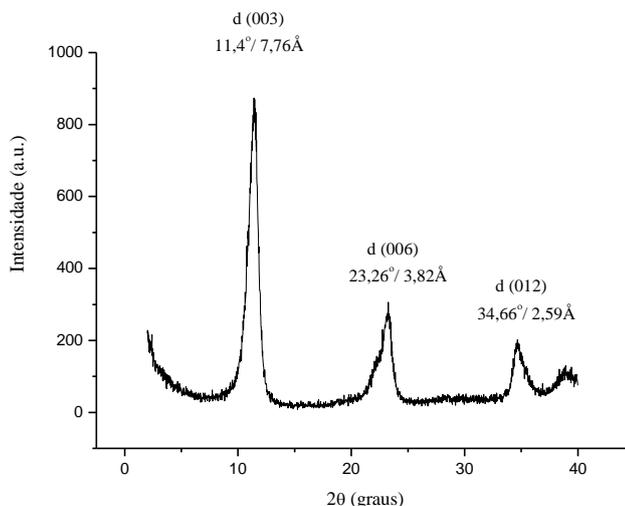
Vários lotes do HDL precursor foram sintetizados e caracterizados. Conforme resultados apresentados a seguir, as técnicas de caracterização confirmaram o sucesso da síntese e a robustez da metodologia.

5.2 Caracterização do HDL precursor

5.2.1 Difração de Raios X

O HDL precursor apresentou um espaçamento basal d_{003} de $7,76\text{Å}$, o que corrobora os valores calculados a partir dos planos encontrados nos manuais mineralógicos, quando o cloreto é o ânion interlamelar ($7,6\text{--}7,8\text{Å}$) (Figura 11) (ALLMANN & JEPSSEN, 1969; CAVANI, 1991; BOTAN et al., 2011), podendo variar de acordo com o grau de hidratação (DEL ARCO, 2007).

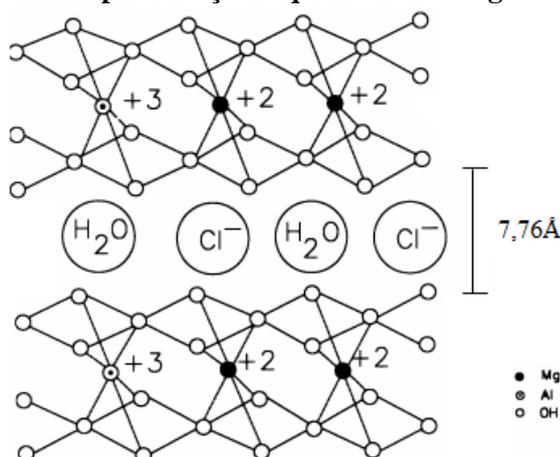
Figura 11 – Difratoograma do HDL precursor



Fonte: Menezes et al., 2013.

Este valor (7,76Å) corresponde à soma do diâmetro do íon cloreto e da lamela da brucita (4,8Å), como esquematizado na Figura 12. Além disso, os planos de difração em d(003), d(006) e d(012) sugerem que tais estruturas possuem simetria romboédrica, característica de hidrotalcitas sintetizadas, pertencendo ao grupo espacial 3R e os parâmetros das células unitárias a e c ($a=2d$ e $c=3d$) foram satisfeitos (RODRIGUES, 2007; XU e BRATERMAN, 2010).

Figura 12 – Representação esquemática do Mg-Al-Cl HDL

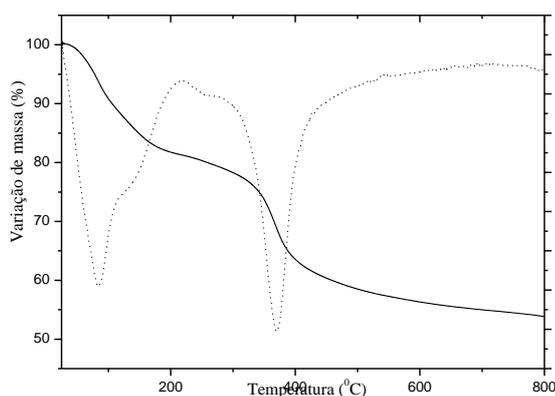


Fonte: CHOUDARY et al., 2002 (adaptado).

5.2.2 Termogravimetria

O termograma obtido está apresentado na figura 13. 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).

Figura 13 – Termograma do HDL precursor (linha contínua), acompanhado de sua derivada (linha pontilhada)



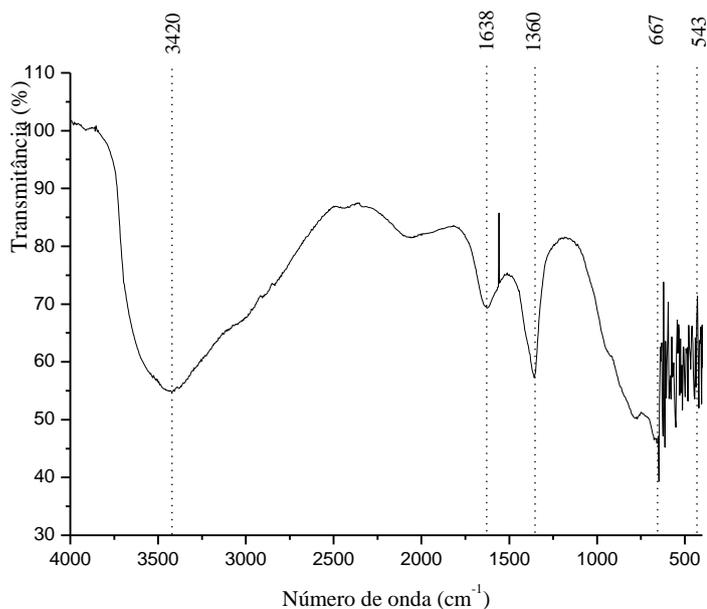
Fonte: Menezes et al., 2013.

5.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro do Mg, Al HDL precursor é apresentado na figura 14. Foram verificados os seguintes sinais: banda larga em torno de 3420 cm^{-1} característico de estiramento (νOH) 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 1638 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 1962; CHOUDARY et al., 2002; ISLAM e PATEL, 2009); banda em 1360 cm^{-1} que ocorre muito provavelmente devido ao ânion carbonato [$\nu(\text{CO}_3^{2-})$] que pode ter se formado devido à absorção de gás CO_2 atmosférico durante a lavagem (ISLAM e PATEL, 2009; XU et al., 2006; SUN e HU, 2011). Na região de $667\text{ a }543\text{ cm}^{-1}$ são observadas bandas de vibrações referentes aos M–O ou O–

M–O caracterizando as ligações entre os cátions e oxigênio (BOTTAN, 2011; KLOPROGGE et al., 1999a).

Figura 14 – Espectro FT-IR do Mg, Al HDL precursor

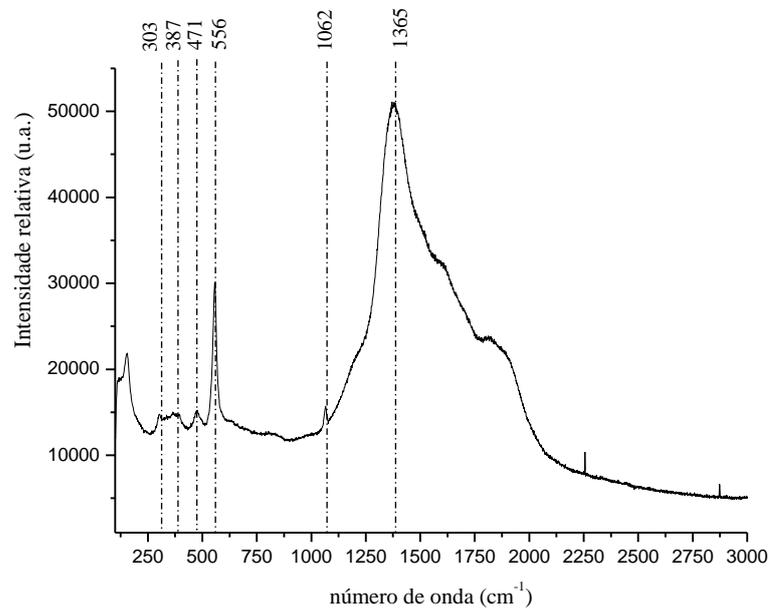


Fonte: Menezes et al., 2013.

5.2.4 Espectroscopia Raman

A figura 15 apresenta o espectro Raman do HDL precursor. Observaram-se na região de baixa frequência dois sinais em 303 cm^{-1} e 387 cm^{-1} e outros dois a 471 cm^{-1} e 556 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, $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ aparece em 1.062 cm^{-1} ; e o último pico, indica a presença da formação de óxidos (KLOPROGGE et al., 2002).

Figura 15 – Espectro Raman do HDL precursor

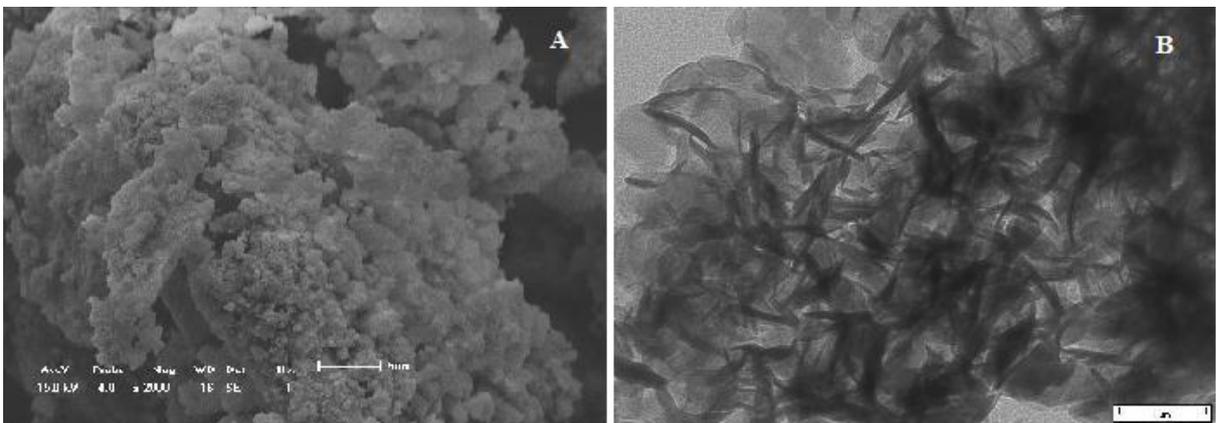


Fonte: Menezes et al., 2013.

5.2.5 Microscopia Eletrônica

A micrografia adquirida por elétrons secundários apresentada na figura 16A foi analisada em um aumento de 2000x e revelou agregados de partículas finas, semelhantes às descritas por Islam e Patel (2009) e por Donato et al. (2012). Por esta técnica torna-se possível a visualização de milhares de lamelas do HDL como nanocristalitos em cada agregado.

Figura 16 – Estrutura e morfologia das formulações obtidas nas análises de MEV e de MET. Onde, (A) MEV de HDL em um aumento de 2000x, (B) MET de HDL em um aumento de 50000x



Fonte: Menezes et al., 2013.

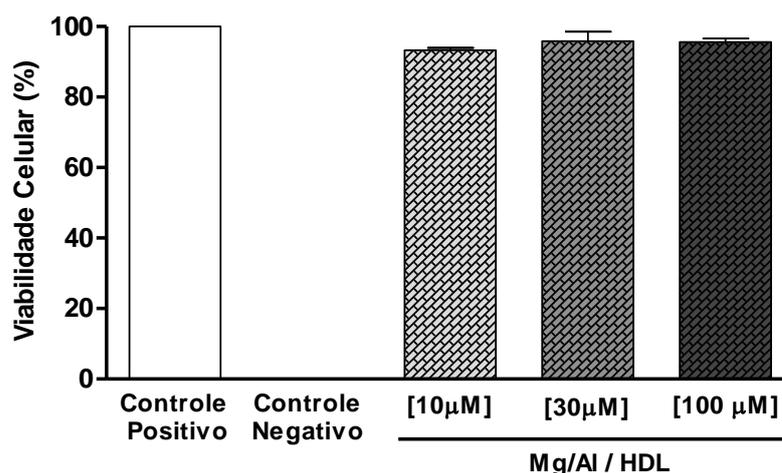
A micrografia obtida por MET ilustrada na figura 16B representa a morfologia dos HDLs, com a presença de numerosas lamelas primárias de HDL (XU et al., 2006). De acordo com Costa et al. (2005), as regiões mais escuras devem-se às dimensões muito finas destes segmentos de partículas isoladas.

5.3 Ensaios biológicos

5.3.1 Ensaio de citotoxicidade

É de grande importância que o carreador seja inerte, ou seja, não apresente toxicidade celular, às células alvo. Alguns estudos mostram além de baixa toxicidade, algumas propriedades como boa compatibilidade, alta capacidade carreadora de drogas, entrega-alvo, controle de liberação de drogas dos HDLs em vários tipos de células (XU et al., 2008). Os ensaios de MTT (Figura 17) com macrófagos peritoneais mostram que não houve influência significativa após o tratamento celular com os Mg, Al-HDL por um período de 24 horas nas concentrações utilizadas.

Figura 17 – Efeito dos HDLs em macrófagos peritoneais e viabilidade celular determinada por ensaio MTT



Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de amostras em triplicata, as diferenças significativas entre os grupos são avaliadas por análise de variância ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Colunas: controle positivo (células vivas) e controle negativo (células lisadas).

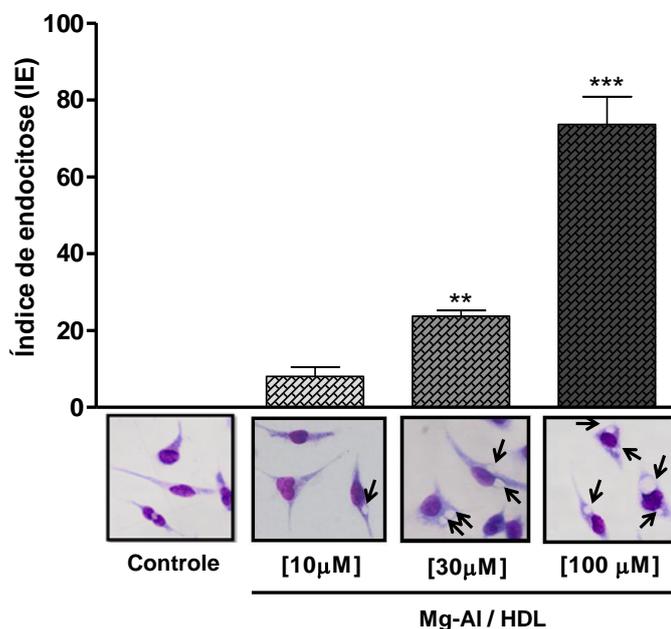
Fonte: Menezes et al., 2013.

5.3.2 Ensaio de endocitose

Além da baixa toxicidade apresentada por estes nanomateriais, o que é um recurso de grande utilidade, eles possuem uma estrutura carregada positivamente, assim permitindo interações eletrostáticas com a membrana celular, facilitando, desta forma, o mecanismo de captação celular por fusão e/ou endocitose (Delgado et al., 2004).

Tais estudos mostram a capacidade que essas nanopartículas têm de interagir rapidamente com as membranas celulares devido ao potencial zeta positivo e as superfícies celulares carregadas negativamente e, logo em seguida, a endocitose celular. Neste presente estudo, foram obtidos resultados semelhantes. Após 24 horas de incubação, os Mg, Al-HDLs foram endocitados pelos macrófagos. A Figura 18 mostra um índice de endocitose significativo nas concentrações de 30 μM ($23,8 \pm 1,4$) e 100 μM ($73,65 \pm 7,3$).

Figura 18 – Concentração-dependente de endocitose de HDL em macrófagos peritoneais viáveis



Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão das amostras em triplicata. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e o controle (considerado como 0% de endocitose), avaliados através da análise de variância ANOVA One-way seguido pelo teste de Dunnett. As imagens mostram macrófagos após o tratamento com Mg,Al-HDLs. O grupo controle representa macrófagos sem tratamento.

Fonte: Menezes et al., 2013.

Sabendo-se que o pH local dentro dos compartimentos endossomais e lisossomais deve ser baixo e o mecanismo de liberação de substâncias a partir de HDL ocorre por solubilização das lamelas de HDL estimulada pela diminuição do pH (Cunha et al., 2010), é possível prever que o Mg,Al-LDH pode ser um carreador promissor de drogas que tenham ação sobre parasitos intracelulares.

5.4 Caracterização dos sistemas binários HDL-Sb

5.4.1 Espectrofotometria UV-Vis: quantificação indireta de Sb

A curva de calibração (Apêndice 1) do tartarato de antimônio e potássio apresentou-se linear ($r > 0,98$) e foi obtida com concentrações entre 5 e $12,5 \times 10^{-6}$ M, de acordo com a metodologia previamente descrita por Rath et al. (1997), onde, à medida que a concentração de Sb^{3+} aumenta, a capacidade de absorção diminui. Isto ocorre devido à reação do antimônio na forma trivalente com o cromóforo (BPR), cuja absorção máxima ocorre em 560nm, reduzindo sua absorbância proporcionalmente.

Os rendimentos, em todas as condições avaliadas, foram superiores a 98,25%. Tendo como base o cálculo teórico da quantidade de Sb na estrutura do fármaco e a quantidade utilizada no preparo de cada formulação, estes valores são inexecutáveis. Caso o fármaco (tartarato de antimônio e potássio) estivesse completamente entre as lamelas do HDL, deveriam ser quantificados cerca de 9% em F1 e 14% em F2. Como a quantidade de Sb encontrada foi bastante superior em ambos os casos, é possível afirmar que a substância associada à argila lamelar não pode ser o tartarato de antimônio e potássio, o fármaco utilizado no preparo; mas provavelmente outro ânion.

Desta forma, houve a necessidade de quantificação direta de Sb nas formulações. Isto foi feito por ICP-AES (FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2007).

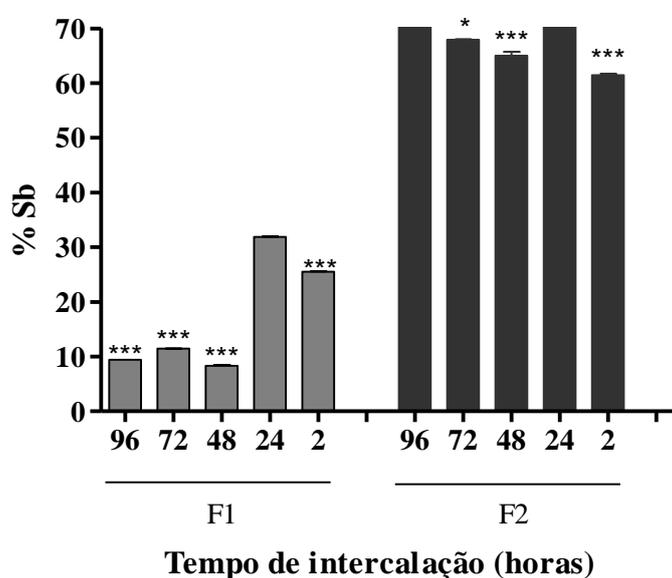
5.4.2 Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES): quantificação direta de Sb

Os valores percentuais do semimetal presentes nas formulações F1 e F2 são apresentadas na figura 19. O resultado ratifica a espectrofotometria UV-Vis, assim sugerindo

a intercalação de outro ânion. É importante ressaltar que, embora na forma de outro ânion, o Sb, responsável pela ação leishmanicida, estava presente.

Em relação à escolha do melhor tempo reacional para a obtenção dos produtos, foi adotado o tempo de síntese de 24 horas em ambas as formulações porque a intercalação de uma quantidade máxima de Sb foi conseguida, sem diferenças significativas nas sínteses obtidas após este período.

Figura 19 – Quantidade de antimônio (%) encontrada em F1 e F2 determinada por ICP-AES em diferentes tempos reacionais



Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) quando comparado o maior rendimento (24 horas) com os demais, determinado por ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla, Teste de Bonferroni.

Fonte: Menezes et al., 2013.

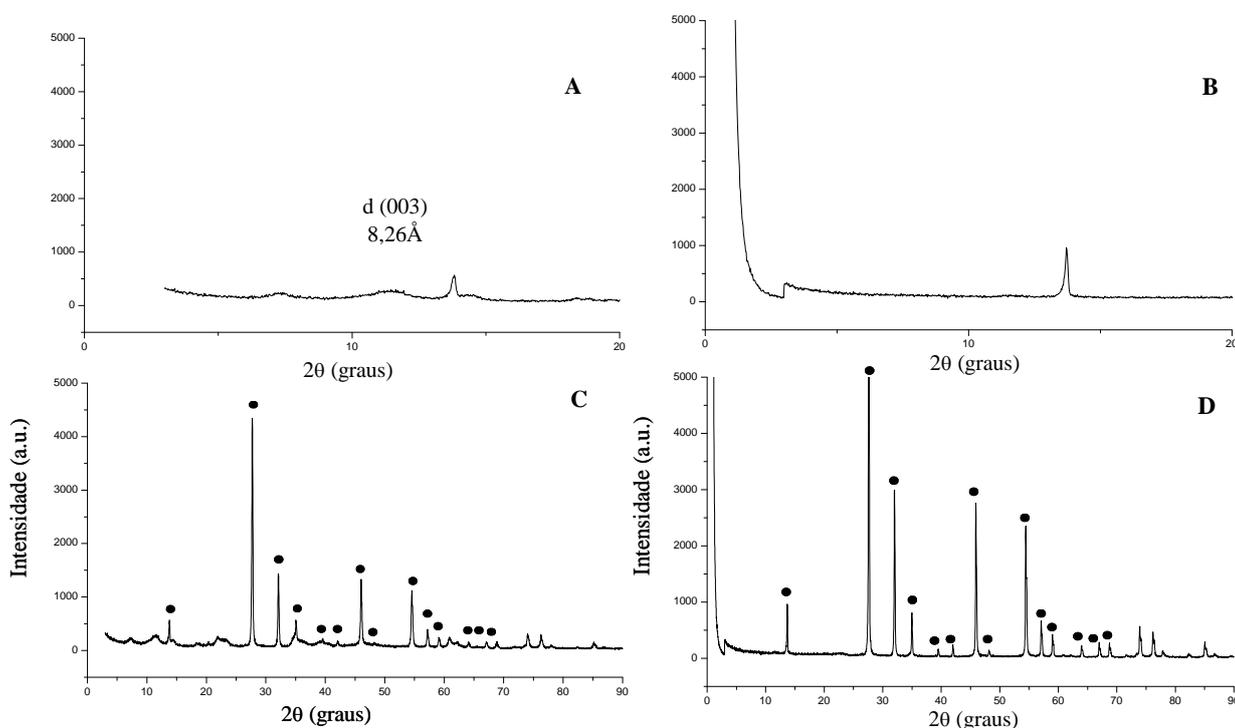
5.4.3 Espectrofotometria UV-Vis: especiação do Sb

O método confirmou a manutenção da valência +3 do antimônio em F1 e F2. A especiação de antimônio mostra-se fundamental, visto que a toxicidade e o comportamento biológico são dependentes do estado de oxidação, sendo a forma trivalente atribuída como a responsável pela ação leishmanicida, mas também pela elevada toxicidade dos fármacos antimonialis (GOODWIN E PAGE, 1943; MIEKELEY et al., 2002; DESSUY, 2011).

5.4.4 Difração de Raios X

Os difratogramas de F1 e de F2 são mostrados na figura 20, confirmando a obtenção de produtos distintos. Em F1 ocorre um tímido deslocamento de d_{003} para ângulos mais baixos (Figura 20A). Visto que o tamanho da lamela da brucita é de $4,8\text{\AA}$ (CHOUDARY et al., 2002), a diferença resultante do aumento do espaçamento ($3,46\text{\AA}$) reflete o tamanho do ânion intercalado. O ânion correspondente ao tartarato ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{2-}$) possui um tamanho muito maior do que o cloreto, o que não corresponde ao valor obtido a partir do aumento do espaçamento basal; porém o produto F1 confirmou o processo de intercalação e a presença de uma espécie de hóspede no espaço interlamelar. Ainda na figura 20B é visível o desaparecimento de d_{003} quando observamos os ângulos 2θ inferiores, caracterizando a esfoliação das lamelas do HDL. Quando completamente esfoliadas, os picos de difração de raios X da argila desaparecem, pois a forma cristalográfica é perdida.

Figura 20 – Espectros DRX. A) e C) F1; B) e D) F2



(•) corresponde aos planos cristalinos coincidentes para Sb_2O_3 , de acordo com a literatura

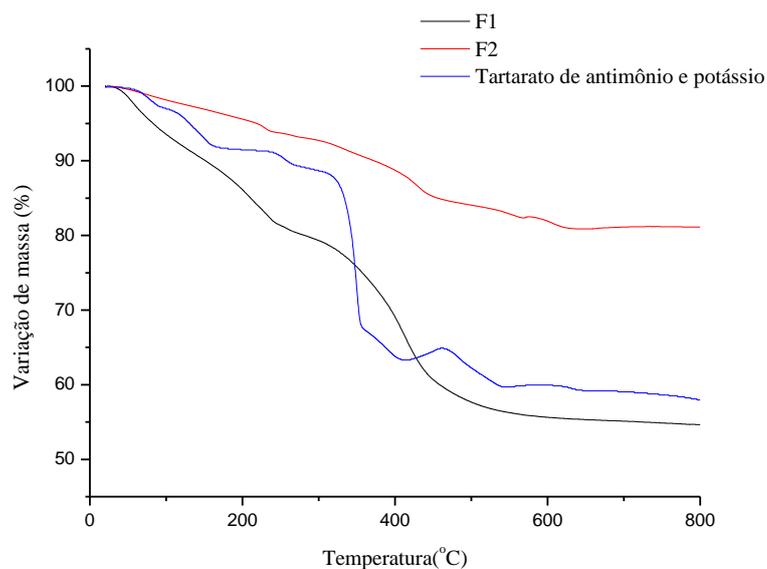
Fonte: Menezes et al., 2013.

No entanto, um novo plano cristalino em aproximadamente 13,7° pode ser notado em ambas as formulações. Considerando que o tartarato de potássio e antimônio é formado pela reação de óxido de antimônio e ácido tartárico (KNAPP, 1839) e os produtos contêm Sb^{3+} (valência confirmada por espectrofotometria UV-Vis), os óxidos de antimônio foram investigados, e, entre eles, o novo plano era coincidente com o plano d_{111} de Sb_2O_3 de simetria octaédrica em ambas as formulações. A confirmação deste ânion por DRX tornou-se possível quando estendemos os valores de 2θ até 90° (MA et al. 2004). As figuras 20C e 20D ilustram os planos coincidentes (KNAPP, 1839; MA et al., 2004; VALIDŽIĆ et al., 2013).

5.4.5 Termogravimetria

Os comportamentos térmicos do fármaco e das formulações são apresentados na figura 21. O fármaco puro (tartarato de antimônio III e potássio) mostrou um mecanismo de degradação complexo. Já F1 e F2 resultaram de uma alteração do processo de degradação térmica do HDL, com o acréscimo de mais etapas de degradação, porém diferentes ao termograma obtido para o fármaco puro.

Figura 21 – Termogramas de F1, F2 e do fármaco puro

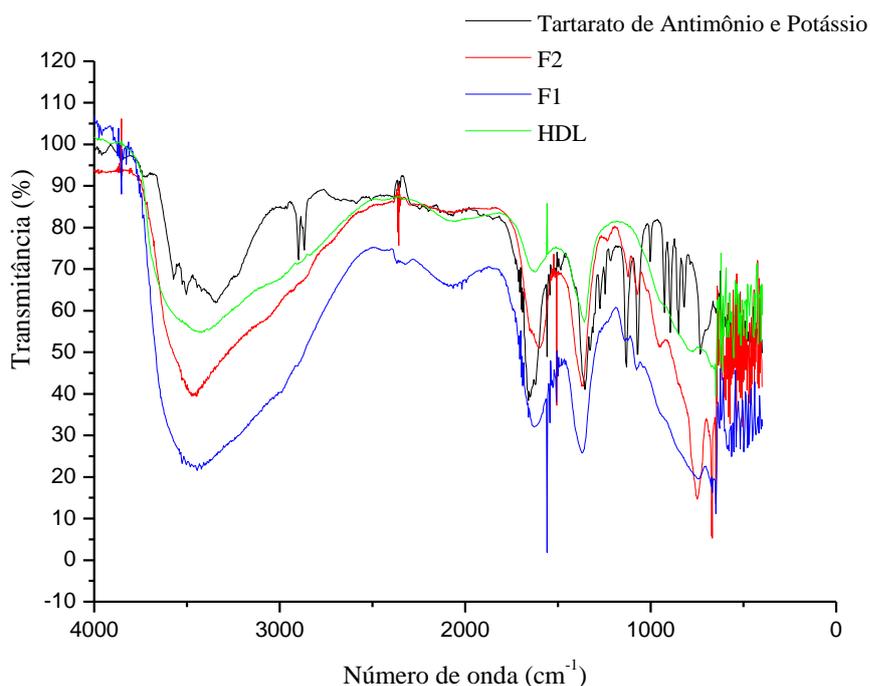


Fonte: Menezes et al., 2013.

5.4.6 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier

Os dados provenientes desta análise estão apresentados na figura 22, onde a região que compreende de 3600 a 2250 cm^{-1} corresponde ao estiramento (ν) OH e pode ser observado em todas as amostras analisadas. A região de 2900 a 2950 cm^{-1} está relacionada à ligação H-C detectada apenas no tartarato de antimônio e potássio, assim como as ligações: C=O proveniente de éster (1650 cm^{-1}), C-O proveniente de éster (1350 cm^{-1}) e C-O (1150-1085 cm^{-1}). A deformação OH da água adsorvida ou da água interlamelar (flexão de $\delta\text{H}_2\text{O}$) que ocorre em 1620 cm^{-1} é característica do HDL, assim como o estiramento [$\nu(\text{CO}_3^{2-})$] de CO_2 em 1557 cm^{-1} .

Figura 22 – Dados de FT-IR obtidos



Fonte: Menezes et al., 2013.

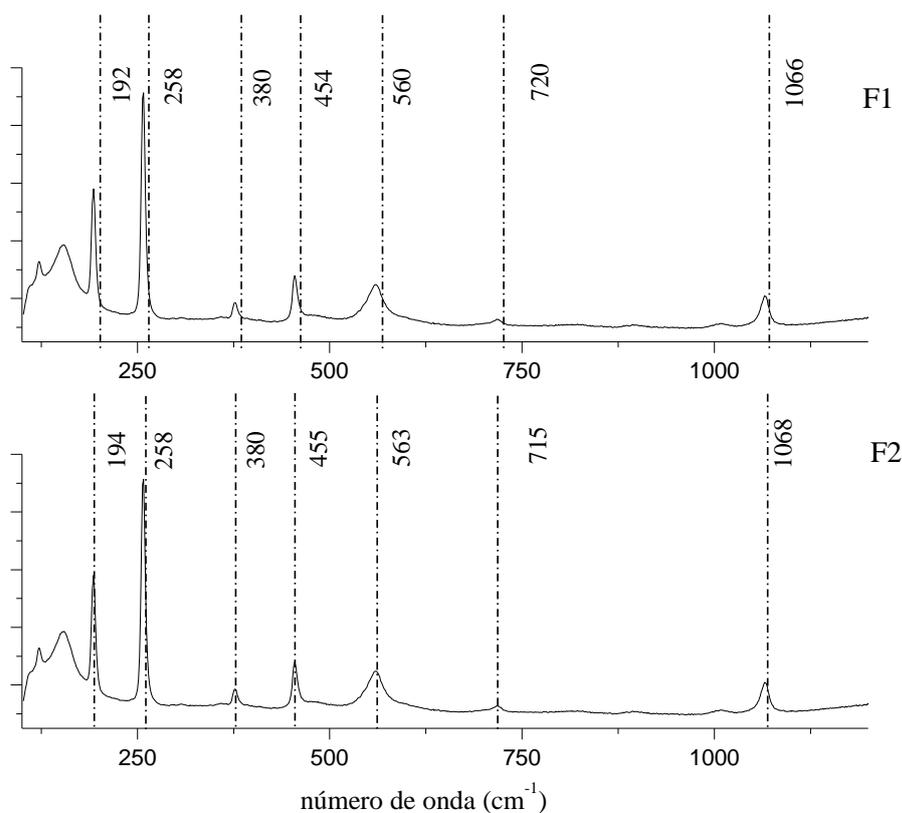
O fármaco puro e o HDL precursor foram utilizados como padrões de referência. Com isto, pode-se observar que F1 e F2 não apresentam quaisquer bandas características do fármaco original. Porém, em relação às demais bandas, houve uma relação harmoniosa entre o HDL e os produtos de intercalação com a manutenção das características de vibração M-O relativo à presença do HDL e do trióxido de antimônio (Sb_2O_3) que também, assim como os

metais contidos nas lamelas do HDL, pode ser suposta através das bandas 747 e 665 cm^{-1} , visto que nesta faixa ocorrem vibrações correspondentes às ligações M-O (DUOMO et al., 1997).

5.4.7 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman (Figura 23) de ambas as formulações apresentaram-se de forma bastante similar entre si, com destaques para as bandas: 192 cm^{-1} , 194 cm^{-1} , 258 cm^{-1} , 380 cm^{-1} , 454 cm^{-1} , 455 cm^{-1} , 715 cm^{-1} e 720 cm^{-1} , que apresentaram similaridade com o espectro Raman de mini octaedros de Sb_2O_3 (193 cm^{-1} , 257 cm^{-1} , 376 cm^{-1} , 454 cm^{-1} , 716 cm^{-1}) (BAÑARES et al., 2002; MA et al., 2004) e a banda em 1066 cm^{-1} que apresentou semelhança com uma das bandas do HDL precursor.

Figura 23 – Espectros Raman obtidos de F1 e F2



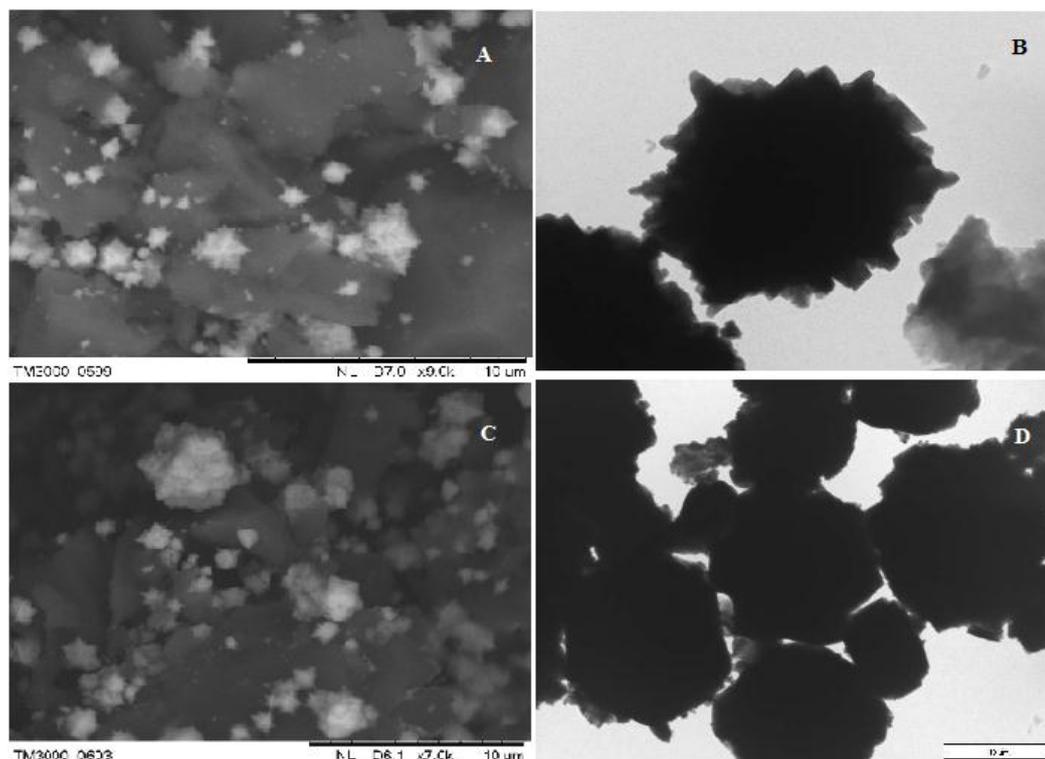
Fonte: Menezes et al., 2013.

5.4.8 Microscopia Eletrônica

A figura 24 ilustra as micrografias obtidas por MEV e por MET para ambas as formulações.

Nas micrografias A e C, obtidas por elétrons secundários, são visualizados por MEV, aglomerados da amostra, provavelmente os cristais octaédricos de óxido de antimônio (já confirmados por DRX através dos planos coincidentes com a literatura) (KNAPP, 1839; MA et al., 2004; VALIDŽIĆ et al., 2013). Estes aglomerados possuem tamanhos variados, apresentando, nesta micrografia, um tamanho médio de 2 a 3 μm tanto para F1 quanto para F2.

Figura 24 – Estrutura e morfologia das formulações obtidas nas análises de MEV e de MET. Onde, (A) MEV de F1 em um aumento de 2000x, (B) MET de F1 em um aumento de 50000x, (C) MEV de F2 em um aumento de 2000x e (D) MET de F2 em um aumento de 50000x



Fonte: Menezes et al., 2013.

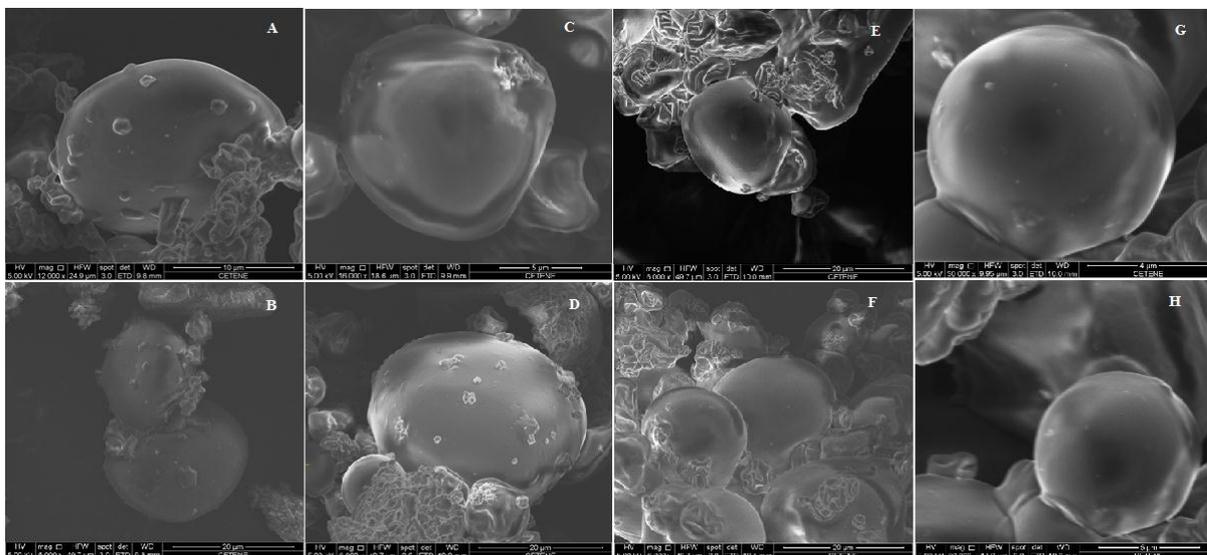
Nas micrografias obtidas por MET a presença de aglomerados é confirmada, sendo que os aglomerados presentes na figura 24B, representando F1, medem, em média, 13 μm de

largura e 10µm de altura. Já os aglomerados presentes na figura 24D, representam F2 e medem, em média, 25µm de largura e 17,5µm de altura. Além disto, através desta análise, é possível confirmar a presença do óxido de antimônio, previamente descrita pelo DRX (KNAPP, 1839; MA et al., 2004; VALIDŽIĆ et al., 2013).

5.5 Caracterização dos sistemas binários HDL-Sb revestidos

Para a escolha do produto a ser revestido (F1 ou F2), foram utilizados os resultados de DRX obtidos. Como um dos objetivos do trabalho era a obtenção de um produto intercalado, optamos por F1, visto que em F2 obtivemos um produto adsorvido e não intercalado. Com auxílio de ICP-AES, escolhemos F1 no tempo reacional de 24 horas (F1 – 24h), onde obtivemos a intercalação de uma quantidade suficiente de antimônio. A partir de então, os produtos revestidos foram obtidos por aspersão (*spray drying*) e analisados por MEV (Figura 25).

Figura 25 – MEV dos nanocompósitos revestidos, onde A, B (170°C), C e D (200°C) representam a micrografia da primeira condição de revestimento e E, F (170°C), G, H (200°C) representam a segunda condição de revestimento



Fonte: Menezes et al., 2013.

Com base nas micrografias apresentadas, é possível visualizar que na primeira concentração estudada (Figura 25 – A e B), com temperatura de entrada de 170°C (*spray drying*), os nanocompósitos revestidos apresentam um tamanho médio de 20 µm com recobrimento irregular e superfície não homogênea em determinadas áreas. Ao elevarmos a

temperatura para 200°C e mantendo a concentração anterior (Figura 25 – C e D), além do recobrimento irregular, foi observada uma heterogeneidade no tamanho das partículas, com uma variação de 5 a 20 µm. Ao aumentarmos a concentração, na temperatura mais baixa (170°C), obtivemos produtos revestidos com tamanho médio de 20 µm (Figura 25 – E e F), além da presença de muitos aglomerados de aspecto enrugado, aparentando, possivelmente, um excesso do polímero glicomanana. No entanto, ao aumentarmos a temperatura para 200°C, obtivemos produtos com tamanho de 4 a 5 µm (Figura 25 – G e H), ou seja, com um tamanho menor, e portanto um produto melhor, visto a maior facilidade de liberação, em relação aos demais; além de um melhor recobrimento polimérico, tendo em vista à menor ocorrência de superfície de aspecto enrugado (NANDIYANTO e OKUYAMA, 2011).

6 CONCLUSÕES

- Foram produzidos vários lotes do HDL precursor pelo método de co-precipitação e, por meio dos resultados obtidos a partir das técnicas de caracterização realizadas após a síntese de cada lote, foi possível confirmar o sucesso e a reprodutibilidade das sínteses;
- De acordo com os ensaios biológicos de citotoxicidade e endocitose realizados para o HDL precursor, este carreador não induz toxicidade celular e é endocitado facilmente por macrófagos murinos peritoneais de camundongos Swiss. Além disso, de forma análoga ao complexo antimônio-carboidrato presente nos fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, atualmente disponíveis no mercado farmacêutico, o HDL desempenha o papel facilitador do carboidrato no processo de endocitose por macrófagos;
- Os nanocompósitos foram preparados através de reação de troca iônica, e com a utilização das variáveis proporção m/m fármaco/HDL (1:3 e 3:1) e tempo reacional (2, 24, 48, 72 e 96 horas), foram obtidos dois produtos distintos: um esfoliado e um intercalado, ambos com o trióxido de antimônio na forma octaédrica associado ao nanocarreador (HDL precursor). Tais resultados foram elucidados com o auxílio de uma associação de diferentes técnicas de caracterização;
- Ambos os nanocompósitos, foram produzidos em curto tempo de reação (24 horas) à temperatura ambiente, com a utilização da água como solvente, e conseqüentemente com um baixo custo aderido ao produto final, o que favorece o desenvolvimento de uma formulação medicamentosa com ação leishmanicida;
- Por fim, foi realizado o revestimento polimérico com o polímero natural glicomanana, com a obtenção de um produto revestido uniformemente. Este tem por objetivo facilitar a provável passagem pelo suco gástrico sem que ocorra a exposição e degradação do HDL no pH ácido estomacal e a liberação imediata do antimônio. Como consequência, tem por função evitar o surgimento de uma série de efeitos colaterais inerentes à exposição sistêmica do antimônio;
- Com base nos resultados compilados neste estudo, conclui-se que este sistema pode representar uma nova e promissora abordagem de entrega específica contra a leishmaniose de forma simples e com um baixo custo aderido, mesmo em produções de alta escala;
- Como perspectiva, pretende-se realizar a avaliação biológica dos sistemas binários e a avaliação dos produtos revestidos, visto o intuito do desenvolvimento de uma formulação (através de revestimento polimérico) para uso oral.

REFERÊNCIAS

- ALBERS A. P. F.; MELCHIADES, F. G.; MACHADO, R.; BALDO, J. B.; BOSCHI, A. O. Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X. **Cerâmica**. v.48, n.305, 2002.
- ALVAR, J.; AMELA, C.; MOLINA, R.; In: El perro como reservatório de la leishmaniosis. **Medicina Veterinária**. v.12, n.7, 1995, p. 431-437.
- ALLMANN, R.; JEPSEN, H. P. **Die struktur des hydrotalkits** . Neues Jahrbuch fur Mineralogie, Monatshefte. 1969, p.544–551.
- 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, 1978, p.2959–2963.
- AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; PERIOLI, L. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents, I: intercalation and in vitro release of ibuprofen. **International Journal Pharmaceutics**. v. 220, 2001, p.23-32.
- AMBROGI, V.; FARDELLA, G.; GRANDOLINI, G.; PERIOLI, L.; TIRALTI, M. C. Intercalation Compounds of Hydrotalcite-like Anionic Clays With Anti-inflammatory Agents, II: Uptake of Diclofenac for a Controlled Release Formulation. **AAPS PharmSciTech**. v. 3, 2002, p.1-6.
- AN, N. T.; THIEN, D. T.; DONG, N. T.; DUNG, P. L.; DU, N., V. Characterization of glucomannan from some Amorphophallus species in Vietnam. Carbohydrate. **Polymers**. v.80, 2010, p.308–311.
- BAKER, J. R.; MILKE, M. W.; MIHELICIC, H. R. Relationship between chemical and theoretical oxygen demand for specific classes of organic chemicals. **Water Research**. v. 33, n.2, 1999, p.327-334.
- BALANA-FOUCE R., REGUERA R. M., CUBRIA J. C., ORDONEZ D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**. v.30, 1998, p.435-43.
- 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, 2012, p.506 – 513.
- BAÑARES, M.A., GUERRERO-PÉREZ, M.O., FIERRO, J.L.G., CORTE, G.G.J. Raman spectroscopy during catalytic operations with on-line activity measurement (*operando* spectroscopy): a method for understanding the active centres of cations supported on porous materials. **Journal of Materials Chemistry**. v.12, 2002, p.3337–3342.
- 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, 2011,

p.111-117.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.15, n.1, 2005, p.13-21.

BASSET, D.; FARAUT, F.; MARTY, P.; DEREURE, J.; ROSENTHAL, E.; MARY, C. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients: 11 new cases and a review of the literature. **Microbes Infect**. v.7, n.13, 2005, p. 1370–1375.

BERENGUER, J.; GÓMEZ-CAMPODERÁ, F.; ANAYA, F.; MORENO, S.; VALDERRÁBANO, F. Visceral leishmaniasis (Kalaazar) in transplant recipients: case report and review. **Transplantation**. v.65, n.10, 1998, p.1401-1404.

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

BEYRER, C. Neglected Diseases, civil conflicts, and the right to health. **Lancet**. v.370, n.9587, 2007, p.619-627.

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, 2011, p.1-10.

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2000. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde – Fundação Nacional da Saúde. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2000. 62 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_leishman.pdf>. Acesso em: 27 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2006. **Prioridades de pesquisa em saúde**. Caderno 2: Doenças negligenciadas. Ministério da Saúde - Decit, 2006. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicações/Pesquisa_Saude/tela1_2.html>. Acesso em: 27 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2007. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 ed., Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf> Acesso em: 26 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2009. **Guia de vigilância epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2009. Caderno 11, 816 p. – ISBN 978-85-334-1632-1. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 27 out. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011a. **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://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmania_hiv_web_25_01_11.pdf> Acesso em: 26 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011b. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2011. 78 p.– ISBN 978-85-334-1795-3 1. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_visceral_reducao_letalidade.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Saúde Brasil 2011. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas. Disponível em:

<http://www.cdts.fiocruz.br/inctidn/index.php?option=com_k2&view=item&layout=item&id=112&Itemid=61%20> Acesso em 20 jul. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2011: uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília. 1 ed. cap.3, Editora do Ministério da Saúde, 2012. 444 p. Disponível em:

<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Fev/21/saudebrasil2011_parte_1_cap3.pdf> Acesso em: 19 ago. 2013.

BRÜGEMANN, L.; GERNDT, E. K. E. Detectors for X-ray diffraction and scattering: a user's overview. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment.** v.531, n.1-2, 2004, p.292–301.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Gel particles from spray-dried disordered polysaccharides. **Carbohydrate Polymers.** v.76, 2009, p.206–213.

Canine Vector-Borne Diseases. Disponível em: <<http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis/pathogens/>>. Acesso em 31 jul. 2013.

CARTER, N.S.; FAIRLAMB, A. H. Arsenical-resistant trypanosomes lack na usual adenosine transporter. **Nature.** v.14, n.361, 1993, p.173-6..

CAVANI, F.; TRIFIRO, F.; VACCARI, A.; Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications. **Catalisys Today.** v.11, 1991, p.173, 1991.

Centers for Disease Control & Prevention. Leishmaniasis. 2009. 1 fotografia. 5,8cm x 4.3cm. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

CHAO, W.; MEI, X.; WEN-PING, L.; PEI, Q.; YUAN-YUAN, G.; DONG-SHENG, L. Study on Rheological Behavior of Konjac Glucomannan. **Physics Procedia.** v.33, 2012, p.25 – 30.

CHITRAKAR, R.; MAKITA, Y.; SONODA, A.; HIROTSU, T. Synthesis of a novel layered double hydroxides [MgAl₄(OH)₁₂](Cl)₂·2.4H₂O and its anion-exchange properties. **Journal of**

Hazardous Materials. v.185, 2011, p.1435–1439.

CHOUDARY, B.M.; BHARATHY, B.; REDDY, Ch. 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, 2002, p.279–284.

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

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology.** v.19, 2003, p.502-508.

COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels, **International Journal of Pharmaceutics.** v.162, 1998, p. 95-106.

CONCEIÇÃO, L. da; PERGHER, S. B. C. Compósitos magnéticos baseados em hidrotalcitas para a remoção de contaminantes aniônicos em água. **Química Nova.** v. 30, n. 5, 2007, p.1077-1081.

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 31 jul. 2013.

COSTA, F. R.; ABDEL-GOAD, M.; WAGENKNECHT, U.; HEINRICH, G. Nanocomposites based on polyethylene and Mg–Al layered double hydroxide. I. Synthesis and characterization. **Polymer.** v.46, 2005, p.4447–4453.

COSTA NETO, B. P. **Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection,** v.17 n.10, oct. 2011.

CRUZ, I.; MORALES, M. A.; NOGUER, I.; RODRIGUEZ, A.; ALVAR, J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet.** v.359, n.9312, 2002, p.1124–1125.

CUNHA, V. R. R.; FERREIRA, A. M. C.; CONSTANTINO, V. R. L. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova,** Vol. 33, No. 1, 159-171, 2010.

DATASUS. Sistema de Agravos de Notificação. Indicadores de morbidade e fatores de risco – SINAN. Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

DATASUS. Sistema de Agravos de Notificação. Indicadores de morbidade e fatores de risco – SINAN. Leishmaniose Visceral. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinan/leishvi/bases/leishvbr.def>>. Acesso em: 16 fev. 2014.

DAVE, V.; SHETH, M.; MCCARTHY, S. P.; RATTO, J. A.; KAPLAN, D. L. Liquid crystalline, rheological and thermal properties of konjac glucomannan. **Polymer**. v.39 n.5, 1998.

DAVIDSON, R.N.; CROFT, S.L.; SCOTT, A.; MAINI, M.; MOODY, A.H.; BRYCESON, A.D.M. Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis. **Lancet**. v. 337, 1991, p. 1061-1062.

DAVIES, J.Q.; GORDON, S. 2004. **Isolation and culture of murine macrophages: methods**, In: Helgason, C.D., Miller, C.L. (Eds.), third ed. Mol. Biol.: Basic Cell Culture Protocols, vol. 290. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 91–100 (chapt. 7).

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**. v.326, 2003, p.377-382.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**. **Aplicações e preparação de amostras**. 2007. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS, 2007.

DEL ARCO, M.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, C. & RIVES, C. Intercalation of mefenamic and meclofenamic acid anions in hydrotalcite-like matrixes. **Applied Clay Science**. v.36, n.1-3, 2007, p.133-140.

DELGADO, R.R., VIDAURRE, M.A., DE PAULI, C.P., ULIBARRI, M.A., AVENA, M.J. Surface-charging behavior of Zn–Cr layered double hydroxide. **Journal of Colloid and Interface Science**. v.280, 2004, p.431–441.

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**. 2004, v.48, p.100-103.

Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi). Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl/current-treatment/current-treatment-cl.html>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

DESSUY, M. B. **Desenvolvimento de estratégias analíticas usando espectrometria de absorção atômica para avaliar a composição de copos de liga peltre e lixiviação de cádmio, chumbo e antimônio**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

DONATO, R. K.; LUZA, L.; DA SILVA, R. F.; MORO, C. C.; GUZATTO, R.; SAMIOS, D.; MATĚJKA, L.; DIMZOSKI, B.; AMICO, S. C.; SCHREKKER. The role of oleate-functionalized layered double hydroxide in the melt compounding of polypropylene nanocomposites. **Materials Science and Engineering C**. v.32, 2012, p.2396–2403.

Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi). **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html>> Acesso em 26 ago. 2013.

DUOMO, Z.; SONGWEN, X.; TONGRAE, C.; ZHIHONG, L.; RONGDE, G.; HUIGUANG, C.; XUEYI, G. Polymorph control of antimony white (Sb₂O₃) prepared by hydrometallurgy method. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**. v.7, 1997, n.4, p.118-122.

EL-HASSAN, A. M.; ZIJLSTRA, E. E. Leishmaniasis in Sudan. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene** v.95, april, 2001.

FALLEIROS, J. P. B.; BRANDL, A. L.; FONSECA, A. R. A. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. **Nucleus**. v.8, n.1, 2011, p.151-169..

FAIRLAMB, A. H.; RIDLEY, R. G.; VIAL, H. J. **Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues Discoveries and drug development**. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2001, 213p.

FARMACOPEIA BRITÂNICA. 4a ed. Londres, 2007.

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

FEURESTEIN B. G.; WILLIAMS L. D.; BASU H. S.; MARTON L. J. Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.46, 1991, p.37-47.

FERREIRA, H. S. C. M. **Utilização de lipossomas como modelos de biomembranas na avaliação e quantificação da actividade de anti-inflamatórios**. 2006. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, 2006.

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

FRAGA, V. F. **Derivatização da pentamidina**. 2007. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.

FREITAS, E. A divisão do mundo de acordo com a visão eurocentrista. Geografia. Mundo educação. Disponível em: <<http://www.mundoeducacao.com.br/geografia/a-divisao-mundo-acordocom-visao-eurocentrista.htm>> Acesso em: 29 jul. 2013.

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.; DEMICHELII, C. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/beta-cyclodextrin nanoassemblies. **International Journal of Pharmaceutics**. v.347, n.1-2, 2008, p102-108.

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

GALLETI, S. R. INTRODUÇÃO A MICROSCOPIA ELETRÔNICA. [Informação Verbal]. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35, jan./dez. 2003.

GASSER, M. S. Inorganic layered double hydroxides as ascorbic acid (vitamin C) delivery System – Intercalation and their controlled release properties. **Colloids and Surfaces B**:

Biointerfaces. v.73,2009, p.103–109.

GENNARO AR. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

GIL, E. S.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; BEZERRA, J. C. B.; AGUIAR, F. A. Leishmaníase: arsenal terapêutico e alvos moleculares. **Vita et sanitas.** v.1, n.1, 2007, p.90-115.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira Epidemiologia.** v. 7, n.3, 2004, p338-349.

GOODWIN, L. G. New Drugs for Old Diseases. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene,** v.74, n.1, 1980.

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

HERNÁNDEZ, I. P.; MONTANARI, J., VALDIVIESO, W.; MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L.; ESCOBAR, P. In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.117 p.157–163, december, 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S, R. **Princípios de análise instrumental /** tradução Celio Pasquini [coordenação]; Jarbas José Rodrigues Rohwedder ... [et al.]. – 6. ed. – Porto Alegre : Bookman, 2009. 1056p. ; il. ; 28 cm. 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^- , NO_3^- or SO_4^{2-} as interlayer anion. **Materials Science-Poland.** v.29, 2011, p.86-91.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas. **As doenças.** Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/inct-idx/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=101>>. Acesso em 26 ago. 2013.

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

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, 2006, p.923-930.

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, 2009, p.10196–10205.

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, 1999, p.61-71.

KLOPROGGE, J.T., FROST, R.L. Fourier Transform Infrared and Raman spectroscopy study of the local structure of Mg, Ni and Co-hydrotalcites. **Journal Solid State Chemistry**. v.146, 1999, p.506-515.

KLOPROGGE, J. T.; KRISTÓFB, J.; FROST, R. L. Thermogravimetric analysis-mass spectrometry (TGA-MS) of hydrotalcites containing CO_3^{2-} , NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} or ClO_4^- . **12th, International clay conference; 2001 - a clay odyssey**, p. 451-458.

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

KNAPP, FR. Zur Bildungsgeschichte des Brechweinsteins. **Annalen der Pharmacie**. v.32, 1839, p. 76-85.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5. ed. Medsi, 2001.

LEGROURI, A.; LAKRAIMI, M.; BARROUG, A.; DE ROY, A.; BESSE, J. P. Removal of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate from water to zinc–aluminium–chloride layered double hydroxides. **Water Research**. v.39, 2005, p.3441–3448.

LEISHMANIOSE. Ministério da Saúde. Setembro, 2007. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/126leishmaniose.html>>. Acesso em: 04 fev. 2013.

LI, B.; HE, J.; EVANS, D. V.; DUAN, X.; Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 287, 2004, p.89-95.

LIAO, W.; WEI, F.; LIU, D.; QIAN, M. X.; YUAN, G.; ZHAO, X. S. FTIR-ATR detection of proteins and small molecules through DNA conjugation. **Sensors and Actuators B**. v.114, 2006, p.445–450.

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

LOTROWSKA, M.; ZACKIEWICZ, C. Pesquisas negligenciam doenças de populações pobres. **Revista Ser Médico**. São Paulo, 2005. Disponível em <<http://www.cremesp.org.br/?siteAcao=Revista&id=213>>. Acesso em: 27 out. 2013.

LUO, X.; HE, P; LIN, X. The mechanism of sodium hydroxide solution promoting the gelation of Konjac glucomannan (KGM). **Food Hydrocolloids**. v.30, 2013, p.92-99.

LYRA3. Microscópio Eletrônico de Varredura de Efeito de Campo (FEG) com fonte de íons focalizados (FIB). Disponível em : <<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/surface/sem/lyra3.shtml>>. Acesso em 05 fev. 2014.

MA, X.; ZHANG, Z.; LI, X.; DU, Y.; XU, F.; QIAN, Y. Micro-sized Sb_2O_3 octahedra

fabricated via a PEG-1000 polymer-assisted hydrothermal route. **Journal of Solid State Chemistry**. v.177, 2004, n.10, p.3824-3829.

MALISKA, A. M. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. Disponível em: <http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf> Acesso em: 02 set. 2013.

Manual do fabricante. Mini *Spray dryer* B-290.

MARANGONI, R. **Imobilização de nanopartículas de ferro em óxidos isolantes e semicondutores**. Dissertação (Mestre em Química). Programa de Pós Graduação em Química do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2005.

MARSDEN, P.D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.18, 1985, p.187-198.

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.

MCDOWELL, M. A.; MAROVICH, M.; LIRA, R.; BRAUN, M.; SACKS, D. Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. **Infection and Immunity**. v.70, n.8, 2002, p. 3994–4001.
MELO, R.C.N. **Células & Microscopia: princípios básicos e práticas**. Juiz de Fora: Ed. UFJF, 144p. 2002.

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

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

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. Análise térmica de materiais. Editora Artliber, 2009. São Paulo. NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, 1987, p.901-909.

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, 2002, n.3, p 495-502.

NANDIYANTO, ASEP.B. D.; OKUYAMA, K. Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. **Advanced Powder Technology**. v.22, n.1, 2011, p.1–19.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensão coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**. v. 34, n. 3, 2011, p. 408-413.

NETO, V. A.; AMATO, V. S.; GRYSCHKEK, R. C. B. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

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

NEVES, D. B. J. **Concentração de antimônio em plasma e pele de pacientes com leishmaniose cutânea – relação com efeitos colaterais após tratamento com antimoniato de n-metilglucamina**. 2008. 88p. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília. Brasília – DF. 2008.

NGURE, P. K.; KIMUTAI, A.; NG'ANG'A, Z. W.; RUKUNGA, G.; TONUI, W. K. A review of Leishmaniasis in Eastern Africa. **Journal of Nanjing Medical University**. v.23 n.2, 2009, p.79-86.

NOAZIN, S.; MODABBER, F.; KHAMESIPOUR, A.; SMITH, P. G.; MOULTON, L. H.; NASSERI, K.; SHARIFI, I.; KHALIL, E. A. G.; BERNAL, I. D. V.; ANTUNES, C. M. F.; KIENY, M. P.; TANNER, M. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine**. v.26, p.6759–6767, 2008.

PAGLIANO, P.; CARANNANTE, N.; ROSSI, M.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; FAELLA, F. S.; GAETA, G. B. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literature. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.55, n.2, 2005, p. 229-233.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**. v.78, n.2, 2002.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**. v.14, p.1032–1039, 2010.

PORTAL DA SAÚDE – SUS. **Aspectos clínicos e laboratoriais das leishmanioses**. Disponível em: <>. Ministério da Saúde. Acesso em: 04 ago. 2013.

PETROVICK, G. F. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo pro duto seco por spray drying de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *asteraceae* (marcela)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

POLI, A.; SOZZI, S.; GUIDI, G.; BANDINELLI, P.; MANCIANTI, F., Comparison of amenosidine (paromomycin) and sodium stibegluconate for treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 71, 1997, p. 263-271.

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, 2011, p.13539–13543.

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, 2011, p.13539–13543.

RAI, P. R.; TIWARY, A. K.; RANA, V. Optimization of an aqueous tablet-coating process containing carboxymethylated *Cassia fistula* gum. **AAPS PharmSciTech**. v. 13, 2012, n.2.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por *spray drying*: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, 2006.

RATH, S.; JARDIM, W. F.; DÓREA, J. G. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**. v.358, 1997, p.548–550.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**. v. 26, n. 4, 2003, p.550-555.

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.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. The 2nd International Forum on Canine leishmaniasis was held in Seville, Spain. **Trends in Parasitology**, v.18, n.7, 2002, p. 289–290.

REY, L. **Parasitologia – Parasitos e doenças parasitárias do Homem nas Américas e na África**. 3^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, C. **Intercalação de ânion enalaprilato em Hidróxido Duplo Lamelar recoberto com xiloglucana: estudos de liberação *in vitro***. 2008. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RIVES, V.; DEL ARCO, M.; MARTÍN, C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review. **Journal of Controlled Release**. v.169, 2013, p.28–39.

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

ROCIO, K. H.; OLIVEIRA, B. A. M. S.; MOREIRA, M. L.; SILVA, T. D. Manipulação e validação de revestimento gastrorresistente de cápsulas contendo ácido acetilsalicílico. **Farmácia & Ciência**. v.3, 2012, p.46-54.

ROLIM, LA.; LESSA, M. M.; ALVES, L. D. S.; FREITAS-NETO, J. L.; ALVES, S. M. A.; ROLIM-NETO, P. J. Aplicações de revestimento em formas farmacêuticas sólidas na

indústria farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 90, 2009, n.3.

RODRIGUES, J.C. **Síntese, caracterização e aplicações de argilas aniônicas do tipo hidrotalcita**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, 2007.

ROSETTO, E.; BERARDIN, R.; PENHA, F. G.; PERGHER, S. B. C. Caracterização de argilas bentonitas e diatomitas e sua aplicação como adsorventes. **Química nova**. v.32, n.8, 2009.

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, 2012, p.158–163.

SANTOS, A. F. X. G. **Catalisadores heterogeneos para a produção de biodiesel metanólise do óleo de soja sobre hidrotalcites de magnésio e alumínio modificadas**. Dissertação de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2007.

SARAIVA, E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; WANDERLEY, J. L. M.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A.; MOREIRA, M. E. C. Flow cytometric assessment of Leishmania spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**. v.110, n.1, 2005, p.39–47

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Axenically Grown Amastigotes of Leishmania infantum Used as an In Vitro Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of action. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v.42, n. 12, 1998, p. 3097–3102.

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, 2010, p.2150-2156.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**. v.1, n. 1, 2007, p. 20-31.

SILVERSTEIN, R., M.; WEBSTER, F. X. KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7 ed. New York, USA, 1962, 502p.

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, 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.

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro, RJ: Academia Brasileira de Ciências, 2010.

SOUZA, T. P.; PACHECO, R. M.; AMOZA, J. L. G.; PETROVICK, P. R. Eudragit E as Excipient for Production of Granules and Tablets From *Phyllanthus niruri* L Spray-Dried Extract. **AAPS PharmSciTech**. v. 8, n. 2, 2007.

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, 2011, p.1922–1927.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **Journal of Global Infectious Diseases**. v. 2, 2010, p.159–6.

TU, Q.; CHANG, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v.8, 2012, p.545–558.

UKMi. UK Medicines Information. **New Drugs Online**. Disponível em: <http://www.ukmi.nhs.uk/applications/ndo/record_view_open.asp?newDrugID=2877> Acesso 19 out. 2013.

UNDP/World Bank/WHO Special Programme For Research & Training In Tropical Diseases (TDR). Em Tropical Disease Research Programme Report, 13; progress 1995-96. Geneva: **World Health Organization**, 1997. cap. 8, p. 100-111.

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.

SMITH, G. D.; CLARK, R. J. H. Raman microscopy in archaeological science. **Journal of Archaeological Science**. v.31, 2004, p.1137–1160.

VIEIRA, G. **Glossário de doenças: Leishmaniose**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=353&sid=6>> Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, 2006. Acesso 31 jul. 2013.

VIEIRA, L. S. **Leishmaniose visceral**. MedFoco. 2012. Disponível em: <<http://www.medfoco.com.br/leishmaniose-visceral-calazar/>> Acesso 17 ago 2013.

World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>>. Acesso em: 28 ago 2013.

World Health Organization. **Research and Development**. WHO, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/trade/glossary/story079/en/#>> . Acesso em: 26 ago. 2013.

VALIDŽIĆ, I. L.; ABAZOVIĆ, N. D.; MITRIĆ, M.; LALIĆ, M. V.; POPOVIĆ, Z. S.; VUKAJLOVIĆ, F. R. Novel organo-colloidal synthesis, optical properties, and structural analysis of antimony sesquioxide nanoparticles. **Journal of Nanopart Research**. v. 15, 2013, p. 1347.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.20, n.1, 2010, p.51-64.

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, 2006, p.16923-16929.

XU, Z.P., NIEBERT, M., PORAZIK, K., WALKER, T.L., COOPER, H.M., MIDDELBERG, A.P.J., GRAY, P.P., BARTLETT, P.F., LU, G. Q. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. **Journal Controlled Release**. v.130, 2008, p.86-94.

XU, Z. P.; BRATERMAN, P. S. Synthesis, structure and morphology of organic layered double hydroxide (LDH) hybrids: Comparison between aliphatic anions and their oxygenated analogs. **Applied Clay Science**. v.48, 2010, p.235–242.

YAMEY, G. Public Sector must Develop Drugs for Neglected Diseases. **BMJ**. v.324, n.698, 2002.

YANG, J.; XIAO, J.; DING, L. An investigation into the application of Konjac glucomannan as a flavor encapsulant. **European Food Research and Technology**. v. 229, 2009, p.467–474.

YOSHIMURA, M.; NISHINARI, K. Dynamic viscoelastic study on the gelation of konjac glucomannan with different molecular weights. **Food Hydrocolloids**. v.13, 1999, p.227–233.

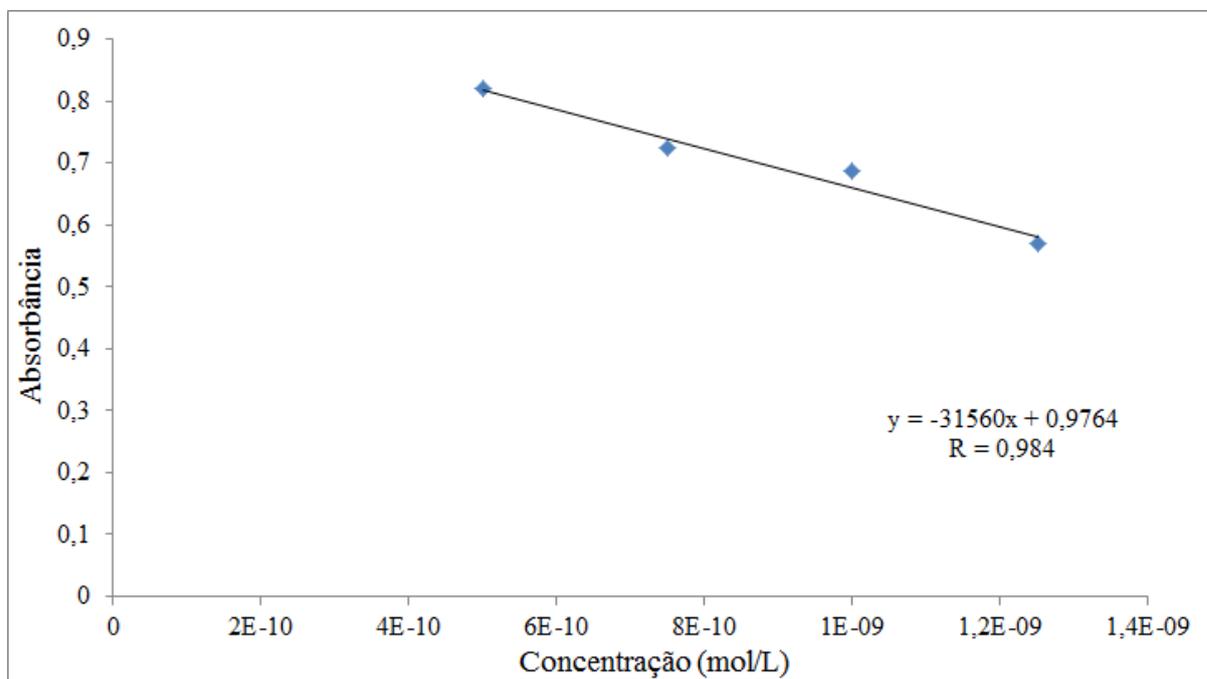
ZHANG, K.; SHOWALTER, M.; REVOLLO, J.; HSU, F. F.; TURK, J.; BEVERLEY, S. M. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in Leishmania. **The EMBO Journal**. v.22, n.22, 2003, p.6016–6026.

ZHANG, Y.; XIE, B.; GAN, X. Advance in the applications of *konjac glucomannan* and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**. v.60, 2005, p.27–31.

ZHANG, H.; ZOU, K.; GUO, S.; DUAN, X. Nanostructural drug-inorganic clay composites: Structure, thermal property and in vitro release of captopril-intercalated Mg–Al-layered double hydroxides. **Journal of Solid State Chemistry**. v.179, 2006, p.1792–1801.

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

APÊNDICE 1 – Curva de calibração do tartarato de antimônio e potássio



ANEXO 1 – Artigo aceito pela revista *Applied Clay Science* (ISSN: 0169-1317), fator de impacto 2,342, e já disponível *on line*

Applied Clay Science xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Applied Clay Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clay



Research paper

Layered double hydroxides (LDHs) as carrier of antimony aimed for improving leishmaniasis chemotherapy

Janaína Menezes^a, Tamires da Silva^a, Jailma dos Santos^b, Edgar Catari^b, Mário Meneghetti^b, Carolina da Matta^{c,d}, Magna Alexandre-Moreira^c, Nereide Santos-Magalhães^e, Luciano Grillo^a, Camila Dornelas^{a,*}

^a Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, 57072-900 Maceió, AL, Brazil

^b Instituto de Química e Biotecnologia, IQB, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, 57072-900 Maceió, AL, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, ICBS, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, 57072-900 Maceió, AL, Brazil

^d Rede Nordeste de Biotecnologia, RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Brazil

^e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2013

Received in revised form 10 October 2013

Accepted 22 December 2013

Available online xxx

Keywords:

Layered double hydroxides

Antimony

Intercalation

Binary system

Leishmaniasis

ABSTRACT

A leishmanicidal drug, antimony potassium tartrate, was used to produce a binary system of SbIII with an inorganic nanocarrier Mg, Al layered double hydroxide via ion exchange. X-ray powder diffraction and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry showed that the intercalated/exfoliated anion was the antimony trioxide. Binary systems were also successfully characterized by Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, energy-dispersive X-ray spectroscopy, and scanning transmission electron microscopy. These materials can be an important alternative for leishmaniasis chemotherapy. In addition to the low cost and easily laboratorial synthesis, clay has no cytotoxicity and its uptake by macrophages, amastigotes reservoir leads to a vectorization of antimony and a reduction in its side effects.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.