



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS V**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**IZABELE DE SOUZA ARAÚJO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA NANOTECNOLÓGICO PARA  
VEICULAÇÃO DE CANDIDATO À FÁRMACO LEISHMANICIDA**

**JOÃO PESSOA**

**2021**

IZABELE DE SOUZA ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA NANOTECNOLÓGICO PARA  
VEICULAÇÃO DE CANDIDATO À FÁRMACO LEISHMANICIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas apresentada a Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Nanotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

**Coorientadora:** M.<sup>A</sup> Camila de Oliveira Melo

**JOÃO PESSOA**

**2021**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A663d Araújo, Izabele de Souza.  
Desenvolvimento de um sistema nanotecnológico para veiculação de candidato à fármaco leishmanicida [manuscrito] / Izabele de Souza Araujo. - 2021.  
41 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, 2021.

"Orientação : Prof. Dr. Elquio Eleanen Oliveira ,  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas - CCBSA."

1. Leishmaniose. 2. Derivado -amino-íofênico. 3.  
Nanopartículas poliméricas. I. Título

21. ed. CDD 616.936 4

IZABELE DE SOUZA ARAÚJO

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA NANOTECNOLÓGICO PARA VEICULAÇÃO  
DE CANDIDATO À FÁRMACO ANTILEISHMANICIDA.

Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Estadual da  
Paraíba, como requisito parcial à obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Nanotecnologia

Aprovada em: 06/10/2021.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira (Orientador)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Prof. Me. Nyedja Fialho Morais Barbosa

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

## **DEDICATÓRIA:**

À minha mãe pelo exemplo de determinação,  
encorajamento e por nunca ter deixado de  
acreditar, Mery Ruth Eustáquio Kligensmith,  
DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, autor da minha fé, por me permitir acreditar, perseverar, vencer os dias maus e por ter me concedido forças para eu não desistir de trilhar os caminhos ao longo dessa jornada.

A meu orientador professor **Dr. Elquio Eleamen Oliveira**, pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial para desenvolver esse trabalho. Obrigada por despertar em mim o olhar científico.

À minha professora, coorientadora e grande amiga, **Me. Camila de Oliveira Melo**, meu eterno agradecimento por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Obrigada por me apresentar o universo da nanotecnologia e por me ensinar a manipular e ajudar a desenvolver esse trabalho. Minha gratidão pela sua amizade, paciência, lealdade, incentivo e conselhos.

Ao professor **Dr. Francisco Jaime** por fornecer o fármaco utilizado e por todo apoio.

À minha Mãe, **Mery Ruth Eustáquio Kligensmith**, por ser meu porto seguro e a minha maior força de inspiração. Minha gratidão eterna por ter me ensinado os atributos que foram essenciais para eu trilhar esse caminho: o respeito, a empatia, a constância, a dedicação e o amor pelo trabalho. Obrigada por todo investimento na minha educação e por sempre me encorajar, me mostrando que a realização de sonhos é possível através do trabalho duro e disciplina.

À minha família, que mesmo de longe, me acompanhou ao longo dessa jornada e acreditou que esse sonho seria possível. Especialmente a minha irmã **Paula Cristiane**, e ao meu sobrinho **Bernardo**, que deixaram meus dias mais leves. Agradeço aos meus avós, **Maria das Neves e José Eustáquio**, ao meu padrasto **John Kligensmith** pelo apoio financeiro e todos os meus tios, tias e primos por toda a torcida para eu chegar até aqui.

Aos meus **professores da UEPB**, muitíssimo obrigada por ensinar a amar e entender o universo da Biologia. Minha eterna gratidão a vocês por toda paciência e por ter despertado em mim o desejo de melhorar o mundo. Especialmente, deixo os meus agradecimentos a professora **Nyedja**, por me ensinar e orientar na parte estatística e nos estágios e pelas conversas, levarei comigo uma grande bagagem de conhecimentos.

À **Diego Henrique**, muitíssimo obrigada pelas caronas iniciais, pelo companheirismo, incentivo e por todas as palavras de encorajamento e conforto quando eu pensei em desistir.

Aos meus colegas do LSVM, **Malu Reis, Filipe, Rafael, Vitória, Silvana, Rodrigo**, obrigada pela troca de conhecimentos, conselhos e amizade.

Às minhas amigas que a Biologia me presenteou, **Aline, Thamiris, Aléxia, Alicia, Natalia, Veruska, Manu, Luana, Amanda, Kamila, Larissa e Rebeca**, obrigada pela troca de conhecimento ao longo de todo o curso, pela ajuda nos trabalhos acadêmicos, por me ouvir quando precisei, pelos conselhos, e por dividir comigo dos momentos de aflição até os de alegria na universidade; vocês tornaram essa jornada mais leve e divertida.

À **Carlos Henrique Lacerda**, obrigada pelo apoio emocional, incentivo, por dividir comigo esse momento e por tornar os meus dias mais leves nessa reta final.

Às minhas amigas extraclasse, **Amanda, Adryele, Jeniffer, Thaciana, Nicole, Lais, Mayra, Dayane, Bruna e Maura**, grata a vocês pelos conselhos e por todas as vezes que ouviram minhas lamentações, vocês fazem parte desse sonho.

“O mundo é tão complexo, e os talentos necessários para apreendê-lo tão variados, que até os melhores intelectos muitas vezes precisam de um parceiro que lhes complementem com o talento que carecem.” Stephen Jay Gould, em Seta do tempo, ciclo do tempo. Obrigada a todos vocês que fizeram parte desse sonho: meus professores, familiares e amigos. Sou grata por toda parceria, contribuição, apoio, conselhos e refúgio.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

**José de Alencar**

## RESUMO

A leishmaniose é causada por parasitas do gênero *Leishmania* da família *Trypanosomatidae*, transmitidos através do flebotomíneo fêmea da ordem *Diptera*, que infecta as células do sistema imunológico do hospedeiro. O tratamento atual é baseado principalmente em antimoniais pentavalentes, entretanto possui um alto custo, toxicidade e tratamentos prolongados. O derivado 2-aminotiofênico (SB-83), um candidato a fármaco leishmanicida, apresentou melhores resultados e mais seletividade, sendo 840 vezes mais benigno para macrófagos murinos e de 14,84 vezes mais benigno para eritrócitos humanos, quando comparado ao antimoniato de meglumina (Glucantime®). As nanopartículas poliméricas (NP) surgem como uma alternativa para o encapsulamento de fármacos e agentes biológicos ativos devido a sua capacidade de acumular-se em órgãos ricos em macrófagos e potencializar o efeito do agente encapsulado. Essas NP apresentam destaque no tratamento contra a leishmaniose, pois os fagócitos captam as NP e se acumulam nos órgãos atingidos pela parasitose, direcionando a entrega do medicamento ao local alvo. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo desenvolver um sistema nanoparticulado contendo o derivado SB-83 para direcionar o fármaco para dentro dos macrófagos infectados para o tratamento da leishmaniose. Inicialmente, foi realizado a validação analítica do método de quantificação do fármaco por espectrofotometria de UV-Vis, em seguida foram desenvolvidas as nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) contendo o SB-83 por duas técnicas: nanoprecipitação e emulsão simples (O/A) seguidas de evaporação do solvente. Além disso, foi avaliado as características morfológicas e físico-químicas das nanopartículas. Os resultados da validação analítica por espectrofotometria do SB-83 demonstraram que o método apresentou especificidade para o ponto médio da curva ( $DPR \leq 3,90\%$ ), foi exato ( $0,1758 \pm 0,9518$  e  $p < 0,01$ ), e preciso ( $DPR < 5\%$  e  $p > 0,05$ ). Além disso, o método foi linear e robusto para as condições testadas. E por fim, os resultados da caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas propõem que a presença do SB-83 contribuiu para aumentar o tamanho das partículas ( $205,7 \pm 4,75$  nm), no qual apresentou um potencial zeta negativo ( $-20,4 \pm 0,65$  mV) e índice de polidispersão de  $0,274 \pm 0,04$  e uma eficiência de encapsulação de  $62,7\% \pm 0,12$  e  $88,9\% \pm 0,87$  pelo método direto e indireto, respectivamente. Assim, este trabalho demonstrou que as nanopartículas contendo o SB-83 pode se tornar uma futura alternativa terapêutica para o tratamento da leishmaniose.

**Palavras-chave:** leishmaniose; derivado 2-amino-tiofênico; nanopartículas poliméricas.

## ABSTRACT

The leishmaniasis is caused by parasites of the *Leishmania* genus of the Trypanosomatidae family, transmitted through the female sand fly of the order Diptera, which infects the cells of the host's immune system. The current treatment is based mainly on pentavalent antimonials, however it has a high cost, toxicity and prolonged treatments. The 2-aminothiophenic derivative (SB-83), a leishmanicidal drug candidate, showed better results and more selectivity, being 840 times more benign for murine macrophages and 14.84 times more benign for human erythrocytes, when compared to meglumine antimoniate (Glucantime®). Polymeric nanoparticles (NP) appear as an alternative for the encapsulation of active pharmaceutical ingredients due to their capacity to accumulate in macrophage-rich organs and potentiate the effect of the encapsulated agent. These PN are highlighted in the treatment against leishmaniasis, as the phagocytes capture the NP and accumulate in the organs affected by the parasitosis, directing the drug to the target site. In this context, this study aimed to develop a nanoparticulate system containing the SB-83 derivative to direct the drug into infected macrophages for the treatment of leishmaniasis. Initially, the analytical validation by spectrophotometry of the drug was performed, then the poly (lactic acid) (PLA) nanoparticles containing the SB-83 were produced by two techniques: nanoprecipitation and simple emulsion (O/A) followed by solvent evaporation. Furthermore, the morphological and physicochemical characterization of the nanoparticles was evaluated. The results of the analytical validation by spectrophotometry of the SB-83 demonstrate that the method showed specificity for the midpoint of the curve ( $DPR \leq 3.90\%$ ), it was exact ( $0.1758 \pm 0.9518 - p < 0.01$ ) and precise ( $DPR < 5\%$  and  $p > 0.05$ ). Furthermore, the method was linear and robust to the conditions tested. Finally, the results of the morphological and physicochemical characterization of the nanoparticles propose that the presence of SB-83 contributed to increase the particle size ( $205.7 \pm 4.75$  nm), with a negative zeta potential ( $- 20.4 \pm 0.65$  mV) and polydispersity index of  $0.274 \pm 0.04$  and an encapsulation efficiency of  $62.7\% \pm 0.12$  and  $88.9\% \pm 0.87$  by the direct and indirect methods, respectively. Thus, this work demonstrated that nanoparticles containing SB-83 can become a future therapeutic alternative for the treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** leishmaniasis; amino-thiophene derivative; polymeric nanoparticles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo biológico da leishmaniose.....	16
Figura 2 – Mecanismo imunológico contra a Leishmania.....	17
Figura 3 – Estrutura química do SB-83.....	19
Figura 4 – Gráfico de Linearidade do SB-83.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas .....	27
Tabela 2 – Valores de especificidade para amostra padrão em condições de estresse.....	28
Tabela 3 – Estudo de Exatidão (DPR, Taxa de Recuperação e Exatidão) .....	29
Tabela 4 – Repetibilidade.....	29
Tabela 5 – Níveis de precisão.....	30
Tabela 6 – Teste de normalidade do Shapiro-Wilk.....	31
Tabela 7 – Percentual de Recuperação da robustez variando as marcas de solventes.....	32
Tabela 8 – Percentual de Recuperação da robustez variando o comprimento de onda.....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Leishmaniose.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Tratamento atual para a leishmaniose .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Derivado 2-amino-tiofeno (SB-83) .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Nanopartículas.....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Desenvolvimento das nanopartículas.....</b>	<b>23</b>
4.1.1 Nanocápsulas e Nanoesferas contendo o SB-83 pelo método da Nanoprecipitação.....	23
4.1.2 Nanoesferas de PLA contendo o SB-83 pelo método da emulsão simples (o/a) .....	23
<b>4.2 Caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas.....</b>	<b>23</b>
4.2.1 - Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.....	23
4.2.2 A eficiência de encapsulação (EE%).....	24
<b>4.3 Validação analítica .....</b>	<b>24</b>
4.3.1 Especificidade.....	25
4.3.2 Exatidão .....	25
4.3.3 Precisão.....	25
4.3.4 Linearidade .....	25
4.3.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	26
4.3.6 Robustez .....	26
<b>4.4 Análise estatística.....</b>	<b>26</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1 Caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas.....</b>	<b>27</b>

5.1.1	Determinação do diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão.....	27
5.1.2	Análise de eficiência de encapsulação.....	28
<b>5.2</b>	<b>Validação Analítica .....</b>	<b>28</b>
5.2.1	Especificidade.....	28
5.2.2	Exatidão .....	29
5.2.3	Precisão.....	29
5.2.4	Linearidade .....	31
5.2.5	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	32
5.2.6	Robustez .....	32
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença parasitária negligenciada, causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada da fêmea infectada do inseto vetor, flebotomíneo. Estima-se que a leishmaniose afeta 12 milhões de pessoas no mundo e 2 milhões de novos casos anualmente nos países endêmicos. Apesar de estar concentrada em países pobres e rurais do subcontinente indiano, América Central e do Sul, Norte e Leste da África e Oriente Médio, a leishmaniose também é endêmica em países do mediterrâneo (VANDEPUTTE et. al., 2020).

O tratamento tradicional utilizado para leishmaniose visceral e cutânea são os antimoniais pentavalentes, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), entretanto, esses medicamentos apresentam sérios efeitos colaterais, destacando-se a cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade (NAFARI et. al., 2020). Outros medicamentos, como a Anfotericina B (AmB), a miltefosina, a pentamidina e a paromicina, também são utilizados no tratamento da doença, porém, assim como os antimoniais, apresentam efeitos adversos graves (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Além disso, a terapia atual é insatisfatória pois há relatos de resistência entre os parasitas e ainda não há nenhuma vacina disponível (OSPINA-VILLA et. al., 2019). Dessa forma, a necessidade de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose é substancial e vem crescendo nos últimos anos (RODRIGUES et al., 2015).

Nesse contexto, um grupo tem despertado a atenção nas pesquisas de novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose, os derivados do núcleo tiofeno, cujo núcleo de tiofeno é ligado a grupamentos amina, devido a versatilidades de atividades farmacológicas reportadas, entre elas a atividade leishmanicida encontrada em derivados amino tiofênicos extraído de plantas. Além disso, exibe atividades anti-inflamatórias, antitumorais, antinociceptiva, anticonvulsivante e antiarrítmicas (TAKAHASHI et al., 2011; KAPIL; SINGH; SILAKARI, 2018). Rodrigues e colaboradores (2018) sintetizaram uma série de 10 derivados 2-amino-tiofeno e avaliaram o efeito em cepas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e a citotoxicidade em macrófagos murinos e hemácias humanas. Destes, o derivado 2-aminotiofênico (SB-83), demonstrou os melhores resultados, com o melhor índice de seletividade, sendo 840 vezes mais benigno para macrófagos murinos e 14,5 vezes mais benigno para eritrócitos humanos quando comparado ao fármaco de referência antimoniato de meglumina (Glucantime ®) (RODRIGUES et al., 2018).

Nos últimos anos, os sistemas nanotecnológicos para liberação de fármacos foram utilizados para melhorar a eficácia de diversos medicamentos no tratamento de várias doenças (AMINU et. al., 2020). Atualmente existem vários tipos de sistemas de liberação de fármacos para o tratamento de várias doenças, como: as nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgânicas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanogéis, micelas, nanocristais, lipossomas, nanocomplexos, dendrímeros, nanocápsulas, nanofibras, nanotubos e matrizes de suporte (AMINU et. al., 2020). As nanopartículas apresentam destaque por apresentar como vantagem a capacidade de aumentar a permeabilidade celular do fármaco, reduzir a quantidade e frequência de doses, aumentar o tempo de meia vida, além de aumentar a eficácia e controlar a liberação do ativo nanoencapsulado (EL-SAY; EL-SAWY, 2017; DE SOUZA et al., 2018; GEORGE; SHAH; SHRIVASTAV, 2019).

Vale ressaltar que os macrófagos captam as nanopartículas através de mecanismos fagocíticos por meio de receptores que internalizam os patógenos no macrófago, onde a *Leishmania* reside (MOSAIAB et. al., 2019). Sendo assim, para o tratamento da leishmaniose, as nanopartículas são captadas pelos fagócitos, e acumulados no fígado e no baço (órgãos atingidos principalmente na leishmaniose visceral), logo, a entrega das nanopartículas direcionadas aos macrófagos, faz com que a droga se acumule nos órgãos afetados, atingindo estrategicamente o parasita (SARWAR et. al., 2017). Portanto, as nanopartículas poliméricas podem ser utilizadas como sistema de liberação passiva de fármacos e aprimora a biodisponibilidade dos medicamentos (AKBARI, ORYAN; HATAM, 2017).

Neste aspecto, esse trabalho objetivou desenvolver, validar e encapsular um sistema nanoparticulado para veiculação do amino tiofeno SB-83, com a finalidade de diminuir os efeitos colaterais, de forma a direcionar o fármaco para dentro dos macrófagos infectados onde a *Leishmania* reside, visando direcionar o tratamento da leishmaniose para uma futura utilização clínica.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por mais de vinte espécies de *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, no qual sua transmissão se dá através da picada do mosquito fêmea infectado que se alimenta principalmente do sangue de mamíferos, entre os quais se destacam os humanos e cães. Essa parasitose está amplamente presente nas regiões tropicais e subtropicais, possuindo um grande risco de coinfeção em algumas áreas. A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, sendo um problema de saúde pública com poucos avanços terapêuticos, apesar de amplos estudos e pesquisas conduzidas relacionadas aos causadores da doença (ALCÂNTARA, et. al., 2018).

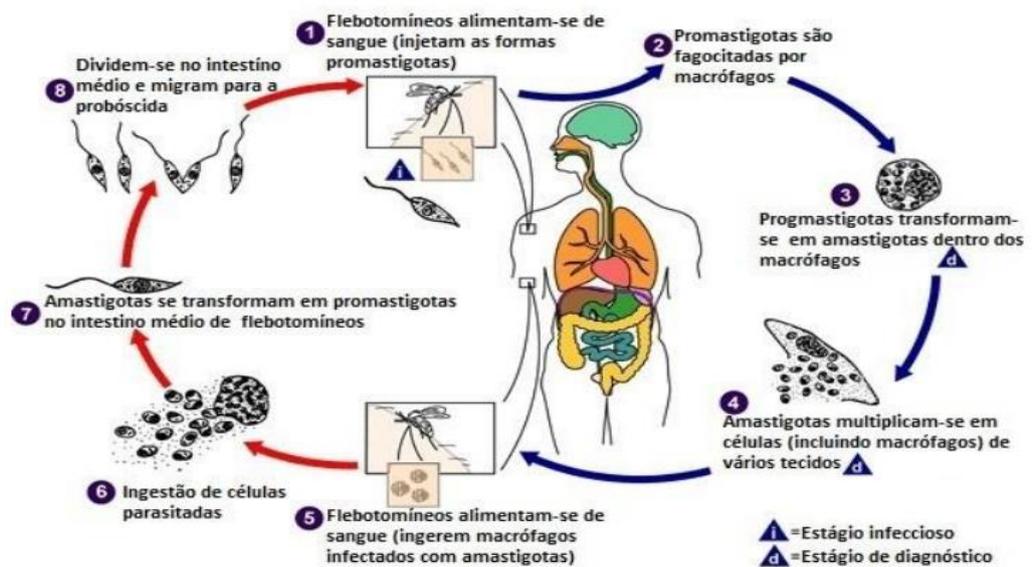
Vale ressaltar que uma das principais causas dos aparecimentos de parasitoses negligenciadas, é decorrente do desequilíbrio ambiental criado pela invasão do homem aos habitats naturais dos vetores e reservatórios silvestres da doença. Desse modo, em uma escala evolutiva, o homem tornou-se o seu reservatório e a doença tornou-se uma antropozoonose, que é uma doença que atinge primariamente animais e pode ser transmitida para humanos. Além disso, o número crescente de casos está relacionado ao aumento do desmatamento aliado ao crescimento da urbanização. E além da resistência aos medicamentos, a falha na cobertura dos serviços de saúde para controlar os vetores da doença em países mais pobres é um dos grandes dificultadores na adoção de medidas de controle da doença (VANDEPUTTE et. al., 2020).

Em humanos, a leishmaniose se apresenta de três formas: visceral que é a forma mais grave e letal, cutânea apresentando úlceras que podem persistir por um longo período e monocutânea causando lesões na boca, nariz ou mucosa genital (SÁNCHEZ-MORENO, et. al., 2012). A leishmaniose visceral pode causar a morte no indivíduo, e mesmo com acesso ao tratamento, apresenta taxas de letalidade entre 10 e 20% (ALVAR, 2012). O período de incubação da leishmaniose visceral é de cerca de 2 semanas a 18 meses, podendo apresentar reações inflamatórias nas vísceras e depois ocasionar lesões cutâneas iniciais. A mortalidade representa cerca de 75% a 95% dos casos (READY, 2014).

O ciclo de vida da *Leishmania* divide-se em dois estágios: a forma promastigota e amastigota (Figura 1). Inicialmente o flebotomíneo infectado injeta os promastigotas metacíclicos na pele do mamífero, que são fagocitados por macrófagos mediados por receptores de superfície (Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIII); cerca de 48 horas depois os promastigotas se

transformam na forma amastigota intracelular no qual se replicam em fagócitos adicionais, espalhando a doença (fase silenciosa); posteriormente os neutrófilos são recrutados para o local infeccionado e os promastigotas extracelulares entram nos macrófagos mediados predominantemente pelo receptor do complemento 3 (CR3) ou pelos receptores CR1, receptores Toll-like (TLR) -1, -2, -4 e -6, os receptores de fibronectina, necrófago e manose para promover a fagocitose; cerca de 3 semanas depois, ocorre uma cascata inflamatória com influxo dos neutrófilos derivados dos monócitos inflamatórios e células dendríticas que sucessivamente ativam as células T específicas do antígeno (fase clínica), provocando a resposta imune adaptativa contra a *Leishmania* (STEBUT; TENZER, 2018; DIXIT et. al., 2021).

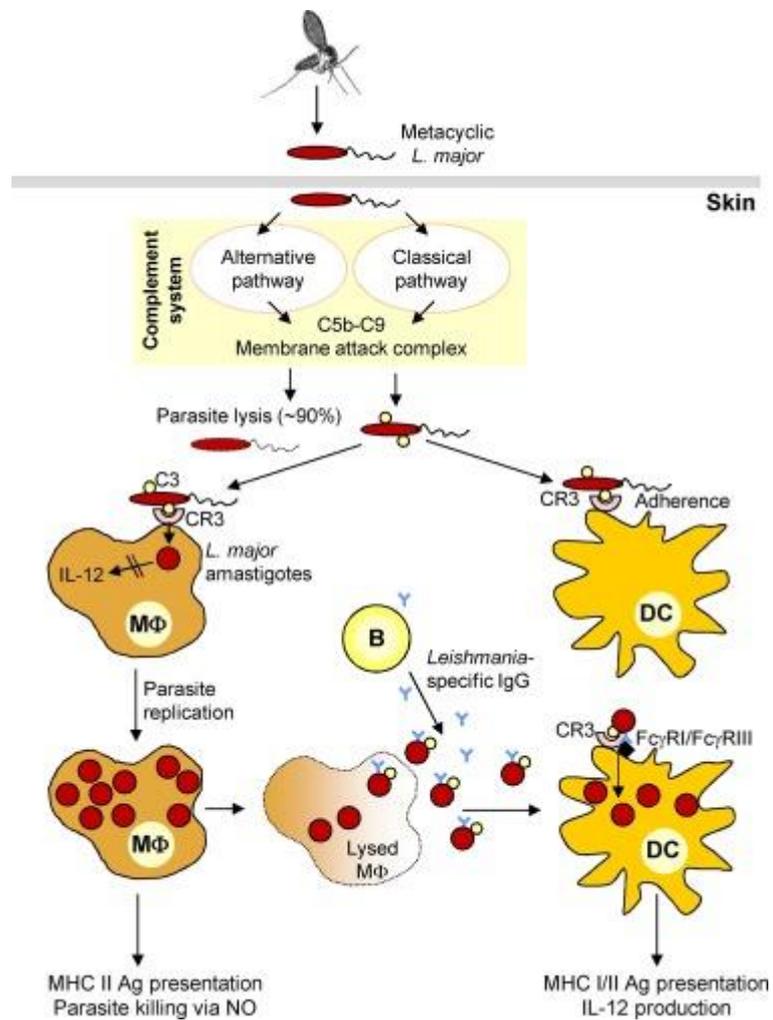
**Figura 1 - Ciclo biológico da leishmaniose**



**FONTE:** <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>, acesso em: 27/09/2021.

Conforme a Figura 2, cerca de 90% dos parasitas são mortos pelo sistema complemento. Os parasitas utilizam a opsonização C3 para serem engolfados por macrófagos via CR3 e depois se replicam. As células dendríticas internalizam o parasita via FcγRI e FcγRIII. Os macrófagos reestimulam as células T CD4+ via MHC de classe II. As DC são ativadas após a infecção e apresentam antígeno de *Leishmania* nas vias MHC classe I / II e promovem o *priming* de células T (STEBUT; TENZER, 2018).

**Figura 2 - Mecanismo imunológico contra a *Leishmania***



FONTE: STEBUT; TENZER, 2018

E em relação a patogenicidade, os parasitas proliferam em células do sistema fagocitário mononuclear, principalmente em macrófagos, já que são abundantes no baço e no fígado e, conseqüentemente, a infecção causa aumento nesses os órgãos (READY, 2014).

## 2.2 Tratamento atual para a leishmaniose

As terapias convencionais para a leishmaniose apresentam inúmeros efeitos adversos sistêmicos, elevada toxicidade e alto custo. Portanto, o desenvolvimento de novos medicamentos, mais eficientes e com menos efeitos adversos contra a leishmaniose é uma necessidade urgente (PRASANNA et. al., 2021).

Atualmente, entre os tratamentos mais utilizados contra à leishmaniose, estão os antimoniais pentavalentes, destacando-se o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o

antimoniato de meglumina (Glucantima®). No entanto, em altas concentrações o medicamento apresenta elevada toxicidade e em dosagem baixa favorece a resistência parasitária (RODRIGUES et. al., 2018). Adicionalmente, estes causam vários efeitos adversos, incluindo náuseas, vômitos, diarreia, erupções cutânea, tonturas, arritmia cardíaca, hipotensão, hepatite e pancreatite. Dessa forma, outras moléculas foram avaliadas como leishmanicidas, dentre elas, as pentamidinas que foram eficazes contra a leishmaniose tegumentar, porém, em altas doses causou diabetes mellitus; o Fluconazol, anfotericina B e miltefosina, que além da sua toxicidade, teve sua eficácia limitada, não sendo úteis contra a forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral (SÁNCHEZ-MORENO et. al., 2012). Outros agente terapêuticos como a paromomicina, sitamaquina e miltefosina também apresentam uma alta toxicidade, aumento da resistência aos medicamentos e alto custo de produção (PRASANNA et. al., 2021). Além disso, não existe nenhuma vacina registrada disponível.

O medicamento atual de primeira linha para a leishmaniose visceral é o antimoniato de meglumina, porém, o seu uso está atrelado a uma alta toxicidade e baixa adesão do paciente devido aos longos regimes posológicos (CARVALHO et. al., 2020). Por outro lado, o antifúngico anfotericina B (AmB) que é a segunda linha de escolha para o tratamento da leishmaniose visceral é eficaz contra as duas formas dos parasitas (promastigotas e amastigotas) que por meio de uma ligação ao ergosterol (na membrana celular do parasita), aumenta a permeabilidade celular e o influxo de íons, danificando a maquinaria celular e matando o parasita, porém, o que limita a sua eficácia é que este medicamento apresenta uma elevada toxicidade. Vale ressaltar ainda que em algumas espécies, devido a uma diferença do precursor do ergosterol, pode ocasionar falha na ligação da AmB em se ligar à membrana do parasita, resultando em uma resistência aos medicamentos (KAMMONA; TSANAKTSIDOU, 2021; SINGH et. al., 2019). Sendo assim, o tratamento com AmB tornou-se restrito devido à sua toxicidade elevada visto que causa reações adversas como: nefrotoxicidade e reações à infusão (KUMAR SINGH et. al., 2020).

O desenvolvimento de uma formulação lipossomal (AmBisome®) menos tóxica para o tratamento da leishmaniose visceral foi proposta pela OMS a fim de contornar os efeitos adversos do AmB, pois estrategicamente os lipossomas se acumulam no local infectado, aderindo à superfície celular do parasita, liberando AmB que está associado na bicamada lipídica, permitindo a administração de altas doses. No entanto, o elevado custo dessa formulação limita e dificulta esse tratamento, principalmente para os indivíduos em situação

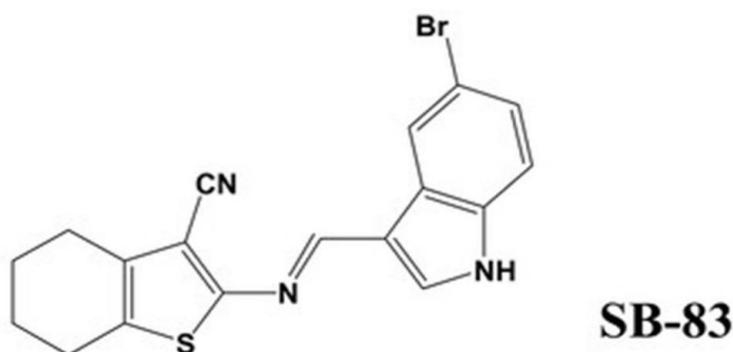
mais vulnerável de pobreza, onde há uma maior incidência de casos de leishmaniose (KAMMONA; TSANAKTSIDOU, 2021). Portanto, o tratamento da leishmaniose apresenta efeitos pouco satisfatórios, pois a maioria dos IFA (insumo farmacêutico ativo) exibem efeitos adversos graves e o aumento da resistência do parasita reduz muito sua sensibilidade a essas drogas (RODRIGUES et. al., 2015).

Sabe-se que as *Leishmanias* são parasitas intracelulares que conseguem sobreviver em macrófagos no retículo-endotelial, assim, a *Leishmania* se liga aos receptores da superfície do macrófago, gerando uma invasão fagocítica do promastigota (Figura 2). Os macrófagos expressam na sua superfície diversos receptores de engolfamento que podem se ligar a polissacarídeos modificados, lipoproteínas, células senescentes e apoptóticas (KUMAR SINGH et. al., 2020). Por isso a terapia de entrega direcionada de medicamentos ou moléculas bioativas é mais eficaz para o tratamento dessa parasitose.

### 2.3 Derivado 2-amino-tiofeno (SB-83)

O derivado 2-aminotiofênico (SB-83) (Figura 3) é um derivado da classe dos tiofenos que pertencem a um grupo de compostos heterocíclicos aromáticos que apresentam algumas atividades farmacológicas, destacando-se entre elas a atividade anti-inflamatória, antitumoral, antinociceptiva, anticonvulsivante, antiarrítmica e antileishmania (RODRIGUES et. al, 2018).

**Figura 3** - Estrutura química do SB-83



Fonte: AUTOR, 2021.

Dessa forma, Rodrigues et. al., (2015) avaliaram a eficácia de derivados 2-aminotiofênico (SB-83) onde foi demonstrada sua atividade contra a leishmaniose e seu possível mecanismo de ação. Assim, eles realizaram estudos *in vitro* para verificar a atividade

leishmanicida e foi encontrado um valor de 4,42  $\mu\text{M}$  que é correspondente ao  $\text{IC}^{50}$  (concentração que inibiu 50% dos parasitas), evidenciando que o SB-83 é um fármaco promissor contra as cepas de *Leishmania*, visto que uma concentração baixa do fármaco inibiu 50% das *Leishmanias* e não apresentaram nenhuma evidência de toxicidade.

O SB-83 induziu apoptose em promastigotas, além de reduzir a infecção dos macrófagos pelos parasitas, já que apresentaram aumento da  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-12 e NO. E ainda, os derivados de 2-amino-tiofeno contra *L. amazonensis* em ensaios *in vitro*, apresentaram bons resultados, com morte celular associada a apoptose e imunomodulação (RODRIGUES et. al., 2015).

Por fim, de acordo com estudos pré-clínicos posteriores do derivado tiofênico SB-83, foram demonstrados resultados eficiente, eficaz e seguro e se mostrou ativo por via oral. E ainda, apresentou sucesso no tratamento de camundongos *Swiss* infectados com *L. amazonensis*, reduzindo o tamanho da lesão, diminuindo a carga parasitária no baço e nos linfonodos, corroborando o efeito protetor contra a forma visceral da doença. Portanto, evidenciando o efeito *in vivo* do composto de tiofeno por via oral (RODRIGUES et. al., 2018).

## 2.4 Nanopartículas

As nanopartículas poliméricas são carreadores de fármacos coloidais na escala entre 1–1000 nm e podem ser obtidas de polímeros sintéticos ou naturais. As nanopartículas poliméricas exibem vantagens na entrega de fármacos devido ao seu pequeno tamanho de partícula e maior tempo de circulação no sangue, e ainda, pode melhorar a solubilidade do IFA, devido ao pequeno tamanho, biodistribuição e farmacocinética aprimoradas, resultando em eficácia melhorada e efeitos adversos reduzidos como resultado do acúmulo em locais alvo (BALYA et. al., 2021).

Atualmente, as nanopartículas poliméricas são bastante utilizadas na aplicação biomédica devido às suas diversas aplicações terapêuticas e administração de medicamentos, uma vez que, são constituídas de polímeros biodegradáveis que conferem diversos benefícios como: estabilidade melhorada de agentes terapêuticos contra a degradação, liberação controlada de drogas e direcionamento eficiente (SAHA, et. al., 2020). As nanopartículas poliméricas funcionam como sistemas carreadores eficazes devido à sua fácil preparação, liberação controlada e direcionada da droga, captação capilar com maior acúmulo de droga no

local alvo com intensificação da biodisponibilidade, garantindo uma estabilização e melhoria na atividade terapêutica dos fármacos (BHATTACHARYA et. al., 2021).

A atividade farmacológica dos nanomedicamentos está diretamente associada com as características físico-químicas destes. Sendo assim, a compreensão dos parâmetros físico-químicos e tamanho dessas partículas são essenciais para que haja uma potencialização na liberação do fármaco no sistema biológico indicado. (SAHA, e. al., 2020). Nesse sentido, o potencial zeta é calculado a partir da mobilidade eletroforética, no qual seu valor absoluto ideal é superior a 30 mV ( $< -30$  ou  $> 30$ mv) para estabilização das nanopartículas e evitar que haja agregação durante o armazenamento. (ELBRINK et. a., 2021).

As nanopartículas despertam interesse para uso clínico contra a leishmaniose devido a capacidade de serem fagocitados por macrófagos, que é a principal célula envolvida na infecção por leishmaniose, ocasionando assim um tratamento intracelular direcionado (Figura 2) (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; DE SOUZA et al., 2018). Essas células possuem receptores que internalizam eficientemente nanopartículas na faixa de 50-500 nanômetros (SIEFERT et al., 2016) e pode ser uma estratégia para o acúmulo do fármaco em órgãos ricos em macrófagos como baço, medula óssea e fígado (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Oyama et. al., (2019) publicou um estudo em que nanocarreadores de agentes quimioterápicos (Pluronic<sup>®</sup>, P-123 e F-127) contra os macrófagos, como *Leishmania*, foram considerados uma solução segura para tratamento futuro por causa de seus efeitos leishmanicida em amastigotas e promastigotas por meio de impactos na membrana mitocondrial.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e caracterizar um sistema nanoparticulado contendo o fármaco amino tiofênico SB-83 para uma futura terapia direcionada a leishmaniose.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- ✓ Obter nanopartículas com SB-83 através de duas técnicas de obtenção: nanoprecipitação e emulsão simples (O/A) /evaporação do solvente;
- ✓ Avaliar a eficiência de encapsulação do fármaco nas nanopartículas;
- ✓ Caracterizar os sistemas obtidos quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão;
- ✓ Validar o método para doseamento do SB-83 por espectroscopia de UV-Vis.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Desenvolvimento das nanopartículas**

As nanopartículas constituídas por nanocápsulas e nanoesferas foram desenvolvidas por dois métodos diferentes que serão descritos a seguir.

#### **4.1.1 Nanocápsulas e Nanoesferas contendo o SB-83 pelo método da Nanoprecipitação**

As nanocápsulas de PLA contendo o SB-83 foram obtidas pelo método da nanoprecipitação. A fase aquosa foi composta por 400 mg de Pluronic-F68<sup>®</sup> em 40 ml de água destilada. Na fase orgânica, foi realizada uma adição de 50 mg de PLA em 5 ml de acetona. Depois, utilizou-se 50mg de Lipoid<sup>®</sup> em 1 ml de metanol; e 100 mg de Mygliol<sup>®</sup> juntamente com 5 ml de acetona e 2 mg de SB-83. Por conseguinte, uniu as duas soluções que foram injetadas na solução aquosa e depois agitados a 25<sup>0</sup>C. Por fim, foi rota-evaporado à uma pressão negativa por cerca de 20 min à 37<sup>0</sup>C para remoção do solvente orgânico, obtendo a suspensão final.

As nanoesferas contendo o fármaco SB-83, também foram obtidas através do método da nanoprecipitação. Na fase aquosa utilizou-se 400mg de Pluronic-F68 e 40 ml de água destilada. E na fase orgânica foi utilizado 50 mg de PLA e 2 mg de SB-83 no qual ambos foram diluídos em 10 ml de acetona.

#### **4.1.2 Nanoesferas de PLA contendo o SB-83 pelo método da emulsão simples (o/a)**

As nanoesferas obtidas através do método emulsão simples (o/a), foram preparadas em duas fases: fase aquosa e fase orgânica. Na fase aquosa, foi utilizada 100 mg de álcool polivinílico (PVA) e diluída para 10mL de água, obtendo a solução a 1%. Na fase orgânica utilizou-se 50 mg de PLA juntamente com 2 mg do SB-83 e diluiu-se em 1 ml de diclorometano. A solução de PVA 1% foi vertida na fase orgânica e em seguida foram submetidas a três ciclos no sonicador durante 1 minuto com intervalos de 30 segundos. A emulsão resultante foi levada ao evaporador rotativo à pressão negativa por 20 min à 37<sup>0</sup>C para evaporar o solvente orgânico formando uma suspensão de nanopartículas.

## **4.2 Caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas**

### **4.2.1 - Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta**

O raio hidrodinâmico e o índice de polidispersão das nanopartículas foram

determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS, *Dynamic Light Scattering*) em equipamento Zetasizer (Nano ZS, Malvern). O potencial zeta das partículas foi avaliado a partir da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas e adicionadas em células eletroforéticas com potencial de  $\pm 150$  mV. E todas as medições foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

#### 4.2.2 A eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação avalia a concentração do fármaco incorporada ao sistema de liberação após a manipulação das formulações. A eficiência de encapsulação (EE%) do SB-83 nas nanopartículas de PLA foi determinada por espectroscopia UV-visível, pelo método direto e indireto.

Pelo método indireto, a suspensão de nanopartículas foi submetida a ultracentrifugação com velocidade de 40000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, diluído em metanol e analisado em comprimento de onda 392 nm. A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada em triplicata e calculada através da equação (1).

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade inicial} - \text{Quantidade final}}{\text{Quantidade inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, a Quantidade inicial é a quantidade inicial de SB-83 adicionada a formulação e a Quantidade final é a quantidade de SB83 não encapsulada presente no sobrenadante.

Para o método direto, o *pellet* resultante do processo de centrifugação foi ressuspensão em 2 mL de acetonitrila e submetido a três ciclos de agitação no vórtex para “quebra” do pellet de nanopartículas. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 50 $\mu$ l e esta foi diluída em metanol para volume final de 5 ml e analisado em comprimento de onda 392 nm. A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada em triplicata e calculada pela equação (2).

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade inicial}}{\text{Quantidade final}} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.3 Validação analítica

A validação analítica fornece evidência que um método analítico é aceitável para seu propósito pretendido. Neste estudo a confiabilidade do método foi avaliada segundo as diretrizes dadas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH, 1994) no qual foi testado os parâmetros de seletividade, limites de detecção e quantificação, exatidão, precisão, linearidade, gráfico analítico, sensibilidade e robustez, considerados nos processos de validação de métodos analíticos.

### 4.3.1 Especificidade

A especificidade foi verificada através das soluções do ponto médio da curva (8µg/mL) que foram submetidas a condições de estresse, resfriamento (-20°C) e aplicação de luz visível (fluorescente) por 24 horas. O cálculo para esse parâmetro e os demais foram realizados através do desvio padrão relativo percentual (DPR%) equação (3) e pela taxa de recuperação (%) equação (4).

$$DPR = \frac{DP}{MC} \times 100\% \quad (3)$$

Onde, DP é o desvio padrão e MC a média das concentrações obtidas.

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{C1 \times 100}{C2} \quad (4),$$

Onde, C1 é a concentração encontrada experimentalmente e C2 a concentração teórica.

### 4.3.2 Exatidão

A exatidão do método foi obtida a partir das absorbâncias das soluções de SB-83 em três níveis de concentração: 2 µg/mL (ponto baixo), 8 µg/mL (ponto médio) e 12 µg/mL (ponto alto) em dois dias por dois analistas. A exatidão foi expressa em desvio padrão relativo percentual (DPR %) e taxa de recuperação.

### 4.3.3 Precisão

A precisão pode ser expressa numericamente por meio da estimativa do desvio padrão. Na análise da precisão foi realizado a leitura da absorbância no espectrofotômetro das soluções de SB-83 em três pontos da curva, um baixo (2µg/mL), um médio (8µg/mL) e um alto (12µg/mL). O experimento foi realizado em três níveis de precisão: a repetibilidade (precisão intra-corrída) que foi realizada com leituras duplicadas das concentrações definidas por dois analistas; e a precisão intermediária (inter-corrída) conduzida por dois analistas e em dias distintos. Por fim, a precisão foi expressa em desvio padrão relativo percentual (DPR %) equação (3). Nesse estudo, foi adotado o valor de Desvio Padrão Relativo percentual menor que 5,0 %, conforme recomendado pelo ICH.

### 4.3.4 Linearidade

A linearidade foi observada a partir da curva analítica com sete níveis de concentração: 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/mL em triplicata. Os resultados obtidos foram

analisados estatisticamente e determinado o coeficiente de correlação linear ( $r$ ). Segundo o ICH, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) é de 0,999, logo, nesse estudo foi adotado essas diretrizes.

#### 4.3.5 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da construção das curvas analíticas sendo a menor concentração encontrada o LQ. O LD foi calculado utilizando a equação (5) baseado no desvio padrão e na inclinação da curva analítica, como recomendado pelo ICH.

$$LD = \frac{\sigma}{b} \times 3,3 \quad (5)$$

Onde,  $\sigma$  é o desvio padrão médio do intercepto  $y$  e  $b$  a inclinação da curva.

O limite de quantificação de uma amostra é a menor quantidade do analito que pode ser detectada e quantificada com exatidão e precisão (ICH, 2005). O LD foi calculado utilizando a equação (6) como recomendado pelo ICH.

$$LQ = \frac{\sigma}{b} \times 10 \quad (6)$$

Onde,  $\sigma$  é o desvio padrão médio do intercepto  $y$  e  $b$  a inclinação da curva.

#### 4.3.6 Robustez

A robustez foi avaliada através das soluções do ponto médio da curva (8  $\mu\text{g/mL}$ ) que foram submetidas a pequenas modificações na metodologia de preparo. Inicialmente as soluções foram dissolvidas em solventes de 3 marcas de diferentes fabricantes (Quimica Moderna<sup>®</sup>, Sol-teh e J.T. Baker), no qual foi realizada uma diluição das soluções de 8  $\mu\text{g/mL}$  no solvente e foi avaliado as absorbâncias no espectrofotômetro.

Posteriormente, as soluções do ponto médio da curva (8  $\mu\text{g/mL}$ ) foram submetidas a uma leitura no espectrofotômetro variando em diferentes comprimentos de ondas  $\lambda$  (390, 393, 394 e 395 nm). Por fim, a avaliação se baseou na taxa de recuperação (equação 4) e do DPR % (equação 3).

#### 4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do *R-Studio* e do *Excel* 2016.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES:

### 5.1 Caracterização morfológica e físico-química das nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas com êxito pelos métodos propostos, entretanto as nanocápsulas apresentaram instabilidade após a sua formação, assim como as nanoesferas obtidas pelo método da emulsão simples, de forma que, após a preparação, essas formulações apresentaram precipitado de fármaco no frasco, indicando que uma concentração do fármaco não foi encapsulada no sistema. Por esse motivo, a nanoesfera obtida pelo método da nanoprecipitação (NE-SB83) foi escolhida para seguir com o estudo.

#### 5.1.1 Determinação do diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão

O potencial zeta mede a mobilidade eletroforética das partículas e expõe a diferença das cargas entre as camadas na linha de cisalhamento, ou seja, a carga da nanopartícula e da carga presente na linha de cisalhamento. A preparação da amostra para medição inclui que a composição do meio dispersante seja totalmente descrita, assim, o potencial zeta avalia o controle de qualidade para fornecer informações sobre a estabilidade das dispersões. E, é considerado como um meio de prever o comportamento *in vivo*, portanto, o desempenho biológico das nanopartículas (SAMEUT BOUHAİK et. al., 2013).

Nesse sentido, os resultados encontrados antes e depois da encapsulação foram de  $-19,3 \pm 0,35$  mV e  $-20,4 \pm 0,65$  mV respectivamente, sugerindo um potencial zeta negativo (Tabela 1). Ademais, de acordo com a classificação do potencial zeta, destaca-se valores de  $\pm 0-10$  mV como altamente instáveis,  $\pm 10-20$  mV relativamente estáveis,  $\pm 20-30$  mV moderadamente estáveis e  $> \pm 30$  mV altamente estável (BHATTACHARJEE, 2016; PATEL; AGRAWAL, 2011).

**Tabela 1** - Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas

Formulação	Diâmetro médio (nm)	P.D.I	Potencial zeta (mV)
NE-BRANCA	180,6 ( $\pm 0,75$ )	0,152 ( $\pm 0,06$ )	- 19,3 ( $\pm 0,35$ )
NE-SB83	205,7 ( $\pm 4,75$ )	0,274 ( $\pm 0,04$ )	- 20,4 ( $\pm 0,65$ )

A determinação do diâmetro das partículas (nm) foi realizada após diluição da amostra em água deionizada para uma maior dispersão das partículas. Primeiramente, os resultados do diâmetro médio foram submetidos ao teste do Shapiro-Wilk (NE-BRANCA,  $p = 0,2622$ ) e

(NE-SB83,  $p = 0,3796$ ), indicando que os dados apresentaram normalidade. Sucessivamente, os resultados obtidos do diâmetro médio das nanopartículas foram submetidos ao Test T pareado onde os resultados apresentaram valores significativos para as diferenças entre as médias ( $p = 0,0319$ ), logo, verifica-se que a adição do SB-83 contribui para o aumento do tamanho médio da nanopartícula e esse tamanho encontrado favorece a captação pelos macrófagos (Tabela 8). E por fim, as nanopartículas com o fármaco obtiveram um índice de polidispersão (P.D.I) inferior a 0,3, indicando homogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão.

### 5.1.2 Análise de eficiência de encapsulação

A taxa de encapsulação da nanopartícula com o SB-83 foi realizada pelo método direto e indireto. Assim, por meio do método indireto e direto, os valores da eficiência de encapsulação obtidos foram de 62,7% ( $\pm 0,12$ ) e 88,9% ( $\pm 0,87$ ) respectivamente, através do comprimento de onda de 392nm. Logo, os resultados sugerem que essas taxas obtidas para a taxa de encapsulação foram satisfatórias por ambos dos métodos analisados.

## 5.2 Validação Analítica

### 5.2.1 Especificidade

A especificidade avalia se o método adotado é eficaz em avaliar a presença de componentes que podem interferir na matriz dos dados. Nesse estudo as amostras foram submetidas a condições de estresse (Tabela 2) na concentração média da curva (8  $\mu\text{g/mL}$ ) a fim de detectar a ocorrência de fatores interferentes na degradação do fármaco. Conforme os resultados obtidos, as amostras submetidas a condições de resfriamento expostas a luz apresentaram um desvio padrão relativo inferior a 5%, uma alta taxa de recuperação do fármaco nas amostras, adotável como aceitável pelo ICH e indicando que o método é capaz de detectar e quantificar a presença de constituintes que possa alterar a formulação.

**Tabela 2** - Valores de especificidade para amostra padrão em condições de estresse

Condição de estresse:	Concentração	Concentração	DPR	Taxa de
	teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Real ( $\mu\text{g/mL}$ )	(%)	Recuperação (%)
Resfriamento (- 20°C)	8	6,7078	3,90	111,7968094
Luz visível	8	6,6322	3,59	110,5373636

Desse modo, de acordo com a análise apresentada na Tabela 2, é possível observar que as variáveis testadas interferem na taxa de recuperação do SB-83, indicando que é necessário cuidados na manipulação do fármaco, em condições de resfriamento e exposição à luz.

### 5.2.2 Exatidão

A exatidão do método proposto foi avaliada em três níveis de concentração: um baixo (2 µg/mL), um médio (8µg/mL) e um alto (12µg/mL). Os valores encontrados estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3** – Estudo de Exatidão (DPR, Taxa de Recuperação e Exatidão)

Concentração teórica (µg /mL)	DPR (%)	Taxa de Recuperação (%)
2	2,67%	101,13%
8	0,57%	98,17%
12	2,87%	102,92%

O ICH preconiza que a taxa de recuperação deve ser de 100±5% e o DPR máximo deve ser 5%. Logo, os resultados mostram que o método se mostra exato para as concentrações baixa (2 µg/mL), média (8µg/mL) e alta (12µg/mL) com valores variando entre 0,1758 ± 0,9518 ( $p < 0,01$ ) e DPR inferior a 5%.

### 5.2.3 Precisão

Na análise de precisão foi realizado a leitura da absorbância das soluções do SB-83 em três pontos da curva, um baixo (2µg/mL), um médio (8µg/mL) e um alto (12µg/mL). E, em três níveis de precisão: a repetibilidade (precisão intra-corrída), a precisão intermediária (inter-corrída) por analistas e dias distintos (Tabela 4 e Tabela 5). A repetibilidade apresentou um DPR inferior a 5%, indicando que está dentro dos parâmetros aceitáveis pelo ICH (Tabela 4). Através do teste T ( $p > 0,4$ ), considera-se as absorbâncias estaticamente iguais.

**Tabela 4** – Repetibilidade

(continua)

Repetibilidade (n=9)		
Concentração teórica (8 µg/mL <sup>-1</sup> )	Absorbâncias (n=9)	DPR (%)
8	0,652	3,59%
8	0,689	

Tabela 4 – Repetibilidade

(conclusão)

Repetibilidade (n=9)	
Concentração teórica (8 µg/mL <sup>-1</sup> )	Absorbâncias (n=9)
8	0,655
8	0,626
8	0,675
8	0,634
8	0,624
8	0,632
8	0,629

Tabela 5 – Níveis de precisão

Concentração teórica (µg /mL)	Precisão Intermediária					
	Analista 1			Analista 2		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
	DPR (%)	DPR (%)	DPR (%)	DPR (%)	DPR (%)	DPR (%)
2	3,28%	2,09%	3,36%	2,67%	0,65%	3,83%
8	5,02%	3,79%	0,66%	3,14%	4,15%	0,64%
12	3,13%	1,97%	1,20%	2,87%	3,54%	0,52%

A precisão foi expressa em desvio padrão relativo percentual (DPR %) (equação 3). O valor do Desvio Padrão Relativo percentual adotado como aceitável foi menor que 5%, no qual os resultados apresentados estão dentro dos parâmetros recomendados pelo ICH, pois todos os valores foram menores que 5%. Inicialmente para avaliar os dados da precisão intermediária foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk (Tabela 6) para verificar a normalidade dos dados, no entanto, apenas o par de médias da concentração 8 µg/mL (analisa 1 e analista 2) apresentou normalidade ( $p > 0,005$ ). Sendo assim, as concentrações de 8 µg/mL para o analista 1 e analista 2 foram confrontadas por meio do Teste T para amostras independentes, onde foi obtido o p-valor  $> 0,05$ , significando que as médias podem ser consideradas estatisticamente iguais, indicando que o método está altamente preciso.

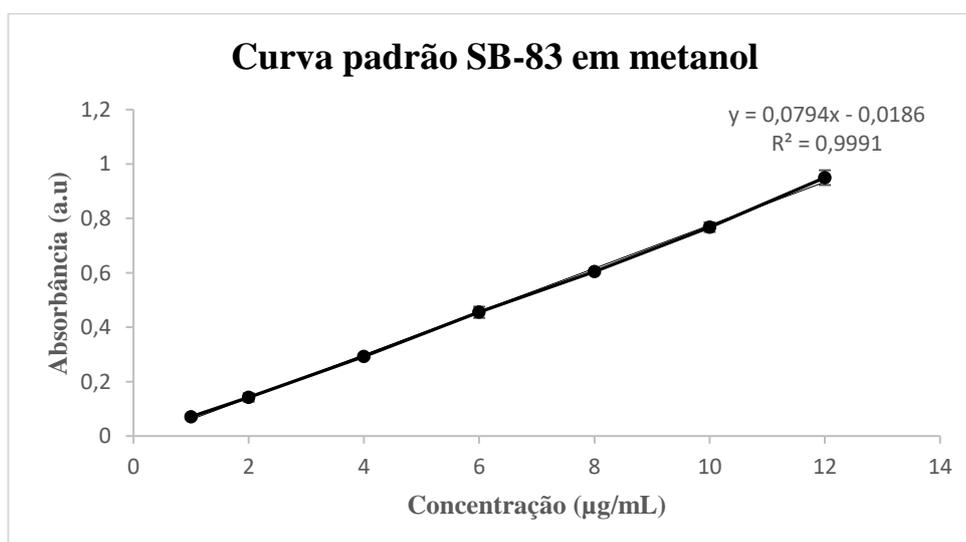
**Tabela 6** - Teste de normalidade do Shapiro-Wilk

Concentrações	Analista 1	Analista 2
2 µg/mL	p = 0.1890	p = 0.0053
8 µg/mL	p = 0.5343	p = 0.1150
12 µg/mL	p = 0.01379	p = 0.8506

Posteriormente para a concentração baixa (2µg/mL) e para a concentração alta (12µg/mL) que não apresentou normalidade (Tabela 5), foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para diferenças de médias, e os resultados sugerem que não há diferenças para essas concentrações (2µg/mL, p = 0,44) e (12µg/mL, p = 0,26), indicando que o método está preciso para os dois analistas.

#### 5.2.4 Linearidade

Os resultados encontrados demonstram que o método apresentou faixa de linearidade de 1 a 12 µg/mL e a curva analítica pode ser descrita pela equação da reta  $y = 0,0794x + 0,0186$  obtida pelo método dos mínimos quadrados (Figura 4). Observa-se uma completa linearidade, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9991, considerando que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser  $r = 0,999$  (ICH, 2005).

**Figura 4** - Gráfico de Linearidade do SB-83

### 5.2.5 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ):

A determinação desses parâmetros garante a quantificação e determinação do analito desde os pontos iniciais de amostragem. O LD e LQ foram calculados a partir do desvio padrão da resposta e do declive obtido a partir da regressão linear da curva de calibração. Os valores de LD e LQ foram de 0,36 µg/mL e 1,11 µg/mL, respectivamente.

### 5.2.6 Robustez:

Os testes de robustez indicam os fatores que podem influenciar significativamente a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório. Assim, a avaliação da robustez em um procedimento de validação analítica deve mostrar confiabilidade de uma análise com variações nos parâmetros de preparo. Então se as medidas mostrarem que o método é susceptível a variação, as condições analíticas devem ser controladas ou uma declaração de precaução deve ser anexada ao procedimento (ICH, 2005).

**Tabela 7** – Percentual de Recuperação da Robustez variando as marcas de fabricação dos solventes:

Fabricante dos solventes:	Recuperação (%)
Química Moderna ®	78,8098
Sol-teh ®	91,2468
J.T. Baker ®	87,7046

**Tabela 8** – Percentual de Recuperação da Robustez variando o comprimento de onda:

Comprimentos de onda (λ)	Concentração Real (c <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)
390	7,2746	90,9320
391	7,2871	91,0894
393	7,2871	90,7745
394	7,2620	90,6171

Deste modo, o teste foi realizado através de pequenas alterações nos parâmetros analíticos e utilizadas para esse teste o ponto médio da curva (8 µg/ml) em diferentes marcas de solventes (Tabela 7) e variando o comprimento de onda (Tabela 8). Logo, com base nos resultados do percentual de recuperação em que foi variado os fabricantes dos solventes e os

comprimentos de onda, os resultados demonstraram uma taxa de recuperação inferior ao mínimo recomendado (95%), indicando pequenas variações nas condições de análise do método.

## 6 CONCLUSÃO

As nanopartículas do SB-83 foram desenvolvidas com sucesso pela técnica da nanoprecipitação e emulsão simples (o/a), porém foi escolhida apenas a formulação obtida pela nanoprecipitação para posteriores estudos. Os resultados encontrados no desenvolvimento do método analítico por espectrofotometria seguiram todas as diretrizes recomendadas pelo ICH, podendo nos assegurar que a técnica utilizada garante confiabilidade, além de ser uma técnica rápida, sensível, precisa e exata, sendo essencial para a análise do fármaco. Por fim, na caracterização morfológica e físico-química, verificou-se que a nanoformulação apresentou um potencial zeta negativo, que garantiu estabilidade e demonstrou homogeneidade do diâmetro. No entanto, para uma futura aplicação clínica do nanossistema, torna-se necessários estudos de estabilidade e avaliação *in vitro* para confirmar os efeitos farmacológicos do sistema em cepas de *Leishmania amazonenses*. Portanto, para superar os desafios farmacêuticos encontrados no atual tratamento da leishmaniose, essa formulação nanoparticulada contendo o SB-83 possui fortes indícios de se tornar um futuro medicamento direcionado à parasitose, porém, como relatado, é imprescindível estudos mais avançados de avaliação de parâmetros de estabilidade e testes *in vitro* para que conduza uma maior confiabilidade para o sistema nanoparticulado.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. A. S. et al. Solid-phase extraction of pesticide residues from surface water using a lab-made lower-retention sorbent. **Quimica Nova**, v. 41, n. 6, p. 641–647, 2018.
- ALCÂNTARA, L. M. et al. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 3, p. 430–439, 2018.
- ALTMeyer, C. et al. Tamoxifen-loaded poly(L-lactide) nanoparticles: development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. **Materials Science & Engineering C**, v. 60, p. 135–142, 2015.
- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, et al. (2012) **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence**. **PLOS ONE**, v.7; issue 5; e 35671, 2012
- AMINU, N. et al. The influence of nanoparticulate drug delivery systems in drug therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, n. May, p. 101961, 2020.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86-90, 2017
- AL-KAMEL, M. A. N. Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. **Clinical Skin Cancer**, v. 2, n. 1–2, p. 54–58, 2017.
- ANVISA. RDC N. 166, de 25 de julho de 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 2017, p. 1–21, 2017.
- BHATTACHARYA, S. Fabrication of poly(sarcosine), poly (ethylene glycol), and poly (lactic-co-glycolic acid) polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 61, n. July 2020, p. 102194, 2021.
- DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Delivery of vanillin b poly (lactic acid) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity. **Materials Science and Engineering C**, v. 62, p. 1–8, 2016.
- D. QUINTANAR, E. ALLÉMANN, H. FESSI, E. Doelker **Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers**  
Drug  
Dev. Ind. Pharm., 24 (1998), pp. 1113-1128
- DAS, L. et al. Validation and comparison of analytical methods for the determination of uric acid in pulses and cereals by salting out assisted extraction by Rapid resolution liquid

- chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1180, n. August, p. 122894, 2021.
- DE SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUKUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LÖBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1–2, p. 421–431, 2018.
- DELGADO, A. V. et al. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, n. 2, p. 194–224, 2007.
- ELBRINK, K. et al. Application of solid lipid nanoparticles as a long-term drug delivery platform for intramuscular and subcutaneous administration: In vitro and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 163, n. April, p. 158–170, 2021.
- EL-SAY, K. M.; EL-SAWY, H. S. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1–2, p. 675–691, 2017.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.
- FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012.
- GEORGE, A.; SHAH, P. A.; SHRIVASTAV, P. S. Natural biodegradable polymers based nanoformulations for drug delivery: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 561, p. 244–264, 2019.
- GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1995–1998, 2010.
- HARSHA, S. N. et al. Nanoparticle formulation by Büchi b-90 nano spray dryer for oral mucoadhesion. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 273–282, 2015.
- ICH, H ARMONISED T RIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: v. 1994, n. November 1996, 2005.
- KAMMONA, O.; TSANAKTSIDOU, E. Nanotechnology-aided diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 605, n. May, p. 120761, 2021.

- KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 339–367, 2018.
- KHURANA, A. et al. Role of nanotechnology behind the success of mRNA vaccines for COVID-19. **Nano Today**, v. 38, n. November 2020, p. 101142, 2021.
- KUMAR SINGH, P. et al. Macrophage targeted amphotericin B nanodelivery systems against visceral leishmaniasis. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 258, n. May, p. 114571, 2020.
- JUNIOR, E. J. A. G. et al. UV spectrophotometry analytical method validation for quantification of paracetamol in oral solution. **Revista Virtual de Quimica**, v. 9, n. 4, p. 1747–1759, 2017.
- LEGRAND, P.; DESDION, A.; BOCCADIFUOCO, G.; WOJCICLI, D.A. et al. Development of an HPLC/UV method for the evaluation of extractables and leachables in plastic: Application to a plastic-packaged calcium gluconate glucoheptonate solution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.155, p.298-305, 2018.
- MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M.; GREMIÃO, M. P. D. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA-PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 266–271, 2010.
- MARCET, I. et al. Production and characterisation of biodegradable PLA nanoparticles loaded with thymol to improve its antimicrobial effect. **Journal of Food Engineering**, v. 239, n. November 2017, p. 26–32, 2018.
- MOSAIAB, T. et al. Carbohydrate-based nanocarriers and their application to target macrophages and deliver antimicrobial agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 151–152, p. 94–129, 2019.
- NAFARI, A. et al. Nanoparticles: New agents toward treatment of leishmaniasis. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 10, p. e00156, 2020.
- OMS, O. Informe Epidemiológico das Américas. **Informe de Leishmanioses Nº 7**, v. 1, p. 1–27, 2019.
- OLIVEIRA, S. S. C. et al. Overcoming multi-resistant leishmania treatment by nanoencapsulation of potent antimicrobials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, n. 8, p. 2123–2140, 2021.
- OSPINA-VILLA, J. D. et al. Encapsulation of proteins from *Leishmania panamensis* into PLGA particles by a single emulsion-solvent evaporation method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, n. February, p. 1–7, 2019.

- OYAMA, J. et al. Potential of Pluronic® P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-Leishmania chemotherapy. **Acta Tropica**, v. 192, n. January, p. 11–21, 2019.
- PRASANNA, P. et al. Current status of nanoscale drug delivery and the future of nanovaccine development for leishmaniasis – A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111920, 2021.
- READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154, 2014.
- RODRIGUES, K. A. da F.; DIAS, C. N. de S.; NÉRIS, P. L. do N.; ROCHA, J. da C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A. de; KEESEN, T. de S. L.; OLIVEIRA, T. B. de; LIMA, M. do C. A. de; BALLIANO, T. L.; AQUINO, T. M. de; MOURA, R. O. de; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. de. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1–14, 2015.
- RODRIGUES, K. A. da F.; SILVA, D. K. F.; SERAFIM, V. de L.; ANDRADE, P. N.; ALVES, A. F.; TAFURI, W. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOBRAL, M. V.; MOURA, R. O. de; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. de. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1670–1678, 2018.
- SAHA, D. et al. Role of physicochemical parameters associated with the hydrophobic vs. amphiphilic biodegradable polymer nanoparticles formation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, p. 113977, 2020.
- SAMEUT BOUHAİK, I. et al. Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Application to the modeling of their aggregation kinetics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 406, p. 75–85, 2013.
- SÁNCHEZ-MORENO, M. et al. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against leishmania infantum and leishmania braziliensis species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 387–397, 2012.
- SARATH K. YANDRAPU, ARUN K. UPADHYAY, J. MARK PETRASH, AND U. B. K. Nanoparticles in Porous Microparticles Prepared by Supercritical Infusion and Pressure Quench Technology for Sustained Delivery of Bevacizumab. **Moleculale pharmaceutical**, v. 10, n. 12, p. 4676–4686, 2014.

SARWAR, H. S. et al. Redox biology of Leishmania and macrophage targeted nanoparticles for therapy. **Nanomedicine**, v. 12, n. 14, p. 1713–1725, 2017.

SIEFERT, A. L.; EHRLICH, A.; CORRAL, M. J.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MCMAHON-PRATT, D.; FAHMY, T. M. Immunomodulatory nanoparticles a meliorate disease in the Leishmania (Viannia) panamensis mouse model. **Biomaterials**, v. 108, p. 168–176, 2016.

SILVA FERREIRA DE CARVALHO, I. P. et al. Treatment With Liposomal Amphotericin B for All Confirmed Cases of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Budget Impact Analysis. **Value in Health Regional Issues**, v. 23, p. 77–84, 2020.

SINGH, O. P. et al. Envisioning the innovations in nanomedicine to combat visceral leishmaniasis: For future theranostic application. **Nanomedicine**, v. 14, n. 14, p. 1911–1927, 2019.

TAKAHASHI, H. T.; NOVELLO, C. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; DE MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of Porophyllum ruderale (Jacq.) Cass. **Molecules**, v.16, n. 5, p. 3469–3478, 2011.

TYLER, B. et al. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 163–175, 2016.

VANDEPUTTE, M. et al. Epidemiology, clinical pattern and impact of species-specific molecular diagnosis on management of leishmaniasis in Belgium, 2010–2018: A retrospective study. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 38, p. 101885, 2020.

VALIDATION of analytical methods: definitions and terminology. London: ICH, 1995. 5 p. (ICH Harmonised Tripartite Guideline). (CPMP/ICH/381/95).

VON STEBUT, E.; TENZER, S. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with Leishmania major. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 1, p. 206–214, 2018.

WANG, W. et al. Poly (lactic acid)/ chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 514–520, 2015.