



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA SOUZA RIBEIRO COSTA

NANOESTRUTURAS BIOPOLIMÉRICAS PARA VEICULAÇÃO
DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COM POTENCIAL
LEISHMANICIDA

CAMPINAS

2016

JULIANA SOUZA RIBEIRO COSTA

**NANOESTRUTURAS BIOPOLIMÉRICAS PARA VEICULAÇÃO DE
PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COM POTENCIAL LEISHMANICIDA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do Título de Mestra em
Ciências, na área de concentração em
Fármacos, Medicamentos e Insumos para
Saúde.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA JULIANA SOUZA RIBEIRO COSTA
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LAURA DE
OLIVEIRA NASCIMENTO.

Orientador: PROFA. DRA. LAURA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/16588-7

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823n Costa, Juliana Souza Ribeiro, 1986-
Nanoestruturas biopoliméricas para veiculação de peptídeos
antimicrobianos com potencial leishmanicida / Juliana Souza Ribeiro Costa. –
Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Laura de Oliveira Nascimento.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Nanopartículas. 2. *Leishmania*. 3. Polimixina B. I. Nascimento, Laura de
Oliveira, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Nanostructured biopolymers to deliver antimicrobial peptides with leishmanicidal activity

Palavras-chave em inglês:

Nanoparticles

Leishmania

Polymyxin B

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Laura de Oliveira Nascimento [Orientador]

Priscila Gava Mazzola

Kelly Aparecida Kanunfre

Data de defesa: 28-07-2016

Programa de Pós-Graduação: Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 28 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Laura de Oliveira Nascimento

Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola

Profa. Dra. Kelly Aparecida Kanunfre

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus irmãos e meu marido, que não mediram esforços para que eu chegasse a esta etapa da minha vida. A todos aqueles que de alguma forma estiveram perto de mim. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro melhoram tudo o que eu tenho produzido na vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, família e amigos.

Aos meus pais, que sempre se esforçaram para que eu chegasse até aqui. Obrigada por todo apoio, incentivo e amor.

Aos meus irmãos, Alex e Bruno, por todo o apoio, conversas, ligações e risadas.

Ao Alan, meu marido, que mesmo durante esse período de tensão pré-defesa se manteve paciente. Obrigada por todo amor, carinho e pelo Lucas, que além de carinhoso, faz de mim uma pessoa melhor e mais paciente a cada dia.

A professora Laura, pela orientação, conselhos, apoio, confiança e pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao professor Paulo, Edite, Mussya e todos do IMT-USP que me ajudaram, e muito, na condução deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, por todos os momentos nesses dois anos. Vivi, obrigada pela companhia e pelas conversas diárias. Danilo, obrigada por me fazer rir e por me deixar brigar com você quando eu precisava extravasar. Marília, não sei o que seria de mim e deste trabalho sem a sua ajuda! Além de “minha aluna de IC”, se tornou uma amiga. Érica, Luiza e Raniery, apesar do pouco tempo de convivência também foram essenciais.

Aos colegas do Labiotec e do Biomembranas, que me ajudaram com técnicas novas, ou mesmo com conversas que me mostravam que eu não era a única nessa situação.

Ao professor Marcelo, que desde a graduação se mostrou presente como alguém com quem eu posso contar, pelas risadas e pelos conselhos.

A banca examinadora, pelo tempo dedicado a avaliação deste trabalho.

A FAPESP e a FAEPEX-UNICAMP pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Leishmanioses são patologias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose têm alta toxicidade, são de uso hospitalar e necessitam de infusões prolongadas. Nesse contexto, nanopartículas (NPs) de quitosana, gelatina e poli n-butil cianoacrilato (PBCA) foram produzidas para subsequente incorporação de polimixina B, um peptídeo antimicrobiano com potencial ação leishmanicida. As NPs formuladas foram caracterizadas por seu tamanho, potencial ζ , eficiência de encapsulação, perfil de liberação e morfologia, além da avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica das formulações. NPs de quitosana apresentaram tamanho e potencial ζ adequados, que não mudaram significativamente com a incorporação da polimixina B, porém apresentou baixa eficiência de encapsulação, não se mostrando adequada ao estudo. NPs de gelatina apresentaram eficiência de encapsulação de 48,2 %, tamanho e potencial ζ satisfatórios, porém se mostraram inviáveis para veiculação de fármacos leishmanicidas, pois induziram crescimento das promastigotas em cultura. NPs de PBCA (PBCAnp) apresentaram tamanho médio de 216,9 nm, que não se modificou significativamente com a adição de polimixina B. O potencial ζ médio passa de negativo nas amostras de NPs vazias para positivo (NPs com polimixina B). A eficiência de encapsulação foi inversamente proporcional ao aumento de polimixina B. O perfil de liberação mostrou uma liberação sustentada de polimixina B quando incorporada nas NPs, adequada a internalização por macrófagos infectados. O valor de IC50 encontrado para a polimixina B livre foi de 55 μ M. A formulação PBCAnp-p5 atingiu IC50 de 3,7 μ M (diluição da NP = 1:980). A NP vazia também apresentou atividade leishmanicida (diluição da NP = 1:659), sendo responsável em grande parte pela queda do IC50 da polimixina B. Todas as formulações apresentaram atividade citotóxica em macrófagos nas concentrações de IC50 determinadas para promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As NPs de PBCA com polimixina B se mostraram inadequadas como leishmanicida, mas adequadas como bactericida ou ainda como carreador funcionalizado para outros fármacos leishmanicidas de alto IC50.

Palavras-chave: nanopartícula, *Leishmania*, polimixina B.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoans of the genus *Leishmania*. The drugs available for treatment of leishmaniasis are highly toxic, require hospitalization and prolonged infusions. Therefore, chitosan nanoparticles, gelatin and poly n-butyl cyanoacrylate (PBCA) were produced for subsequent incorporation of polymyxin B, an antimicrobial peptide with a potential leishmanicide action. Formulated nanoparticles were characterized by their size, ζ potential, encapsulation efficiency, release profile and morphology, as well as evaluation of leishmanicide and cytotoxic activity of the formulations. Nanoparticles of chitosan showed adequate size and ζ potential, which did not change significantly with the incorporation of polymyxin B, but showed low encapsulation efficiency, not adequate to the study. Gelatin nanoparticles showed encapsulation efficiency of 48.2%, satisfactory size and ζ potential, but the gelatin nanoparticles proved unfeasible for drug delivery leishmanicidal in general, as induced growth of promastigotes in culture. PBCA nanoparticles (PBCAnp) had an average size of 216.9 nm, which did not change significantly with the addition of polymyxin B. The average ζ potential becomes negative (the empty NP samples) to positive (NPs polymyxin B). The encapsulation efficiency was inversely proportional to the increase of polymyxin B. The release profile showed a sustained release of polymyxin B when incorporated in nanoparticles, adequate for internalization by infected macrophages. The IC₅₀ found for the polymyxin B free was 55 mM. The PBCAnp p5 formulation reached IC₅₀ 3.7 μ M (nanoparticle dilution = 1: 980). The empty nanoparticle also presented leishmanicidal activity (dilution of the nanoparticle in IC₅₀ = 1: 659), accounted in large part to polymyxin B IC₅₀ decrease. All formulations showed cytotoxic activity in macrophages in the IC₅₀ concentrations for extracellular promastigotes of *Leishmania amazonensis*. The PBCA nanoparticles with polymyxin B proved inadequate as leishmanicide but adequate as a bactericide or as functionalized carrier for other drugs with high IC₅₀.

Keywords: nanoparticle, *Leishmania*, polymyxin B.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Leishmania</i> : (a) forma promastigota e (b) forma amastigota intracelular.	16
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> ssp.	17
Figura 3 – LTA: (a) lesão cutânea múltipla. Lesões ulceradas, pequenas, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; (b) lesão ulcerada única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso.	19
Figura 4 – LTA – cão com lesão de focinho e lábios.	20
Figura 5 – Estrutura da Polimixina B	24
Figura 6 – Mecanismo da formação de NPs de quitosana com TPP por interação iônica.	26
Figura 7 – Mecanismo de polimerização de alquil cianoacrilato.	27
Figura 8 – Distribuição de tamanho de partícula (Size) em função da intensidade de espalhamento de luz (Intensity) medidos por DLS. As amostras correspondem a triplicata de NPs de quitosana vazia, produzidas em dias diferentes (representados por cores diferentes).	40
Figura 9 – Curva de calibração para determinação de polimixina B pelo método BCA. Cada ponto da curva é respectivo a média da densidade ótica medida em triplicata. ...	41
Figura 10 – Distribuição de tamanho de partícula (Size) em função da intensidade de espalhamento de luz (Intensity) medidos por DLS. As amostras correspondem a triplicata de NPs de gelatina com polimixina B incorporada na proporção 1:1 (representadas por cores diferentes).	46
Figura 11 – Perfil de liberação da polimixina B livre e nanoencapsulada (PBCAnp-p5), realizada em células de Franz, em sextuplicata. Porcentagem de polimixina B liberada em função do tempo (horas), medidas por micro BCA.	55
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura de PBCAnp-b, seca a temperatura ambiente.	56
Figura 13 – Porcentagem de sobrevivência de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em função da concentração de polimixina B.	57
Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em função da concentração de PBCAnp-b e PBCAnp-p5.	58

Figura 15 – Porcentagem de sobrevivência dos macrófagos peritoneais extraídos de camundongos BALB/C em função da concentração de polimixina B, PBCAnp-p5 e PBCAnp-b.59

Figura 16 – Macrófagos (a) sem tratamento e sem infecção; (b) sem tratamento, infectados; (c) infectados e tratados com Polimixina B 100 µg/mL; (d) infectados e tratados com Polimixina B 50 µg/mL; (e) infectados e tratados com Polimixina B 25 µg/mL; (f) infectados e tratados com PBCAnp-p5 20 µg/mL; (g) infectados e tratados com PBCAnp-p5 10 µg/mL; (h) infectados e tratados com PBCAnp-p5 5 µg/mL; (i) infectados e tratados com PBCAnp-b 20 µg/mL; (j) infectados e tratados com PBCAnp-b 10 µg/mL; (k) infectados e tratados com PBCAnp-b 5 µg/mL.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número e proporção de casos de Leishmaniose cutânea e mucosa por região americana, em 2013).	18
Tabela 2 – Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo OMS e Ministério da Saúde.....	21
Tabela 3 – Variação de parâmetros de processo para produção de NPs de gelatina....	43
Tabela 4 – Resultados da variação de parâmetros na produção de NPs de gelatina. Valores médios de experimentos realizados em triplicata.....	44
Tabela 5 – Tamanho médio e potencial zeta, medidos por DLS. As amostras correspondem a triplicata de NPs de PBCA com e sem polimixina B incorporada.	49
Tabela 6 – Medidas realizadas, em triplicata, por NTA das PBCAnp-b, PBCAnp-p1, PBCAnp-p5 e PBCAnp-p10.....	50
Tabela 7 – Eficiência de encapsulação e quantidade de fármaco encapsulada nas NPs formuladas. As amostras correspondem a triplicata de NPs.....	51
Tabela 8 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-b através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.	52
Tabela 9 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-p1 através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.	53
Tabela 10 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-p5 através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.	53
Tabela 11 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-p10 através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.	54
Tabela 12 – Observações realizadas nas lâminas de macrófagos (triplicata), comparados a viabilidade celular (MTT) e a produção de NO.....	62
Tabela 13 – Resultados do teste de MIC de polimixina B livre e de NPs de PBCA com e sem incorporação de polimixina B.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem

° C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μm – Micrometro

μM – Micromolar

AMP – Peptídeos antimicrobianos

ATCC – *American Type Culture Collection*

BaSO₄ – Sulfato de bário

BCA – Ácido Bicinconínico

BOD – *Biological Oxygen Demand*

CDC – Controle de Doenças dos Estados Unidos

CEUA – Comissão de Ética no uso de animais

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cP – Centipoise

DE50 – Dose Eficaz 50%

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

DO – Densidade ótica

EE – Eficiência de encapsulação

g – Grama

h – Hora

IC50 – Concentração que inibe 50% de crescimento microbiano

IMT – Instituto de Medicina Tropical

ISO – *International Organization for Standardization*

kDa – Quilodalton

kg – Quilograma

LPS – Lipopolissacarídeo

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

M – Molar

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg – Miligrama

MIC – Concentração Inibitória Mínima

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milimetro

MTT – Brometo de 3-metil-[4- 5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio

mV – Milivolt

nm – Nanometro

NO – Óxido nítrico

NP – Nanopartícula

NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PACA – Poli alquil cianoacrilato

PBCA – Poli (n-butil cianoacrilato)

PBCAnp-b – Nanopartícula de PBCA vazia

PBCAnp-p1 – Nanopartícula de PBCA com 1 mg/mL de polimixina B

PBCAnp-p10 – Nanopartícula de PBCA com 10 mg/mL de polimixina B

PBCAnp-p5 – Nanopartícula de PBCA com 5 mg/mL de polimixina B

PDI – Índice de polidispersividade

PGA – Ácido poliglicólico

PLA – Copolímero de ácido polilático

PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)

PMMA – Polimetacrilato de metila

rpm – Rotações por minuto

TPP – Tri-polifosfato de sódio

UI – Unidade internacional

x g – Unidade de velocidade de rotação

ζ – Zeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Justificativa	15
1.2 Leishmaniose	16
1.3 Tratamentos atuais para leishmanioses no Brasil	20
1.4 Peptídeos antimicrobianos (AMPs) como alternativa para o tratamento de leishmanioses	22
1.5 Polimixina B como potencial agente leishmanicida	23
1.6 Sistemas nanoestruturados poliméricos para liberação de fármacos	24
1.7 Sistemas nanoestruturados utilizados para veiculação de fármacos leishmanicidas	27
1.8 Sistemas nanoestruturados para veiculação de polimixina B	28
2 OBJETIVO GERAL	30
2.1 Objetivos específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Formulação dos sistemas nanoestruturados	31
3.1.1 Formulação das NPs de quitosana	31
3.1.2 Formulação das NPs de gelatina	31
3.1.3 Formulação das NPs de poli n-butil-cianoacrilato	32
3.2 Doseamento do fármaco	33
3.3 Caracterização das formulações	33
3.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas (tamanho)	33
3.3.2 Determinação do potencial zeta (ζ) a partir da mobilidade eletroforética	34
3.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) do fármaco	34
3.3.4 Perfil de liberação do fármaco	35
3.3.5 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.4 Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica das formulações	35
3.4.1 Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	36
3.4.2 Viabilidade celular de macrófagos	37
3.4.3 Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	37

3.4.4 Produção de óxido nítrico (NO) dos macrófagos tratados com as formulações e/ou infectados.....	38
3.5 Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC).....	38
3.6 Métodos estatísticos	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 NPs de quitosana.....	40
4.1.1 Tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ).....	40
4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco.....	41
4.2 NPs de gelatina.....	42
4.2.1 Tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ).....	43
4.2.2 Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco.....	45
4.2.3 Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica das formulações	46
4.3 NPs de PBCA	47
4.3.1 Tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta (ζ) ..	48
4.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) do fármaco.....	50
4.3.3 Avaliação da estabilidade	52
4.3.4 Perfil de liberação do fármaco	54
4.3.5 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
4.3.6 Potencial leishmanicida das formulações	56
4.3.7 Potencial microbicida das formulações.....	63
5 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS	73
Anexo A Cópia da aprovação do comitê de ética no uso de animais.....	73
Anexo B Declaração.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

Leishmanioses são patologias causadas por protozoários intracelulares obrigatórios, pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidos por picadas de vetores flebotomíneos infectados (BASANO; CAMARGO, 2004). No mundo, mais de 10 milhões de pessoas são infectadas pelas *Leishmanias*, que causam morbidade e letalidade (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). Os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose têm alta toxicidade, são de uso hospitalar e necessitam de infusões prolongadas, mesmo para as leishmanioses cutâneas. Até hoje não há vacinas comerciais para prevenir o desenvolvimento dessas doenças (NELSON et al., 2006). Sendo assim, é eminente a necessidade de novos fármacos ou formulações leishmanicidas de baixa toxicidade, menor número de doses e administração alternativa a intravenosa.

A polimixina B, antibacteriano de uso parenteral e tópico, foi observado como inibidor de crescimento de culturas de *Leishmania* na literatura. O *screening* relatado evidenciou a inibição de crescimento de várias cepas de *Leishmania* pelo lipopeptídeo, mas não explorou este potencial (DUQUE BELTRÁN et al., 1992). Este fármaco é de fácil obtenção, extensamente caracterizado, estável, administrado por via parenteral ou tópica e de uso clínico aprovado para outros tipos de infecção. Além dessas qualidades, tem potencial imunomodulador e ação contra *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismo comumente encontrado em feridas cutâneas (MCALLISTER; ALPAR; BROWN, 1999). No entanto, por ser um peptídeo sofre degradação enzimática e rápida eliminação do organismo (MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006).

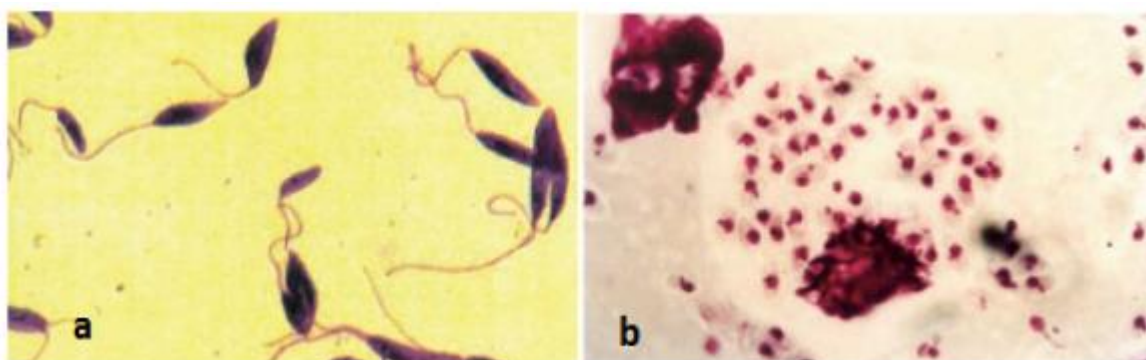
A nanoestruturação do peptídeo pode diminuir ou eliminar sua degradação e aumentar sua internalização por fagócitos (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009), que são as principais células parasitadas por *Leishmanias* (RITTIG; BOGDAN, 2000). Para que a estratégia possa ser aplicada na terapêutica, a formulação deve ser compatível com o peptídeo, biocompatível, biodegradável e estável, parâmetros preenchidos por nanoestruturas poliméricas (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

Baseado no exposto, essa dissertação consiste no estudo de polimixina B como leishmanicida alternativo a terapêutica atual da leishmaniose cutânea, sendo o fármaco veiculado em nanoestruturas poliméricas que impedissem sua degradação e aumentassem sua entrega aos macrófagos infectados.

1.2 Leishmaniose

Leishmaniose é uma antroponose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae, um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear. Esses protozoários apresentam duas formas distintas: amastigota, forma intracelular que parasita fagócitos, e promastigota, forma extracelular que se multiplica no organismo do vetor (figura 1). Os vetores são flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui entre outros, dependendo da localização geográfica (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Figura 1 – *Leishmania*: (a) forma promastigota e (b) forma amastigota intracelular.



Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

A infecção se inicia com a inoculação de promastigotas na pele e subsequente inflamação local. Neutrófilos são então recrutados e ativados para eliminar a ameaça; alguns protozoários resistem aos fagolisossomos e prolongam sua permanência até os macrófagos migrarem e serem infectados (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009) (ciclo de vida, figura 2). A partir desse ponto aparecem manifestações clínicas que classificam os subtipos da doença: lesões na pele (Leishmaniose Tegumentar Cutânea), na mucosa

(Leishmaniose Tegumentar Mucocutânea) ou migração dos parasitos para outros órgãos, como fígado, baço e medula (Leishmaniose Visceral). Os subtipos estão geralmente relacionados com espécies específicas; por exemplo, *Leishmania infantum* e *L. donovani* são geralmente relacionadas a manifestação visceral, enquanto *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* com de mucosa e pele (SOUZA et al., 2011).

Figura 2 – Ciclo de vida de *Leishmania* ssp.

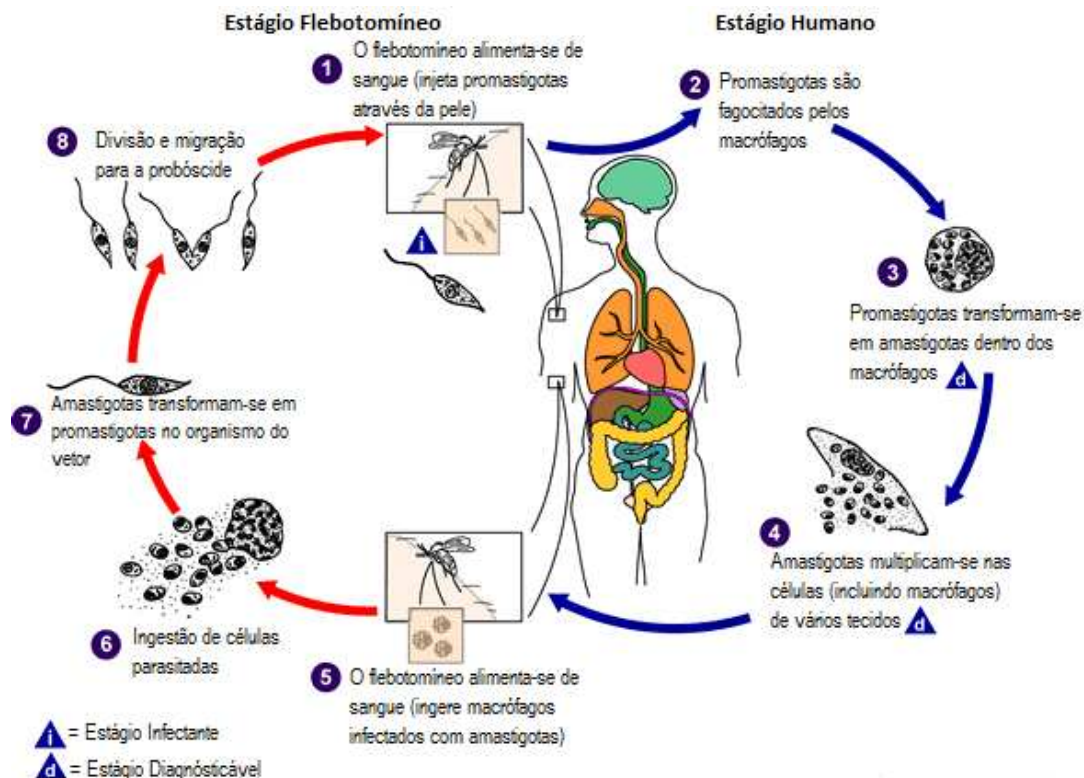


Figura adaptada do site do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) (CDC, 2015).

A leishmaniose visceral ocorre em vastas áreas tropicais e subtropicais do mundo, tornando-se um importante problema de Saúde Pública, em virtude da sua incidência e alta letalidade. É uma doença fatal se não for tratada, sendo causada por *Leishmania donovani* no leste da África e na Índia, e *Leishmania infantum* na Europa, norte da África e América Latina (CHAPPUIS et al., 2007). Após período de incubação (dois a seis meses), os pacientes começam a apresentar sintomas de uma infecção sistêmica permanente, como febre, fraqueza, perda de peso e de apetite, além da invasão pelos parasitos no sangue e sistema fagocitário, levando a linfadenomegalia e

hepatoesplenomegalia (CHAPPUIS et al., 2007). A incidência de leishmaniose visceral em 2013 no Brasil foi de 4,35 casos por 100.000 habitantes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OPS/OMS, 2015).

As leishmanioses cutânea e de mucosa, chamadas coletivamente de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), foram relatadas em diversos países. No entanto, segundo a OMS, 70% da ocorrência global se encontra nas Américas, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, não estando presente nas ilhas do Caribe, Chile e Uruguai (tabela 1). Entre 2001 e 2013, foram registrados uma média anual de 57.228 casos nas Américas. No Brasil, em 2013 foram notificados 18.226 casos, sendo que aproximadamente 94% dos casos apresentaram a forma cutânea (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OPS/OMS, 2015). Mesmo na parcela de curados, as lesões e deformidades persistentes tem alto custo social, levando ao isolamento social, desemprego, depressão, entre outras consequências (PELISSARI et al., 2011). É importante lembrar ainda que nosso país tem baixa porcentagem de casos relatados, sendo a ocorrência de LTA subestimada.

Tabela 1 – Número e proporção de casos de Leishmaniose cutânea e mucosa por região americana, em 2013).

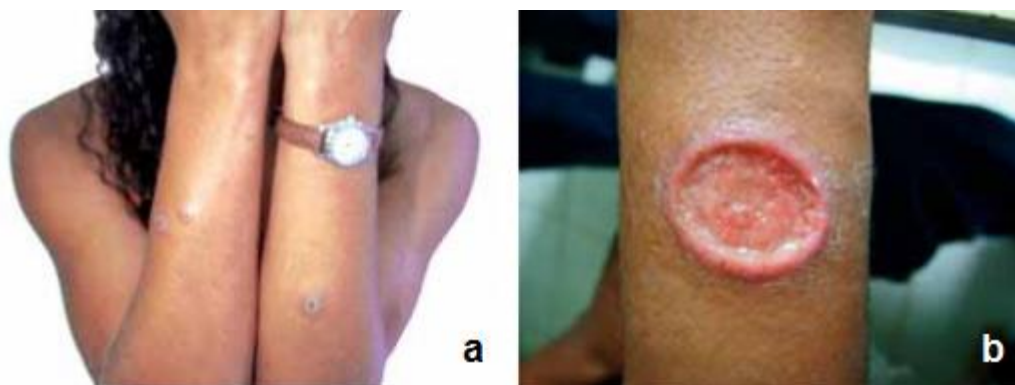
Sub-região	Nº de casos	%
Brasil	18.226	38,4
Andina	19.176	40,4
Centro América	8.685	18,3
México	970	2,0
Cone Sul	252	0,5
Caribe não latino	183	0,4
Total	47.492	100

Adaptada do Informe Epidemiológico das Américas – Leishmanioses, da OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OPS/OMS, 2015).

LTA é causada por infecção dos macrófagos da derme, que resulta em intensa resposta inflamatória e consequente lesão tecidual, com ulcerações na pele (figura 3). A

severidade da doença depende do protozoário e da genética do hospedeiro, além da resposta imune. Essa infecção pode ser curada espontaneamente, manifestar sua forma crônica e difusa (Leishmaniose Cutânea Difusa) ou ainda invadir as mucosas, causando extenso dano tecidual (NYLÉN; EIDSMO, 2012).

Figura 3 – LTA: (a) lesão cutânea múltipla. Lesões ulceradas, pequenas, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; (b) lesão ulcerada única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso.



Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

Apesar da leishmaniose ser considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres, a maior fonte de infecção para os vetores urbanos são os cães, sendo consequentemente alvos nas estratégias de controle (GONTIJO; MELO, 2004). O diagnóstico da doença em cães nem sempre é fácil, pois eles podem não apresentar sintomas. Cães infectados, mesmo que assintomáticos são fonte de infecção para os flebotomíneos, principalmente devido à alta quantidade de amastigotas na pele do animal (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001). A LTA nesses animais apresenta-se como uma doença crônica com manifestações semelhantes à infecção humana (figura 4).

Figura 4 – LTA – cão com lesão de focinho e lábios.



Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007.

1.3 Tratamentos atuais para leishmanioses no Brasil

No Brasil, em 2009, 91% dos tratamentos utilizaram o antimoniato de N-metil glucamina. No caso de resistência ao tratamento, os medicamentos de segunda escolha são o desoxicolato de anfotericina B e o isotionato de pentamidina (PELISSARI et al., 2011). O antimoniato é preferido principalmente por questões econômicas, mas a confirmação de cepas resistentes na Índia reitera a necessidade de buscar novas alternativas. Essa resistência provavelmente ocorre já em todas as regiões, mas o teste atual para confirmação é muito trabalhoso, demorado e não padronizado, causando a falta de informação sobre o assunto. A pentamidina ainda é escassamente monitorada, com casos de resistência inconclusivos, apesar de cepas resistentes criadas em laboratório (*L. donovani* e *L. amazonensis*) evidenciarem a facilidade do protozoário em criar resistência. Na tabela 2 encontra-se o esquema terapêutico preconizado para o tratamento de LTA.

Tabela 2 – Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo OMS e Ministério da Saúde.

Forma clínica	Dose	Tempo de duração mínimo
Leishmaniose Cutânea	10-20 mg/ Sb ⁺⁵ / kg/ dia (recomenda-se 15 mg/ Sb ⁺⁵ / kg/ dia)	20 dias
Leishmaniose Difusa	20 mg/ Sb ⁺⁵ / kg/ dia	20 dias
Leishmaniose Mucosa	20 mg/ Sb ⁺⁵ / kg/ dia	30 dias

Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

O antimicótico Anfotericina B, por outro lado, apresentou raros casos de resistência fúngica nos mais de 30 anos em que foi utilizada para esse fim (AÏT-OU DHIA et al., 2011; CROFT, 2001). Dentre as três opções, este é o único fármaco que age na membrana celular, se ligando ao ergosterol. O impedimento da ampliação do seu uso se dá por sua toxicidade, principalmente renal, e administração endovenosa hospitalar obrigatória, aumentando o custo do tratamento e diminuindo aceitação dos pacientes (BRAJTBURG et al., 1990). Anfotericina B também está disponível formulada em lipossomos, melhoria que diminui seus efeitos citotóxicos e preserva ou melhora a eficácia do fármaco, dependendo do agente infeccioso. Apesar da melhora, a infusão hospitalar prolongada ainda é necessária e os efeitos adversos relevantes (MOEN; LYSING-WILLIAMSON; SCOTT, 2009).

A via tópica foi relatada como eficaz em estudos pré-clínicos, mas não há disponibilidade comercial desse tipo de formulação (CARNEIRO et al., 2012). O tratamento tópico de doenças é muito atrativo, visto que os efeitos colaterais, assim como a carga sistêmica dos ativos são reduzidos em comparação com a administração parenteral ou via oral, por exemplo. Além disso, a aplicação de fármacos na pele evita as grandes flutuações nos níveis plasmáticos, que normalmente acontecem na administração de várias doses de fármacos, ao mesmo tempo que evita os efeitos de primeira passagem (SCHÄFER-KORTING; MEHNERT; KORTING, 2007).

1.4 Peptídeos antimicrobianos (AMPs) como alternativa para o tratamento de leishmanioses

Os AMPs constituem uma grande parcela da terapêutica experimental, especialmente na atualidade, pela proliferação de microrganismos multirresistentes. Defensinas, mutacinas, magaininas e outros grupos de peptídeos foram caracterizados como antimicrobianos (BARKER, 1999), enquanto daptomicina, vancomicina, colistina e polimixina B são peptídeos já formulados e de uso clínico (MARR; MCGWIRE; MCMASTER, 2012). A disseminação do estudo dessa classe de antibióticos foi impulsionada pela baixa propensão a seleção de mutantes resistentes, a ação frente a células independente do estado proliferativo e influência positiva na resposta imune que essas moléculas exercem (DEVOCELLE, 2012).

Peptídeos com atividade microbida são encontrados como moléculas endógenas de animais, plantas, insetos e bactérias, produzidos de maneira induzida ou constitutiva para defesa destes organismos. A diversidade engloba tanto o tipo de microrganismo afetado (bactérias, fungos, vírus e parasitos) como a sequência peptídica, tamanho, resíduos de aminoácidos e modificações pós traducionais (ANDREU; RIVAS, 1998).

A seletividade dos AMPs pela membrana de microrganismos se dá pelas diferenças de composição, arquitetura e potencial energético, quando comparadas às células do hospedeiro. A grande maioria destes peptídeos é catiônica, interagindo por ligações eletrostáticas com as moléculas negativas da membrana. Por exemplo, as células humanas contêm fosfatidilcolina e esfingomielina anfóteras, as promastigotas tem mais de 60 % de lipofosfoglicano aniônico e as amastigotas contem glicosil-fosfatidil-inositol e glicolípídeos do hospedeiro. Além dessas diferenças, o esterol primário em membrana de *Leishmania* é ergosterol, enquanto o das células mamíferas é colesterol (MARR; MCGWIRE; MCMASTER, 2012).

O número de peptídeos testados contra bactérias e fungos é muito maior do que contra parasitos. Mesmo assim, uma série de peptídeos foram testados contra diversas espécies de *Leishmania* (COBB; DENNY, 2010; MARR; MCGWIRE; MCMASTER, 2012; PÉREZ-CORDERO et al., 2011; SALAY et al., 2011), sem o

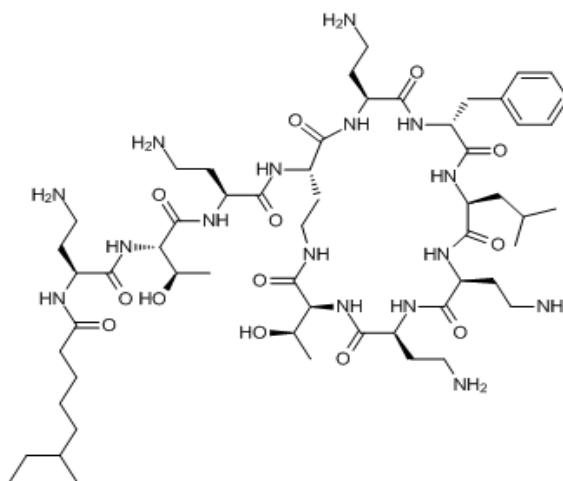
estabelecimento de uma correlação clara entre estrutura *versus* eficácia. Estes fármacos foram permeabilizantes de membrana, induziram apoptose e/ou modularam a resposta imune do hospedeiro (MARR; MCGWIRE; MCMASTER, 2012). Curiosamente, o próprio vetor produz uma Catelicidina (classe de peptídeos antimicrobianos) que influencia no decurso da leishmaniose por modulação do sistema imune (KULKARNI et al., 2011). No caso de *Leishmania amazonensis*, o peptídeo dermaseptina-1 foi relatado como microbicida, sendo tão efetivo quanto pentamidina no modelo escolhido (SALAY et al., 2011).

1.5 Polimixina B como potencial agente leishmanicida

A classe das polimixinas, constituída de lipopeptídeos básicos, foi a primeira classe de peptídeos antimicrobianos comercialmente disponível na atualidade como medicamento. Os principais antibióticos são a polimixina B e E, prescritos geralmente para infecções da pele e mucosa, especialmente contra espécies de pseudomonas (GIAMARELLOU; POULAKOU, 2009). Estudos clínicos relatam a eficácia destes antibióticos contra microrganismos gram-negativos multirresistentes (ARNOLD; FORREST; MESSMER, 2007). O tratamento sistêmico com polimixina B se dá por via intravenosa, aplicado quando a terapia tradicional contra bactérias gram-negativas falha, mas pode apresentar efeitos adversos como nefrotoxicidade (comum) e hiperpigmentação da pele (raro) (MATTOS et al., 2016; SHIH; GAIK, 2014; ZAVASCKI et al., 2015).

A polimixina B, um peptídeo catiônico (figura 5), se liga ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias, desestruturando suas membranas e inibindo o efeito endotóxico do LPS. Além disso, polimixina B pode agir por modulação da resposta imune, já que foi relatado como potencializador de respostas de oligonucleotídeos imunoestimulantes (MARSHALL et al., 2004). O peptídeo também foi relatado como adjuvante de vacina de mucosa, prevenindo respostas inflamatórias exacerbadas causadas pela ovalbumina (YOSHINO et al., 2013). Essa propriedade imunomodulatória é desejada no tratamento tópico de leishmanioses cutâneas, onde a inflamação é responsável pela extensa lesão tecidual.

Figura 5 – Estrutura da Polimixina B



Fonte: EJIM et al., 2011.

1.6 Sistemas nanoestruturados poliméricos para liberação de fármacos

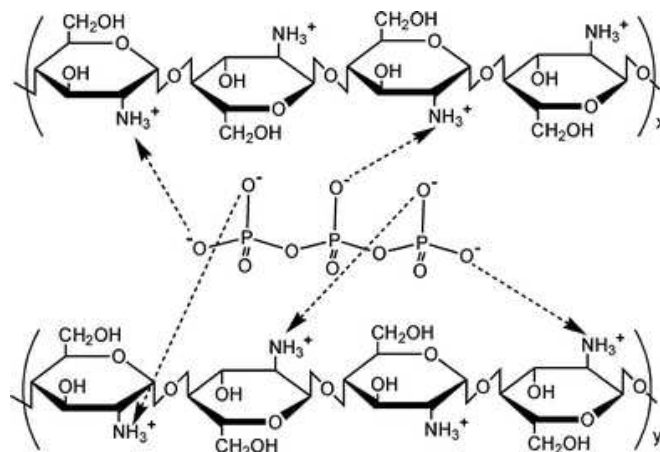
Sistemas nanoestruturados contêm partículas com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica, normalmente compostos por polímeros, materiais derivados de sílica ou carbono, lipídios ou metais (HUGHES, 2005). Nanoestruturas possibilitam superar desafios associados a veiculação de fármacos como baixa solubilidade, baixa permeabilidade, toxicidade, degradação e entrega a células/tecidos específicos. Como qualquer sistema de liberação de fármaco ideal, estes devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e estáveis do ponto de vista físico-químico. A administração de medicamentos nanoestruturados pode ocorrer por diferentes vias medicamentosas (dependendo de suas características), em diversas formas farmacêuticas, incluindo nanoemulsões, nanosuspensões, nanofilmes e pó liofilizado. (PACHIONI-VASCONCELOS et al., 2016). O tamanho, forma e carga superficial influenciam a funcionalidade dos sistemas nanoestruturados, além de sua estabilidade. Estes parâmetros podem ser monitorados por microscopia de força atômica, espectroscopia de espalhamento de luz, microscopia eletrônica e mobilidade eletroforética (SAÚDE et al., 2013).

Nanopartículas (NPs) poliméricas biodegradáveis tem alta biocompatibilidade, encapsulam diversos agentes terapêuticos, permitem a liberação prolongada de fármacos e ainda podem ser funcionalizadas ou modificadas, a fim de mudar e melhorar suas propriedades de biodistribuição (FARAJI; WIPF, 2009). Os principais polímeros naturais e sintéticos utilizados são: quitosana, gelatina, poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), copolímero de ácido polilático (PLA), poli alquil cianoacrilato (PACA), ácido poliglicólico (PGA), polimetacrilato de metila (PMMA) e poli (n-butil cianoacrilato) (PBCA) (FARAJI; WIPF, 2009).

Os sistemas nanoestruturados biopoliméricos se baseiam em polímeros de polissacarídeos ou proteínas encontrados na natureza. As proteínas mais utilizadas para este fim são: seda, colágeno, gelatina, caseína e albumina; os polissacarídeos mais comuns são: quitosana, alginato e amido (NITTA; NUMATA, 2013). Uma desvantagem das proteínas é seu potencial imunogênico intrínseco, podendo ser retiradas da circulação por anticorpos que as reconhecem e diminuir a ação do fármaco associado, além do potencial alergênico (POOL et al., 2002; TRIPODI et al., 2013; ZHANG; OTANI, 2003). Já os polissacarídeos são reconhecidos por resposta T independente, que geralmente não resulta em memória imunológica, ou o reconhecimento não é o suficiente para gerar anticorpos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; FARO; FERNÁNDEZ, 2008).

Os polímeros sacarídicos podem ser classificados pela carga iônica original: catiônicos (quitosana), aniônicos (alginato, ácido hialurônico) e não iônicos (dextran). Dentre esses, quitosana é o mais estudado para nanoestruturação de fármacos. Esse polímero é derivado desacetilado da quitina e pode formar NPs por gelificação aniônica (figura 6), com propriedades diferenciadas. NPs de quitosana e alginato, por exemplo, potencializam a ação do AMP nisina para conservação de alimentos (ZOHRI et al., 2013). A própria quitosana apresenta propriedades antimicrobianas (RAAFAT et al., 2008), inibindo fracamente o crescimento de *L. donovani* e potencializando a ação de anfotericina B, quando em forma de nanocápsulas (ASTHANA et al., 2013). Filmes de quitosana e ácido hialurônico aceleraram o processo de cicatrização de feridas na pele de camundongos, propriedade desejada para o tratamento tópico de leishmanioses cutâneas (XU et al., 2007).

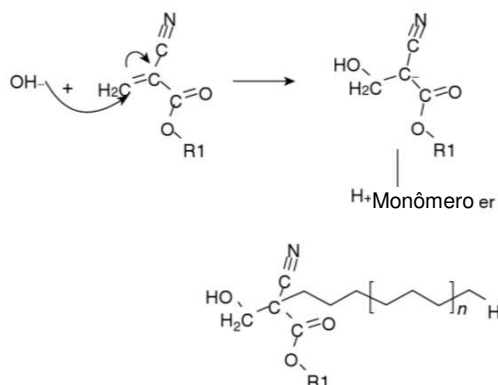
Figura 6 – Mecanismo da formação de NPs de quitosana com TPP por interação iônica.



Fonte: YANG et al., 2009.

Entre os polímeros sintéticos, n-butilcianoacrilato (PBCA) tem se destacando nos últimos anos como sistema de liberação para diversos fármacos. NPs de PBCA são formadas por polimerização aniônica em meio aquoso a partir de monômeros de n-butil-2-cianoacrilato (figura 7), composto utilizado como adesivo de tecidos biológicos e aplicado clinicamente na oclusão de incisões cirúrgicas (NICOLAS; COUVREUR, 2009; YORDANOV, 2012). A biodegradabilidade do PBCA se deve a hidrólise dos grupos alquil por esterases presentes no organismo (HILLAREAU; COUVREUR, 2009). Além da biocompatibilidade, esse sistema aumenta a internalização do fármaco por macrófagos (CRUZ et al., 1997) e pode potencializar a ação leishmanicida, como observado com NPs de poliisohexilcianoacrilato (GASPAR et al., 1992).

Figura 7 – Mecanismo de polimerização de alquil cianoacrilato.



Fonte: BEHAN; BIRKINSHAW; CLARKE, 2001.

1.7 Sistemas nanoestruturados utilizados para veiculação de fármacos leishmanicidas

A eficiência em eliminar microrganismos intracelulares depende mais da concentração intracelular do antimicrobiano do que da concentração plasmática (EDWARDS; KRISHNA, 2004). Dessa forma, a veiculação de fármacos leishmanicidas deve ser focada em aumentar a bioespecificidade, além da diminuição de efeitos adversos (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007).

Os macrófagos são uma das células-alvo mais comuns de parasitismo intracelular. Por isso, também é largamente estudada a veiculação de fármacos direcionados ao fagócito. O sistema mais estudado é o de lipossomas, com variações de tamanho, funcionalidade, carga superficial e aditivos, encapsulando diversos antimicrobianos e testados contra variadas espécies. Os lipossomas são fagocitados pelos macrófagos, o que aumenta a eficácia do tratamento (DATE; JOSHI; PATRAVALE, 2007). No entanto, apesar de apresentar melhorias em comparação ao fármaco livre, os lipossomas tradicionais são grandes (escala micrométrica), com problemas de estabilidade e estocagem (BASU; LALA, 2004).

As nanoestruturas são reportadas como mais eficazes que as fórmulas lipossomais e os fármacos livres, como mostrado com anfotericina B. Este medicamento formulado em nanodiscos (apolipoproteína-fosfolipídeos) se mostrou superior ao

formulado em lipossomos, eliminando completamente a leishmaniose cutânea em camundongos com *L. major* (BASU; LALA, 2004). A pentamidina formulada em NPs de metacrilato apresentou Dose Eficaz 50 % (DE50) seis vezes maior que pentamidina livre, além de ter eliminado *L. infantum* por completo de camundongos Balb/C (DURAND et al., 1997). No caso do antimônio de glucamina, o leishmanicida mais utilizado no mundo, formulações do próprio fármaco nanoparticulado mostraram atividade superior ao de fórmula tradicional, com redução de toxicidade. Estes três fármacos licenciados no Brasil para tratamento de LTA também foram veiculados em outras nanoestruturas (SOFLAEI et al., 2012). Segundo revisão, as NPs poliméricas foram as nanoestruturas experimentais mais bem sucedidas para veiculação de fármacos leishmanicidas (BASU; LALA, 2004).

1.8 Sistemas nanoestruturados para veiculação de polimixina B

A polimixina B é comercialmente veiculada liofilizada, para uso endovenoso, em pomadas (MCQUILLAN et al., 2012)/ *sprays* (SOROFF; SASVARY, 1994) para pele e colírios (KRZEK et al., 2001). Estudos veicularam o lipopeptídeo em liposomas de carga positiva, negativa, neutra e funcionalizados, com resultados variados em relação a eficácia da formulação (MCALLISTER; ALPAR; BROWN, 1999). Também foi explorada sua veiculação em escala micrométrica: micropartículas (3 μm) de alginato e polimixina foram preparadas para administração oral, com retenção da atividade microbida e liberação prolongada em fluído intestinal (COPPI et al., 2004). O mesmo grupo formulou micropartículas de quitosana/alginato de cálcio com distribuição de tamanho bastante heterogênea (0,1 – 2,5 μm), carregadas com polimixina. Essas micropartículas ficaram retidas nas placas de Peyer, promovendo liberação sustentada e consequente manutenção dos níveis plasmáticos (COPPI et al., 2008).

Em contrapartida, a pesquisa bibliográfica apontou poucos artigos focados em nanoestruturação de polimixina B para uso farmacológico, entre eles uma formulação de nanoemulsões, adsorvendo o peptídeo em NPs lipídicas sólidas. As NPs apresentaram liberação sustentada, sem prejuízo da atividade bactericida, enquanto a nanoemulsão apresentou ação potencializada por curto período de tempo (PATTANI; MANDAWGADE;

PATRAVALE, 2006). Outros pesquisadores estudaram nanoestruturação para fins laboratoriais, como a polimixina B recobrimo NPs de ouro para eletrodos de voltametria de filmes proteicos (HOEBEN et al., 2008). A falta de publicações em periódicos sobre nanoestruturação de polimixina B, aliada ao número de vantagens que esse tipo de formulação pode trazer, endossou o desenvolvimento desse projeto.

2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoestruturas poliméricas biodegradáveis com polimixina B e caracterizar suas propriedades físico-químicas, atividade leishmanicida e citotóxica, no intuito de avaliar a viabilidade *in vitro* da polimixina B nanoestruturada como fármaco leishmanicida.

2.1 Objetivos específicos

Formular, realizar a caracterização físico-química e selecionar nanoestruturas poliméricas biodegradáveis com e sem polimixina B.

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* das nanoestruturas selecionadas em promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Avaliar a citotoxicidade das nanoestruturas selecionadas em macrófagos peritoneais murinos.

Avaliar *in vitro* a atividade bactericida das nanoestruturas selecionadas em bactérias gram-positivas e gram-negativas (verificar a atividade biológica da polimixina B como padrão de ação microbicida).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Formulação dos sistemas nanoestruturados

3.1.1 *Formulação das NPs de quitosana*

As NPs de quitosana (baixo peso molecular, desacetilação > 75 %, Sigma-Aldrich) foram formadas por gelificação iônica, baseada na interação eletrostática entre quitosana e TPP (tri-polifosfato de sódio 85 %, Sigma-Aldrich) (figura 6, página 27). Quatro mililitros (4 mL) de solução de TPP (1 mg/mL) foram adicionados a 6 mL de solução de quitosana (2 mg/mL em 1 % de ácido acético, pH 5,0), em fluxo contínuo (1 mL/min). A adição ocorreu sob agitação (700 rpm), sendo mantida por mais 60 minutos para finalizar a gelificação. A suspensão obtida foi centrifugada (13000 x g) e o sobrenadante separado. As NPs foram então ressuspensas em água ultrapura e analisadas. No caso das NPs com polimixina B, o último foi solubilizado na solução de TPP (200 µg polimixina B/mL de TPP) antes da mistura com a solução de quitosana.

3.1.2 *Formulação das NPs de gelatina*

3.1.2.1 Dessolvatação e reticulação

Para formulação de NPs, foram utilizadas gelatinas extraídas de pele bovina por hidrólise básica (tipo b) e Bloom médio (180 g, Gelita) e alto (225 g, G9391, Sigma-Aldrich).

Foram pesados 2,0 g de gelatina bovina e dissolvida em 26,0 mL de água ultrapura. A solução resultante foi mantida sob agitação magnética a 500 rpm e aquecimento constante ($40,0 \pm 1,0$ °C). Foi adicionado acetona à solução de gelatina, como agente de dessolvatação. Após precipitação da fração de alto peso molecular, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi redissolvido por adição de água ultrapura, agitação e aquecimento constantes, anteriormente descritos. Na segunda dessolvatação, o valor de pH da solução da gelatina foi ajustado para pH de 11,6 a 12,0 com solução de

0,1 M de NaOH. Acetona P.A. (Vetec, Brasil) foi adicionada a solução para a segunda dessolvatação. Após turvação, o glutaraldeído (200,0 μ L) foi empregado como agente de reticulação. O sistema foi mantido sob agitação e aquecimento constantes por mais quatro horas.

3.1.2.2 Rotoevaporação e centrifugação

A acetona residual foi removida da solução de gelatina com uso de evaporador rotativo. Em seguida, as NPs foram centrifugadas duas vezes a 16000 x g/ 25 °C/ 20 minutos. O sobrenadante foi guardado e o precipitado de cada tubo foi resuspendido em 1 mL de água ultrapura.

3.1.2.3 Adição de polimixina B

Após a centrifugação, polimixina B 1mg/mL foi adicionada nas proporções:

- 1:1 (900 μ L de gelatina + 100 μ L de polimixina B 10 mg/mL)
- 1:20 (850 μ L de água ultrapura + 50 μ L de solução de gelatina + 100 μ L de polimixina B 10 mg/mL).
- 1:10 (800 μ L de água ultrapura + 100 μ L solução de gelatina + 100 μ L de polimixina B 10 mg/mL).

3.1.3 *Formulação das NPs de poli n-butil-cianoacrilato*

Para a síntese das NPs de poli n-butil-cianoacrilato, foi empregado o método de polimerização aniônica em emulsão, com vasta descrição na literatura (COUVREUR; VAUTHIER, 1991; TAVARES, 2013). Sendo assim, 100 μ L do monômero n-butil-cianoacrilato (10 mg/mL) (BBraun, Alemanha) foi adicionado, por gotejamento e sob agitação vigorosa (800 rpm), a uma solução aquosa de 10 mL de HCl 0,1M (com pH ajustado para 2,5) contendo 100 mg de dextran 70.000 Da (Sigma-Aldrich, Dinamarca). Após 4 horas de agitação, o pH foi ajustado até completa neutralização da solução coloidal (pH = 7,0 $\pm$ 0,3) com o auxílio de NaOH 0,1M.

As NPs obtidas foram filtradas em membranas de porosidade de 1 μm . Para purificação, as NPs foram submetidas a centrifugação (14000 x g, 30 minutos, 25 °C) e o sobrenadante, descartado. O pellet obtido foi ressuspensionado em água purificada, e o pH ajustado para 7, com NaOH 0,1M.

No caso das NPs com polimixina B, a ressuspensão após a centrifugação foi feita com a solução de polimixina B na concentração acertada.

3.2 Doseamento do fármaco

O doseamento do fármaco foi realizado pelo método do ácido bicinconínico, através do kit BCA QuantiPro (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com seu manual. O kit BCA QuantiPro oferece uma resposta linear para uma concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ a 30 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. Para a leitura das amostras (em microplaca de 96 poços) foram adicionados em cada poço 150 μL do reagente de BCA e 150 μL da amostra. A placa foi incubada em uma estufa com temperatura controlada a 37 °C por 2 horas, seguida da análise em espectrofotômetro RChisto Infinite M200 PRO (560 nm).

3.3 Caracterização das formulações

3.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas (tamanho)

As amostras foram analisadas por espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering (DLS); Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern, Inglaterra) e por análise de rastreamento de NPs (Nanoparticle Tracking Analysis (NTA); Nanosight, Malvern Instruments Ltd, Malvern, Inglaterra). As duas técnicas analisam o movimento browniano das partículas para determinar o coeficiente de difusão, e utilizam a equação de Stokes-Einstein para calcular o diâmetro hidrodinâmico das partículas (tamanho). O DLS calcula o movimento browniano pelas decorrentes flutuações de intensidade de difração do raio laser, em determinado ângulo e para um conjunto de partículas; o NTA registra esse movimento por imagem e para cada partícula.

As análises de DLS foram feitas em ângulo 90 ° e a 25 °C, com amostras diluídas em água ultrapura (índice de refração 1,333 – viscosidade 0,8905 cP) até coeficiente de correlação atingir valor entre 0,7 e 1. Cada amostra foi analisada em triplicata, com número de corridas em modo automático, após o preparo das NPs e durante seu período de estocagem. Foram considerados os resultados de tamanho médio de partículas, índice de polidispersão e D10/ D50/ D90 fornecidos pelo equipamento.

As análises de NTA foram feitas a 25 °C, com amostras diluídas em água ultrapura até atingir entre 30-100 partículas por quadro, e 10^7 - 10^9 partículas por mL. Cada amostra foi analisada em triplicata, após o preparo das NPs e durante seu período de estocagem. Foram considerados os resultados de tamanho médio de partículas, D10/ D50/ D90 e concentração de partículas por mL fornecidos pelo equipamento.

3.3.2 Determinação do potencial zeta (ζ) a partir da mobilidade eletroforética

A mobilidade eletroforética das amostras de NPs dispersas em meio líquido foi analisada pelo equipamento Zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Malvern, Inglaterra). Cada amostra foi analisada em triplicata, com número de corridas em modo automático, após o preparo das NPs e durante seu período de estocagem. Foram considerados os resultados de potencial zeta médio e desvio padrão.

3.3.3 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) do fármaco

A eficiência de encapsulação (EE) se refere a porcentagem de fármaco que foi incorporada as NPs, tendo como 100 % a quantidade de fármaco total adicionada. A EE foi determinada pelo método indireto, ou seja, pela quantidade de fármaco presente no diluente que não foi incorporada a nanoestrutura. Para tal, suspensões de NPs foram separadas do diluente por centrifugação (14000 x g, 30 min, 25 °C). O sobrenadante foi submetido ao doseamento de fármaco, tendo como branco o sobrenadante de NPs que

não teve fármaco adicionado. A eficiência de encapsulação foi calculada seguindo a equação (1).

$$EE \% = \left(\frac{\text{concentração de fármaco no sobrenadante}}{\text{concentração de fármaco adicionado}} \right) * 100 \quad (1)$$

3.3.4 Perfil de liberação do fármaco

O perfil de liberação de fármaco das NPs foi analisado em sistema de célula de difusão de Franz. Nesse sistema, uma membrana de celulose (Spectrapore, 12 a 14 kDa) separa o compartimento doador (com 0,4 mL de amostra) do compartimento acceptor (com 4 mL de tampão fosfato pH 7,4), sendo a liberação de fármaco em função do tempo feita sob leve agitação a 37 °C. Amostras foram retiradas do compartimento acceptor em intervalos pré-determinados e submetidas ao doseamento do fármaco. O volume de amostra retirado foi imediatamente repostado por tampão. A porcentagem de liberação foi calculada em cada tempo de retirada de amostra, em sextuplicata, sendo os pontos posteriormente relacionados em gráfico tempo x taxa de liberação.

3.3.5 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação morfológica das NPs foi realizada por microscopia eletrônica de varredura, pelo equipamento JEOL *JSM-6340-F*, na central analítica de Instituto de Química da UNICAMP. As amostras foram desidratadas a temperatura ambiente sobre lâmina de sílica e analisadas com recobrimento de ouro-paládio.

3.4 Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica das formulações

3.4.1 Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis*

A viabilidade celular de promastigotas de *L. amazonensis* foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4- 5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich), como descrito anteriormente (DUTTA et al., 2005). Nesse método, o MTT é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais, formando no interior das células cristais de formazan, de coloração púrpura. As promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio M199 (sais de Hanks, 2 % urina humana, 10 % soro fetal bovino, gentamicina), em estufa BOD a 26 °C, até atingirem o início da fase estacionária (aproximadamente 3 dias). Os protozoários foram transferidos para placas de cultura contendo 96 poços (1x10⁶ por poço). Decaplicatas de diluições seriadas de polimixina B livre, polimixina B em NPs poliméricas e NPs poliméricas vazias foram aplicadas as placas. Após 24 horas de incubação a 26 °C, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço e realizada nova incubação a 37 °C por 4 horas. Após esse período, 100 µL álcool isopropílico foram adicionados para solubilizar os cristais formados, sendo a coloração resultante analisada em espectrofotômetro de placa de ELISA (570 nm). O meio de cultura contendo promastigotas foi o 100 % de crescimento enquanto o meio de cultura contendo promastigotas e tratado com anfotericina 25 µg/mL foi o 0 % de crescimento.

A porcentagem de sobrevivência foi calculada empregando a equação (2), com base na densidade ótica (DO) obtida.

$$\% \text{ Sobrevivência} = \left(\frac{DO \text{ amostra} - DO \text{ controle negativo}}{DO \text{ controle positivo} - DO \text{ controle negativo}} \right) * 100 \quad (2)$$

3.4.2 Viabilidade celular de macrófagos

Esse teste é uma modificação do método descrito na norma ISO (*International Organization for Standardization*) 10993-5 (ROGERO et al., 2003) e utilizou macrófagos de peritônio de camundongo BALB/C, fornecidos pelo banco de células do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Universidade de São Paulo (Projeto 323A aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-IMT) em dezembro de 2015) (ANEXO A). Os macrófagos foram ressuspensos em RPMI 1640 completo (suplementado com 10 % de soro bovino fetal inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina).

Quintuplicatas de diluições seriadas de polimixina B livre, polimixina B em NPs poliméricas e NPs poliméricas vazias foram aplicadas em microplacas de 96 poços (50 μ L). Foram transferidas então 4×10^5 células por poço (50 μ L) de microplaca de cultura (96 poços) e essas placas incubadas por 24 horas. Em seguida, foram adicionados 25 μ L de solução de MTT (5 mg/mL), e nova incubação (37 °C por 4 horas). Foram adicionados 100 μ L de álcool isopropílico para solubilizar os cristais. As placas foram lidas em leitor de ELISA (570 nm). O meio de cultura contendo macrófagos foi considerado como 100 % de viabilidade, enquanto as células com DMSO 10 % foram controle de 0 % de viabilidade.

A porcentagem de sobrevivência foi calculada empregando a equação (2), com base na densidade ótica (DO) obtida.

3.4.3 Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por *L. amazonensis*

Os macrófagos (1×10^6 células) foram transferidos para placas (24 poços) contendo lamínulas de 13 mm. Após incubação (24 h/ 37 °C/ 5 % CO₂), os macrófagos foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* na proporção de cinco protozoários por célula e reincubados (4 h/ 32 °C/ 5 % CO₂). A cultura foi lavada para retirar promastigotas não internalizados. A seguir foram adicionadas as amostras para nova incubação (24 h/ 32 °C/ 5 % CO₂). Após a incubação, as células foram lavadas com

meio RPMI 1640, fixadas nas lamínulas com metanol e coradas com corante panótico rápido (Laborclin). A contagem do número de células infectadas, não infectadas e de amastigotas por célula foram efetuadas por exame microscópico das preparações coradas. O teste foi realizado em triplicata para cada amostra.

3.4.4 Produção de óxido nítrico (NO) dos macrófagos tratados com as formulações e/ou infectados.

A produção de NO é determinada através da medida de nitritos no sobrenadante de culturas de macrófagos, utilizando o microensaio descrito por DING; NATHAN; STUEHR (1988). Os sobrenadantes das culturas de macrófagos tratadas com as amostras e/ou infectados (Item 4.2.3) foram colhidos e o NO produzido foi determinado no sobrenadante celular por seu produto estável nitrito, em espectrofotometria 550 nm por reagente de Griess (Sigma-Aldrich) e nitrito de sódio como padrão.

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 µL dos sobrenadantes da cultura celular e uma triplicata da curva padrão, com nitrito de sódio (de 100 µM a 1,56 µM). Então, foram adicionados 50 µL do reagente de Griess por poço, a placa foi coberta e a reação ocorreu por 10 minutos. A placa foi lida a 550 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos em µM de NO₂/ 10⁵ de macrófagos.

3.5 Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC)

Esse ensaio foi realizado pelo método de microdiluição, como descrito por CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Realizou-se o método de suspensão direta das colônias utilizadas para o teste, preparou-se o inóculo fazendo uma suspensão salina das colônias selecionadas da placa ágar de 18-24 horas. A turbidez da suspensão foi ajustada utilizando o padrão de turbidez de 0,5 McFarland (BaSO₄) que corresponde a aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ *Escherichia coli* ATCC 25922 (WIKLER, 2009).

Em uma placa de 96 poços, foi realizada a diluição seriada dos estímulos (polimixina B, NP vazia e NP com polimixina B), mantendo poços de controle, de 100 %

de crescimento (apenas bactéria e meio de crescimento) e de 100 % de morte. A placa foi encubada por 24 horas, em estufa a 37 °C. Após esse período, a placa foi lida visualmente, em seguida, a densidade ótica foi medida no leitor de placas RChisto Infinite M200 PRO a 625 nm.

3.6 Métodos estatísticos

As curvas de calibração de amostras foram analisadas pelo coeficiente de determinação (R^2), sendo aceitas apenas as acima de 0,99. Verificação de diferença entre cada análise e a média das análises foi feita pelo teste t-Student, com nível de significância de 0,05 para uma distribuição bicaudal. Comparações entre diversos grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA).

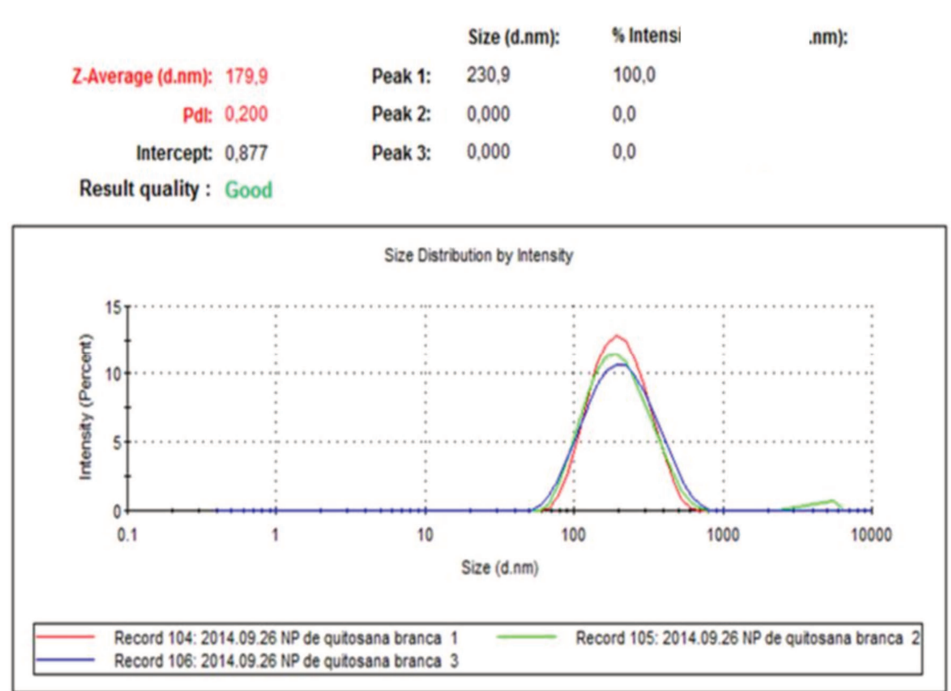
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 NPs de quitosana

4.1.1 *Tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ)*

NPs de quitosana sem fármaco foram produzidas e apresentaram distribuição de tamanho monomodal (figura 8). A média de tamanho de partícula atingido com experimento em triplicata foi a esperada para a formulação (179,9 nm), assim como o PDI (0,200) e o potencial ζ (22 ± 3 mV). A incorporação de polimixina B não modificou significativamente esses parâmetros (tamanho 190,5 nm, PDI 0,220).

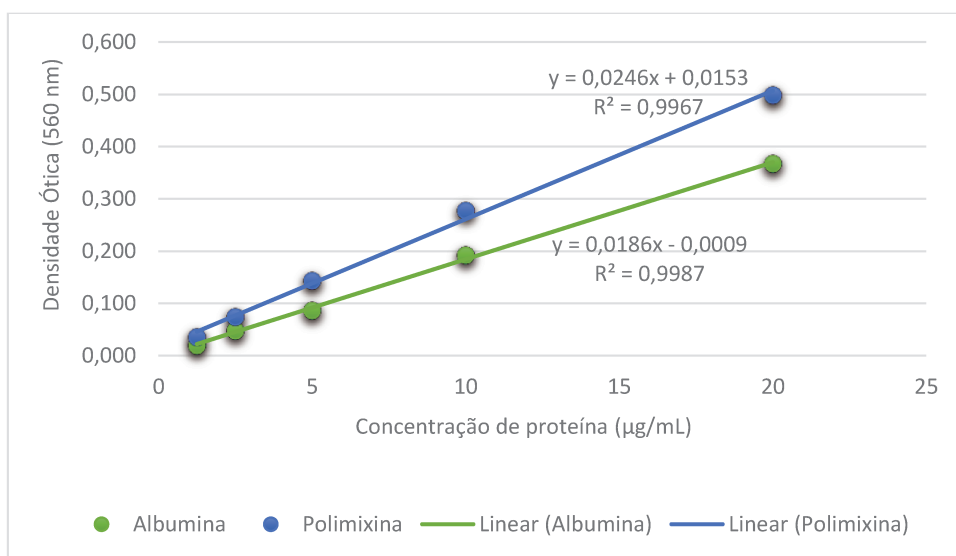
Figura 8 – Distribuição de tamanho de partícula (Size) em função da intensidade de espalhamento de luz (Intensity) medidos por DLS. As amostras correspondem a triplicata de NPs de quitosana vazia, produzidas em dias diferentes (representados por cores diferentes).



4.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco

O método de BCA (ácido bicinconínico) baseia-se na formação de um complexo entre ligações peptídicas e átomos de cobre em meio alcalino (BROWN; JARVIS; HYLAND, 1989). A detecção normalmente utiliza albumina como padrão, porém sua curva padrão teve diferença significativa na inclinação em relação a feita com polimixina B, sendo a última adotada como referência (figura 9).

Figura 9 – Curva de calibração para determinação de polimixina B pelo método BCA. Cada ponto da curva é respectivo a média da densidade ótica medida em triplicata.



Apesar das NPs de quitosana vazias não possuírem proteínas, houve leitura de densidade ótica acima da leitura do branco (água ultrapura), resultante da reação do BCA com as aminas presentes no biopolímero. Sendo assim, a água ultrapurificada foi adotada como branco da curva de calibração enquanto o sobrenadante de NPs vazias como branco das amostras do sobrenadante de NPs com polimixina B.

As NPs de quitosana com adição de polimixina B 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL apresentaram baixa eficácia de encapsulação (12,5 %, 15,5 % e 18,0 %), sem toxicidade significativa para as promastigotas. Verificou-se que o aumento da concentração de proteínas foi inversamente proporcional a eficiência de encapsulação. A adsorção e encapsulamento de proteínas por interações eletrostáticas normalmente

exibem uma cinética de saturação que atinge um valor de pico em altas concentrações de proteínas (DOUNIGHI et al., 2012). Apesar da concentração de proteína não ser muito alta, provavelmente a repulsão de cargas positivas da quitosana e polimixina B foi predominante, mesmo com as cargas negativas do TPP como contrabalanço iônico. Diante disso, novo experimento foi feito com a polimixina B na solução de quitosana, ao invés da de TPP. A troca resultou em precipitação, mostrando ser inviável.

Para verificar se a polimixina B complexou com TPP, foi feita a análise do potencial ζ e tamanho na solução de polimixina B (1 mg/mL) em TPP (1 mg/mL) e na solução de TPP somente. Nenhuma solução apresentou detecção de tamanho, o que indica que não houve formação de complexos de tamanho maior que 0,3 nm. No entanto, o potencial ζ passou de -5,9 (TPP) para +1,2 (TPP + polimixina B). Essa mudança pode ser a causa da baixa eficiência de encapsulação, sendo que a polimixina B complexada com TPP não foi encapsulada.

Em outra tentativa com a quitosana, seguimos protocolo da bibliografia que substitui TPP pelo poliânion dextran (ANITHA et al., 2011), mas não houve formação de NPs, independente de mudanças de parâmetros críticos de processo. Diante da inadequação das NPs de quitosana, decidimos modificar o biopolímero para gelatina.

A gelatina é amplamente utilizada para a liberação de fármacos como, por exemplo, anfotericina B (NAHAR et al., 2008). Em estudos experimentais com animais, a gelatina já foi testada como carreador de fármacos usados no tratamento da leishmaniose visceral (NAHAR et al., 2010). Se a formulação se mostrasse efetiva, seria possível o recobrimento com ácido hialurônico, como seria feito com a quitosana.

4.2 NPs de gelatina

As NPs de gelatina foram preparadas de acordo com estudos anteriores (ZWIOREK et al., 2008). Como esses estudos demonstram que a gelatina difere em suas propriedades dependendo do fornecedor, foram usadas duas marcas de gelatina, Sigma e Gelita. Parâmetros críticos de processo foram testados de forma univariada (tabela 3), no intuito de se obter NP viável; caso a NP se mostrasse promissora, um planejamento fatorial completo seria realizado para otimizar a formulação.

Tabela 3 – Variação de parâmetros de processo para produção de NPs de gelatina.

Parâmetros variados	Condições aplicadas		
pH	11,6	12	
Adição de acetona para dessolvatação	50 mL	100 mL	
T (°C) de agitação	40	50	Ambiente

4.2.1 Tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ)

A tabela 4 contém os dados das formulações feitas em duplicata. No caso das NPs de gelatina Sigma em pH 11,6, as formulações com menor adição de acetona apresentaram um tamanho menor, enquanto o uso de mais acetona causou precipitação. A temperatura de agitação também influenciou o tamanho das partículas: o aumento de 40 °C para 50 °C causou agregação; a utilização de temperatura ambiente levou a um aumento no tamanho das NPs.

Tabela 4 – Resultados da variação de parâmetros na produção de NPs de gelatina. Valores médios de experimentos realizados em triplicata.

Tipo de gelatina	Adição de acetona	Potencial ζ (média)	Tamanho (média)	Temp. de agitação	Gelificação pós processo	PDI
B Sigma	50 mL	-26,4 mV	704,5 nm	40 °C	Sim	0,20
B Sigma	50 mL	-26 mV	> 1000 nm	50 °C	Sim	0,37
B Sigma	50 mL	-29,6 mV	911,2 nm	Ambiente	Sim	0,23
B Sigma	100 mL	/	/	/	/	/
B Sigma (*)	100 mL	-27,1 mV	318,7 nm	40 °C	Sim	0,21
B Gelita	50 mL	-33,0 mV	606,7 nm	40 °C	Não	0,01
B Gelita	100 mL	-34,8 mV	250,4 nm	40 °C	Não	0,13

Parâmetros de produção não variados: agitação = 500 rpm; pH = 11,6, exceto (*) pH = 12.

Na tentativa de diminuir o tamanho médio dos coloides, a formulação foi feita em pH 12,0. O tamanho diminuiu mais que a metade, chegando a aproximadamente 320 nm, mesmo com quantidade maior de acetona. Dessa forma, para a gelatina Sigma, a melhor temperatura de agitação foi definida como 40 °C, o pH 12 e a quantidade de acetona próxima a 100 mL (para garantir a dessolvatação completa).

As NPs feitas com gelatina da Gelita em pH 11,6 apresentaram um comportamento contrário as da Sigma em pH 11,6, em relação a quantidade de acetona: o menor tamanho de partícula foi obtido com a maior quantidade de acetona. Não foi necessário a modificação de pH na da Gelita, visto que o tamanho desejado foi atingido em pH 11,6 e com adição de 100 mL de acetona.

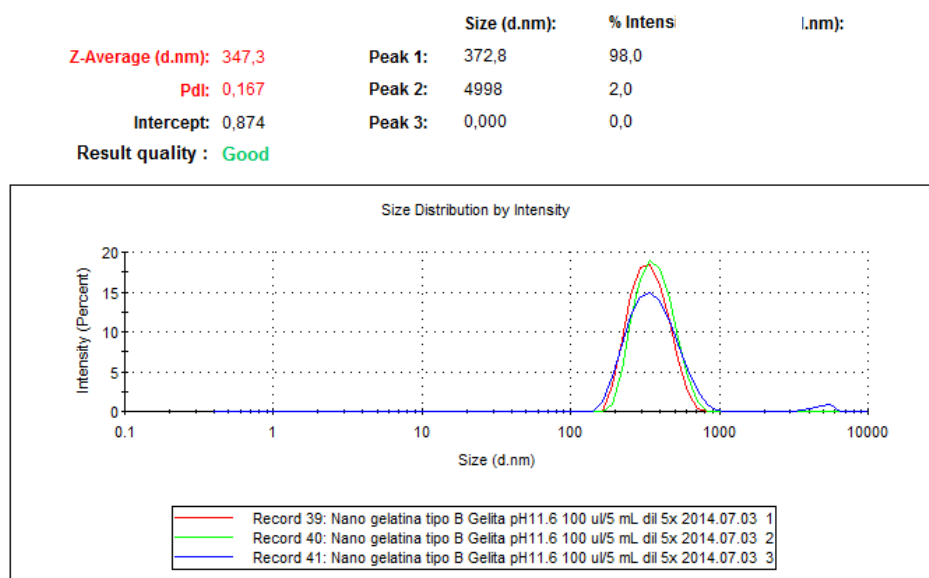
Todas as formulações feitas com gelatina Sigma gelificaram em geladeira, enquanto as da Gelita não. A temperatura de gelificação pode variar em função de pH, sais, ou elasticidade mecânica/resistência a tração do gel (medido por teste de Bloom). Bloom é a massa requerida (em gramas) para pressionar um pistão de 12,5 mm de diâmetro, penetrando 4 mm em 112 g de um gel de gelatina padrão 6,7% w/w a 10 °C; seu valor varia de 50 a 300 Bloom, sendo baixo Bloom 50-100 g, médio Bloom 100-200 g e alto Bloom 200-300 g (PHILLIPS; WILLIAMS, 2009). A gelatina Gelita tem valor médio

de Bloom (180 g), enquanto a Sigma tem valor alto (225 g); como quanto maior a resistência do gel, maior a temperatura de gelificação, a variação de Bloom justifica a diferença de comportamento em geladeira (OSORIO et al., 2007). A gelificação em geladeira é indesejada, visto que a mudança física da formulação pode causar agregação ou decréscimo da eficiência de encapsulação. Por esse fato, a NP formada com gelatina Gelita foi escolhida para veicular polimixina B.

4.2.2 *Determinação da eficiência de encapsulação do fármaco*

A adição de polimixina B 1 mg/mL foi feita na proporção de 1:1, 1:10 e 1:20 (gelatina:polimixina B). O esperado era a adsorção de polimixina B, carregada positivamente, na superfície das NPs de gelatina, carregadas negativamente. De fato, o excesso de polimixina B (1:20) causou precipitação, provavelmente pela neutralização das cargas da gelatina. A neutralização elimina a estabilização eletrostática e promove agregação de partículas. A diluição intermediária (1:10) também resultou em precipitação. Apenas a diluição mais baixa 1:1 resultou em solução estável turva, com aumento do tamanho de partículas (figura 10) e diminuição do potencial ζ (+11 mV). Como o nanocarreador também é proteico, a centrifugação da formulação para detecção de proteína no sobrenadante não foi adequada para medir a eficiência de encapsulação. Apenas com filtração por membrana de 10 KDa (Centricon, Millipore) foi possível separar a polimixina B não encapsulada. Após o ajuste, a eficiência de encapsulação determinada foi de 48,2 %, considerada adequada para os estudos do grupo.

Figura 10 – Distribuição de tamanho de partícula (Size) em função da intensidade de espalhamento de luz (Intensity) medidos por DLS. As amostras correspondem a triplicata de NPs de gelatina com polimixina B incorporada na proporção 1:1 (representadas por cores diferentes).



4.2.3 Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica das formulações

O teste de susceptibilidade no parasito com a formulação resultou em concentração inibitória de 50 % de crescimento dos parasitos (IC50) três vezes maior que o obtido com a polimixina B sozinha. Apesar de ser previsto que a liberação modificada pudesse retardar a ação, não se esperava redução tão drástica da atividade. Publicações anteriores demonstraram que, apesar do *crosslink* com glutaraldeído reduzir consideravelmente a velocidade de degradação, altas quantidades de gelatinase aceleram o processo (CHENG et al., 2011; CHOY et al., 2008). É possível então que a atividade da gelatinase da *Leishmania* em cultura seja alta o suficiente para metabolizar o nanocarreador e utilizá-lo como fonte de alimentação, multiplicando parasitos antes que a polimixina B possa agir. De acordo, NPs de gelatina sem antimicrobiano resultam em densidade ótica 4 vezes maior que o crescimento do controle positivo. O estudo publicado anteriormente com gelatina como constituinte de nanocarreadores de leishmanicidas utilizou a proteína com modificações químicas, além de não ter realizado testes *in vitro*,

apenas *in vivo* (NAHAR et al., 2010). Já o artigo que relata anfotericina encapsulada em NPs de gelatina como alternativa ao Ambisome (NAHAR et al., 2008), usado no tratamento de *Leishmania*, não realizou nenhum teste de eficácia, apenas de toxicidade, o que impossibilita comparar resultados com o encontrado pelo nosso grupo. Independente de possível comportamento diferente *in vivo*, este trabalho foca em *screening in vitro* e, por esse fato, não pode ter um carreador provocando crescimento parasitário em cultura.

4.3 NPs de PBCA

Como alternativa aos problemas anteriores, recorreremos a elaboração de NPs poliméricas biodegradáveis utilizando o poli n-butil-cianoacrilato – PBCA. Apesar de biodegradável, os monômeros desse polímero não são metabolizados pelos parasitos e, por isso, o esperado é não aumentar a taxa de replicação dos mesmos.

Como já havia estabelecida no grupo de pesquisa a técnica de produção de NPs de PBCA (TAVARES, 2013), a mesma foi testada com polimixina B. O fármaco pode ser veiculado por esse carreador no seu interior ou ser adsorvido em sua superfície carregada negativamente. No caso da polimixina B, a adição no momento de polimerização (para sua internalização) causou precipitação, enquanto a adsorção pós-nanoestruturação (método 4.1.3) não alterou a nanoestrutura. Diferente das NPs de gelatina, as NPs de PBCA são estabilizadas estericamente, impedindo que haja precipitação se a polimixina B neutralizar as cargas negativas superficiais com sua adsorção.

Foram formulados quatro tipos de NPs de PBCA: NP vazia ou branca (PBCAnp-b); com adição de polimixina B 1 mg/mL (PBCAnp-p1), com 5 mg/mL (PBCAnp-p5) e com 10 mg/mL (PBCAnp-p10).

4.3.1 *Tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta (ζ)*

As NPs foram analisadas pelas técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA).

As diferentes formulações de NPs de PBCA se mostraram reprodutíveis em relação ao tamanho quando medido por DLS (tabela 5), sendo possível observar que a adição da polimixina B não alterou significativamente o tamanho das NPs ($p = 0,51$). As partículas obtidas tem por volta de 200 nm, o que facilita a atividade fagocitária, e são mais eficientes na ativação do sistema complemento (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005). Os valores de D10 mostram que 90 % ou mais das NPs não apresentam valores de tamanho abaixo de 100 nm. Esse fato é desejável, visto que abaixo desse valor as partículas podem apresentar propriedades físicas e químicas modificadas, e uma porcentagem mais alta de partículas desse tamanho levariam a heterogeneidade da amostra (HORIKOSHI; SERPONE, 2013). A distribuição de tamanho observada foi monomodal, com índice de polidispersão inferior a 0,2, o que configura uma solução moderadamente polidispersa (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2011).

O potencial ζ médio (tabela 5) passa de negativo (nas amostras de NP vazias), para positivo (NPs com polimixina B), devido a adsorção do fármaco catiônico na superfície aniônica da NPs e a presença de sua forma livre em solução.

Tabela 5 – Tamanho médio e potencial zeta, medidos por DLS. As amostras correspondem a triplicata de NPs de PBCA com e sem polimixina B incorporada.

Formulação	PBCAnp-b	PBCAnp-p1	PBCAnp-p5	PBCAnp-p10
Tamanho Médio (nm)	216,9 ± 20,2	207,4 ± 12,6	216,5 ± 25,9	203,7 ± 18,5
PDI	0,167 ± 0,041	0,182 ± 0,037	0,172 ± 0,050	0,152 ± 0,022
D10	133,3 ± 14,3	129,3 ± 11,1	131,9 ± 11,4	132,0 ± 16,3
D50	232,3 ± 26,8	217,3 ± 20,3	235,9 ± 33,5	213,3 ± 20,1
D90	416,2 ± 88,9	403,2 ± 66,2	440,7 ± 105,3	360,5 ± 37,8
Potencial ζ (mV)	-18,11 ± 5,97	3,16 ± 1,62	1,79 ± 0,17	2,91 ± 1,8

NPs diluídas em água ultrapura na proporção de 1:10.

O tamanho médio medido por NTA (tabela 6) não mudou significativamente entre as formulações ($p = 0,33$), e os valores de D10 mostram que 90 % ou mais das NPs não apresentam tamanho inferior a 100 nm, assim como observado com a técnica de DLS. O tamanho médio das partículas apresenta um valor diferente de acordo com a técnica de medição utilizada, sendo maior no DLS (variando de 203,7 nm a 216,9 nm) do que os apresentados no NTA (variando de 166,0 nm a 171,0 nm). O mesmo ocorre com os valores de D10, D50 e D90. O DLS produz resultados relativamente precisos e consistentes, obtidos em análises rápidas. As diferenças entre os parâmetros medidos nas técnicas de DLS e NTA podem ter influência do fato de, no DLS, o tamanho da partícula ser determinado pelas flutuações da intensidade de luz dispersa pelo movimento Browniano das partículas. A técnica é mais sensível a tamanhos maiores de partículas pois a intensidade da luz dispersa é proporcional a sexta potência do diâmetro da partícula. Já o NTA visualiza e rastreia individualmente as partículas, permitindo a detecção e medição de tamanho de uma ampla gama de populações, sendo que a presença de poucas partículas maiores não comprometem a precisão da medida de tamanho (FILIPE; HAWES; JISKOOT, 2010). Portanto, o NTA complementa as medidas do DLS.

A análise de NTA também quantifica o número de partículas por mL na amostra. A concentração de NPs por mL encontrada foi semelhante nas diferentes formulações de NPs, que é mais uma confirmação de que a polimixina B não causou agregação ou degradação do carreador.

Tabela 6 – Medidas realizadas, em triplicata, por NTA das PBCAnp-b, PBCAnp-p1, PBCAnp-p5 e PBCAnp-p10.

Formulação	PBCAnp-b	PBCAnp-p1	PBCAnp-p5	PBCAnp-p10
Partículas por mL	2,00 ($\pm 0,00$). 10^{12}	1,70 ($\pm 0,00$). 10^{12}	1,60 ($\pm 0,10$). 10^{12}	1,50 ($\pm 0,00$). 10^{12}
Tamanho (nm)	169,0 $\pm$ 1,1	168,0 $\pm$ 2,2	166,0 $\pm$ 3,7	171,0 $\pm$ 4,4
D10 (nm)	114,0 $\pm$ 1,3	115,0 $\pm$ 4,1	112,0 $\pm$ 3,1	118,0 $\pm$ 3,1
D50 (nm)	147,0 $\pm$ 1,9	150,0 $\pm$ 3,1	150,0 $\pm$ 5,1	144,0 $\pm$ 4,2
D90 (nm)	225,0 $\pm$ 5,2	210,0 $\pm$ 2,1	204,0 $\pm$ 3,8	219,0 $\pm$ 8,0

NPs diluídas em água ultrapura na proporção de 1:1000.

4.3.2 Determinação da eficiência de encapsulação (EE) do fármaco

A eficiência de encapsulação foi determinada para as NPs de PBCA e comparadas com as outras NPs obtidas anteriormente (tabela 7).

Tabela 7 – Eficiência de encapsulação e quantidade de fármaco encapsulada nas NPs formuladas. As amostras correspondem a triplicata de NPs.

Formulação nanoestruturada	Média EE		Quantidade média encapsulada de fármaco (μg) por mL de NPs*	
PBCAnp-p1	21,6 %		216 $\mu\text{g/mL}$	
PBCAnp-p5	17,7 %		885 $\mu\text{g/mL}$	
PBCAnp-p10	10,5 %		1050 $\mu\text{g/mL}$	
Quitosana 0,25 mg/mL	18,0 %		45 $\mu\text{g/mL}$	
Quitosana 0,5 mg/mL	15,5 %		77,5 $\mu\text{g/mL}$	
Quitosana 1 mg/mL	12,5 %		125 $\mu\text{g/mL}$	
Gelatina 0,5 mg/mL	48,2 %		241 $\mu\text{g/mL}$	

* A comparação foi feita em mL de NPs pois a massa das mesmas não foi determinada.

A polimixina B foi incorporada nas nanoestruturas por adsorção eletrostática. Neste caso, quanto mais fármaco no meio externo maior a adsorção, relação observada tanto com quitosana quanto com PBCA (tabela 7, terceira coluna). A eficiência de encapsulação foi inversamente proporcional ao aumento de polimixina B (tabela 7, segunda coluna), resultado provavelmente decorrente da concentração de fármaco estar próxima a capacidade máxima de carga por adsorção da estrutura polimérica. Uma maneira de aumentar a capacidade de carga seria adicionar fármaco no interior da NPs, mas essa técnica se mostrou inviável para polimixina B, como explicado anteriormente (CABEZA et al., 2015).

Para a mesma concentração de polimixina B adicionada (1 mg/mL), a quantidade incorporada em PBCAnp foi praticamente o dobro quando comparado a NP de quitosana. Já a NP de gelatina incorporou mais fármaco que a quitosana, mas ainda assim pouco fármaco (adição de mais polimixina B levou a precipitação). Dessa forma, as NPs de PBCA apresentaram a maior quantidade de polimixina B incorporada. Comparando as NPs de PBCA entre si, não houve ganho significativo de quantidade de polimixina B adsorvida da PBCAnp-p5 para a PBCAnp-p10, a segunda formulação não foi utilizada nos experimentos seguintes.

4.3.3 Avaliação da estabilidade

A estabilidade das formulações de PBCAnp em função do tempo de estocagem foi avaliada pelo acompanhamento das variações de tamanho e potencial ζ , assim como a taxa de encapsulação de polimixina B.

As NPs sem fármaco (tabela 8) mantiveram estável seu tamanho no período analisado (tabela 8; $p = 0,11$). O potencial ζ mantém sua estabilidade até o 14º dia ($p = 0,30$), decaindo a partir de então. Como a estabilização das partículas é estérica, a queda do potencial não é diretamente relacionada a instabilidade coloidal, tanto que o tamanho se mantém.

Tabela 8 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-b através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.

	0 dias	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias
Tamanho (nm)	216,9 $\pm$ 20,2	214,8 $\pm$ 19,2	211,2 $\pm$ 20,7	187,4 $\pm$ 2,6	201,2 $\pm$ 13,4
PDI	0,167 $\pm$ 0,041	0,153 $\pm$ 0,054	0,179 $\pm$ 0,046	0,135 $\pm$ 0,007	0,156 $\pm$ 0,042
D10	133,3 $\pm$ 14,3	135,4 $\pm$ 10,5	129,4 $\pm$ 8,7	120,3 $\pm$ 4,5	127,3 $\pm$ 5,2
D50	232,3 $\pm$ 26,8	229,2 $\pm$ 24,8	222,1 $\pm$ 24,4	198,3 $\pm$ 4,7	210,3 $\pm$ 12,7
D90	416,2 $\pm$ 88,9	402,0 $\pm$ 84,8	418,2 $\pm$ 90,3	337,0 $\pm$ 21,7	372,7 $\pm$ 58,7
Potencial ζ (mV)	-18,11 $\pm$ 5,97	-15,33 $\pm$ 3,35	-15,854 $\pm$ 1,78	-9,44 $\pm$ 0,41	-2,18 $\pm$ 0,46

Análises realizadas em triplicata. Temperatura de armazenamento 4 a 8 °C.

As NPs de PBCAnp-p1 (tabela 9) mantiveram todos os parâmetros estudados estáveis: tamanho ($p = 0,63$), potencial ζ ($p = 0,40$) e eficiência de encapsulação ($p = 0,9$), assim como a PBCAnp-p5 (tabela 10, $p = 0,34$ para o tamanho, $p = 0,07$ para o potencial ζ e $p = 0,99$ para EE) e a PBCAnp-10 ($p = 0,23$ para o tamanho, $p = 0,18$ para o potencial ζ e $p = 0,90$ para EE).

Tabela 9 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-p1 através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.

	0 dias	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias
Tamanho	207,4 ± 12,6	211,9 ± 21,0	214,4 ± 23,8	196,0 ± 2,2	212,9 ± 14,9
PDI	0,182 ± 0,037	0,205 ± 0,038	0,217 ± 0,055	0,201 ± 0,031	0,200 ± 0,035
D10	129,3 ± 11,1	125,5 ± 5,6	127,2 ± 9,9	118,7 ± 4,5	124,7 ± 7,0
D50	217,3 ± 20,3	224,0 ± 31,4	227,2 ± 37,7	201,3 ± 9,0	225,8 ± 17,4
D90	403,2 ± 66,2	415,7 ± 95,7	402,6 ± 112,0	360,7 ± 29,5	434,0 ± 79,0
Potencial ζ (mV)	3,16 ± 1,62	4,57 ± 0,33	5,03 ± 0,86	4,96 ± 0,51	4,53 ± 0,17
EE (%)	21,6 ± 8,8	21,8 ± 2,2	28,4 ± 3,4	18,0 ± 6,0	20,2 ± 6,2

Análises realizadas em triplicata. Temperatura de armazenamento 4 a 8 °C.

Tabela 10 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-p5 através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.

	0 dias	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias
Tamanho	216,5 ± 25,9	214,1 ± 25,0	215,2 ± 25,4	187,6 ± 1,6	202,9 ± 15,7
PDI	0,172 ± 0,050	0,183 ± 0,039	0,183 ± 0,053	0,126 ± 0,014	0,152 ± 0,029
D10	131,9 ± 11,4	128,3 ± 11,2	126,8 ± 6,7	124,7 ± 6,5	129,5 ± 8,3
D50	235,9 ± 33,5	228,4 ± 29,1	231,1 ± 31,8	203,7 ± 2,9	216,0 ± 17,9
D90	440,7 ± 105,3	421,7 ± 82,0	448,8 ± 113,9	334,3 ± 15,5	369,8 ± 45,8
Pot. ζ (mV)	1,79 ± 0,17	1,99 ± 0,20	1,99 ± 0,13	1,93 ± 0,11	1,80 ± 0,19
EE (%)	17,7 ± 8,4	16,6 ± 4,1	19,2 ± 1,4	15,0 ± 5,4	16,8 ± 5,5

Análises realizadas em triplicata. Temperatura de armazenamento 4 a 8 °C.

Tabela 11 – Avaliação da estabilidade de PBCAnp-p10 através das medidas de tamanho e potencial ζ por DLS.

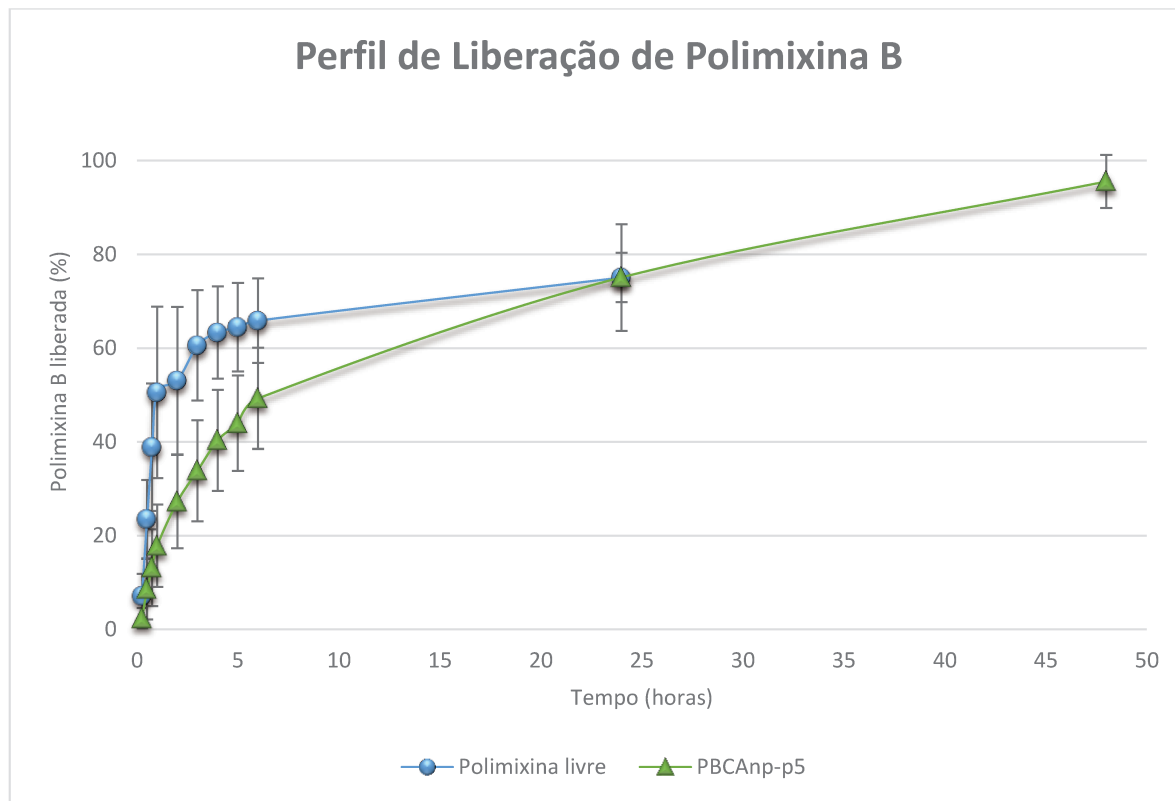
	0 dias	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias
Tamanho	203,7 $\pm$ 18,5	204,8 $\pm$ 18,5	184,6 $\pm$ 1,7	188,4 $\pm$ 1,7	193,2 $\pm$ 0,1
PDI	0,152 $\pm$ 0,022	0,112 $\pm$ 0,035	0,135 $\pm$ 0,015	0,147 $\pm$ 0,008	0,148 $\pm$ 0,018
D10	132,0 $\pm$ 16,3	137,0 $\pm$ 18,8	119,7 $\pm$ 1,2	118,3 $\pm$ 1,5	122,0 $\pm$ 3,0
D50	213,3 $\pm$ 20,1	216,5 $\pm$ 14,9	193,0 $\pm$ 1,7	206,3 $\pm$ 1,5	203,7 $\pm$ 3,5
D90	360,5 $\pm$ 37,8	344,2 $\pm$ 11,6	322,3 $\pm$ 2,5	360,0 $\pm$ 4,4	351,0 $\pm$ 19,1
Pot. ζ (mV)	2,91 $\pm$ 1,8	3,14 $\pm$ 1,73	1,47 $\pm$ 0,28	1,47 $\pm$ 0,13	1,24 $\pm$ 0,12
EE (%)	10,5 $\pm$ 5,1	8,0 $\pm$ 0,2	-	7,9 $\pm$ 5,4	6,0 $\pm$ 2,9

Análises realizadas em triplicata. Temperatura de armazenamento 4 a 8 °C.

4.3.4 Perfil de liberação do fármaco

O perfil de liberação do fármaco foi traçado em tampão PBS e 37 °C (figura 11). Em relação ao fármaco livre, foi detectado 50% de polimixina B no compartimento aceptor após 1 hora de experimento, enquanto a polimixina B em PBCAnp-p5 demorou 6-7 horas para atingir esse valor. O perfil de liberação mostrou uma liberação sustentada de polimixina B quando incorporada na NP, com taxa de liberação em função do tempo adequada a internalização por macrófagos infectados.

Figura 11 – Perfil de liberação da polimixina B livre e nanoencapsulada (PBCAnp-p5), realizada em células de Franz, em sextuplicata. Porcentagem de polimixina B liberada em função do tempo (horas), analisada por micro BCA.



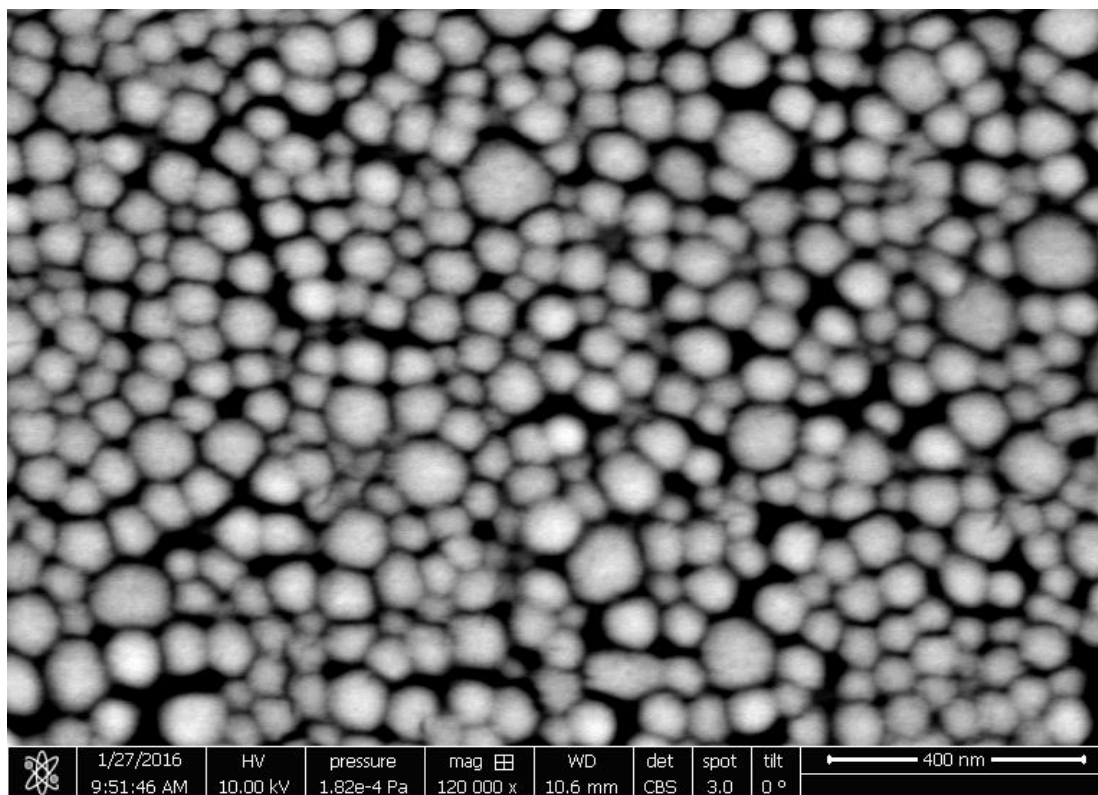
A membrana de celulose utilizada para separar os compartimentos de teste é extensamente utilizada com proteínas e descrita como de baixa ligação com as mesmas, além de ter poros da membrana de 12-14 kDa, que são pelo menos 12 vezes maiores que a polimixina B (1,023 kDa). Mesmo assim, a polimixina B livre não apresentou perfil de liberação imediata. É possível que haja um equilíbrio de adsorção de polimixina B na membrana, retardando sua passagem ao compartimento doador, mas não foram feitos experimentos para testar essa hipótese.

4.3.5 Morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica mostrou que as NPs PBCAnp-b e PBCAnp-p5 são esféricas (figura 12). Esse resultado valida a utilização de DLS como método de medição

de tamanho de partícula, pois o mesmo utiliza para seus cálculos o modelo esférico. A forma esférica observada por MEV está de acordo com o encontrado por Bootz e colegas, assim como a diminuição no tamanho de partícula, quando comparado com o medido por DLS (BOOTZ et al., 2004). A diminuição se dá pela retirada de água (secagem) feita para possibilitar a leitura.

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura de PBCAnp-b, seca a temperatura ambiente.



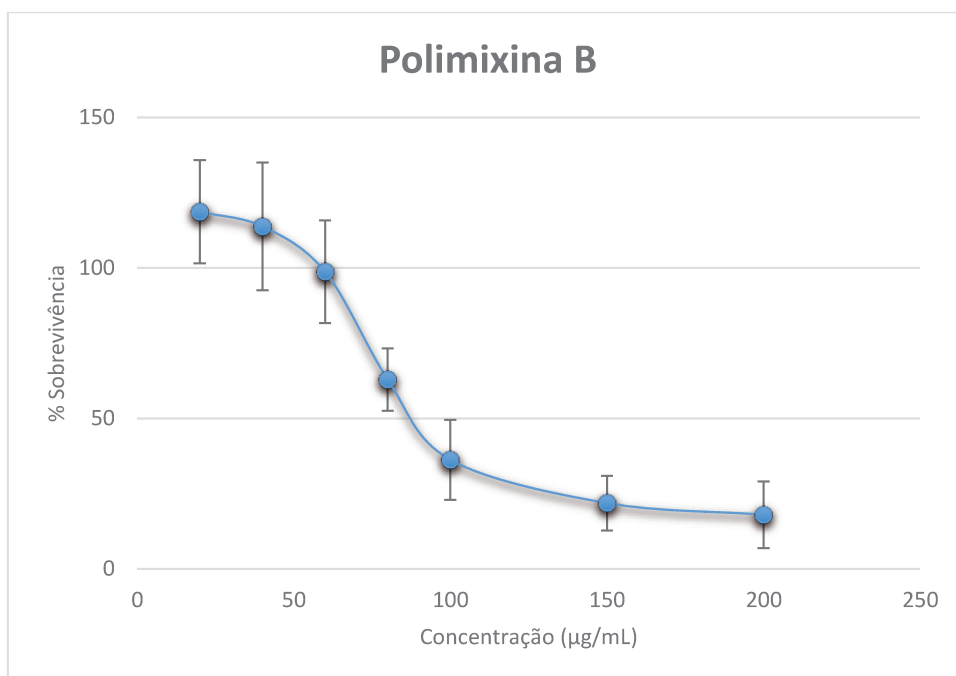
4.3.6 *Potencial leishmanicida das formulações*

4.3.6.1 Atividade leishmanicida

Os testes da atividade leishmanicida das formulações caracterizadas foram realizados *in vitro* com promastigotas. A princípio, PBCAnp-p1 foi escolhida para os testes, porém a baixa diluição causava turvação dos poços e prejudicava o

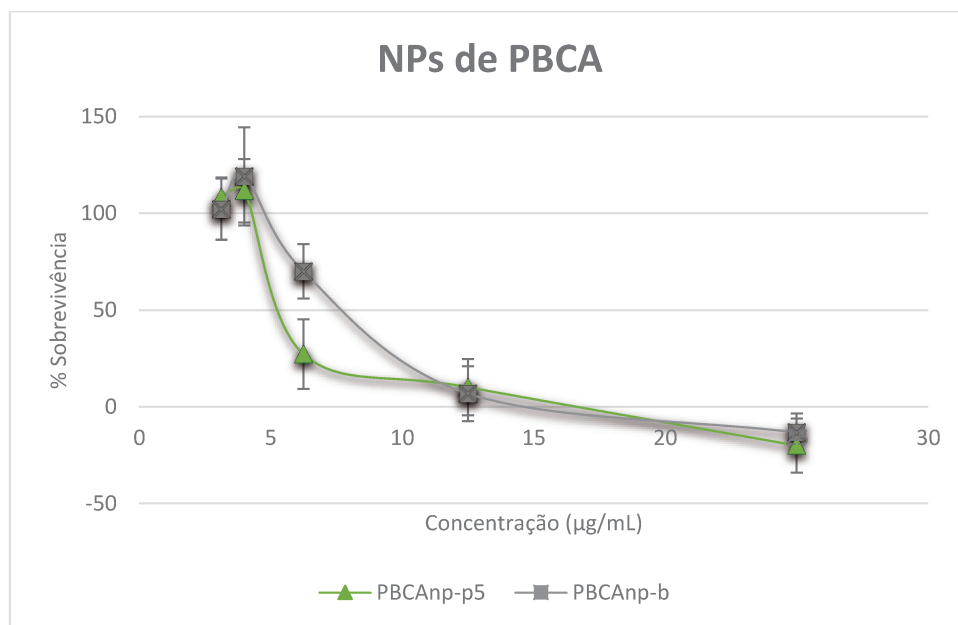
acompanhamento dos resultados. Assim, padronizou-se o uso de PBCAnp-p5, que pode ser diluída cinco vezes mais para atingir a mesma concentração de polimixina B e evitou turvação. Os resultados estão apresentados nas figuras 13 e 14.

Figura 13 – Porcentagem de sobrevivência de promastigotas de *L. amazonensis* em função da concentração de polimixina B.



Análise realizada em decaplicata.

Figura 14 – Porcentagem de sobrevivência de promastigotas de *L. amazonensis* em função da concentração de PBCAnp-b e PBCAnp-p5.



Análise realizada em decaplicata.

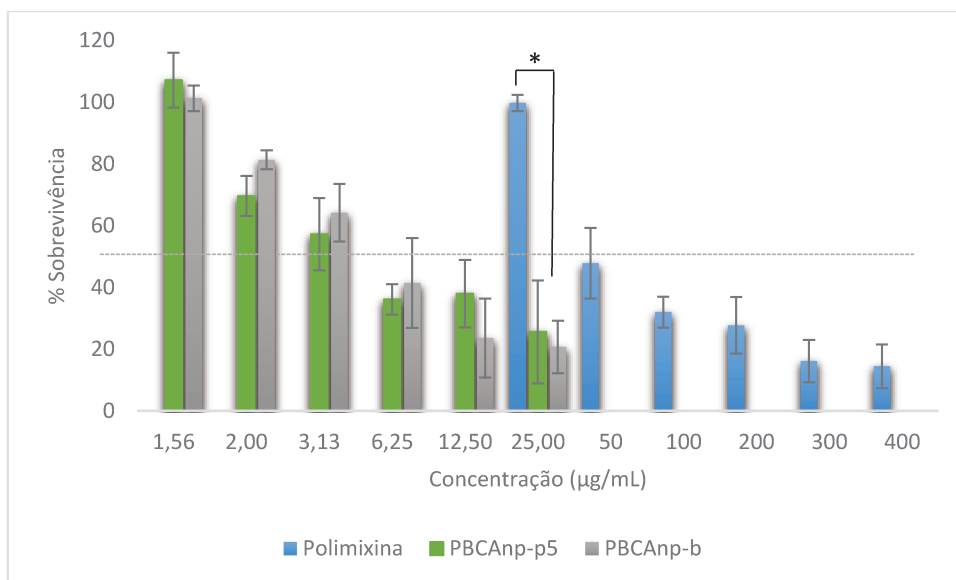
O valor de IC₅₀ encontrado para a polimixina B livre foi de 77,2 µg/mL (55 µM). Apesar do fármaco livre apresentar um IC₅₀ relativamente alto, é importante ressaltar que o modelo atual de teste de susceptibilidade *in vitro* pode subjugar a eficácia leishmanicida, pois estes peptídeos podem ser inativados por soro fetal bovino e alta concentração salina dos meios de cultura (MCDERMOTT, 2004; NGUYEN et al., 2010; YEAMAN et al., 2002). Ademais, diversos fármacos apresentaram IC₅₀ maior em formas extracelulares: IC₅₀ de anfotericina para amastigotas intracelulares foi metade do encontrado para as formas extracelulares, enquanto o stibogluconato de sódio teve diminuição do índice de pelo menos três vezes, na mesma condição (VERMEERSCH et al., 2009).

A formulação PBCAnp-p5 atingiu IC₅₀ de 5,1 µg/mL (3,7 µM, diluição da NP = 1:980). A NP vazia também apresentou atividade leishmanicida, (diluição da NP no IC₅₀ = 1:659), sendo responsável em grande parte pela queda do IC₅₀ da polimixina B. Gaspar e colaboradores (1992) já haviam observado atividade leishmanicida de PBCAnp vazia em macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania donovani*, mas não avaliou as promastigotas extracelulares ou o efeito citotóxico dessa dose em macrófagos.

4.3.6.2 Viabilidade celular de macrófagos peritoneais

A viabilidade celular proporcionada pelas formulações foi avaliada em macrófagos peritoneais murinos por 24 horas (figura 15).

Figura 15 – Porcentagem de sobrevivência dos macrófagos peritoneais extraídos de camundongos BALB/C em função da concentração de polimixina B, PBCAnp-p5 e PBCAnp-b.



* $p < 0,05$. Análise realizada em quintuplicata.

Todas as formulações apresentaram atividade citotóxica nas concentrações de IC50 determinadas para promastigotas extracelulares de *Leishmania amazonensis*. O resultado não era esperado, visto que não foram encontrados relatos na literatura de citotoxicidade de polimixina B em macrófagos; a polimixina B é extensivamente utilizada em culturas celulares (incluindo macrófagos) para neutralizar lipopolissacarídeos, mas em concentrações menores (CARDOSO et al., 2007). Como havia a possibilidade do IC50 ser menor para amastigotas intracelulares, em valor que não fosse tóxico aos macrófagos, foi realizado o teste com os macrófagos infectados.

4.3.6.3 Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e produção de óxido nítrico (NO)

Macrófagos peritoneais de camundongo foram cultivados sobre lamínulas, infectados com *L. amazonensis* e tratados. As lamínulas foram fixadas e coradas para, então, serem analisadas. As imagens das microscopias estão apresentadas na figura 16. A partir das observações das lâminas com macrófagos infectados, com tratamento ou sem, foi possível confirmar os resultados obtidos pelos testes de MTT realizados anteriormente.

Apesar de 100 µg/mL de polimixina B apresentar uma maior função leishmanicida que 50 µg/mL, na observação das lâminas a contagem de parasitos foi semelhante, isso porque as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* tem diferente composição da parede celular e, por isso, sensibilidades diferentes.

Figura 16 – Macrófagos (a) sem tratamento e sem infecção; (b) sem tratamento, infectados; (c) infectados e tratados com Polimixina B 100 $\mu\text{g/mL}$; (d) infectados e tratados com Polimixina B 50 $\mu\text{g/mL}$; (e) infectados e tratados com Polimixina B 25 $\mu\text{g/mL}$; (f) infectados e tratados com PBCAnp-p5 20 $\mu\text{g/mL}$; (g) infectados e tratados com PBCAnp-p5 10 $\mu\text{g/mL}$; (h) infectados e tratados com PBCAnp-p5 5 $\mu\text{g/mL}$; (i) infectados e tratados com PBCAnp-b 20 $\mu\text{g/mL}$; (j) infectados e tratados com PBCAnp-b 10 $\mu\text{g/mL}$; (k) infectados e tratados com PBCAnp-b 5 $\mu\text{g/mL}$.

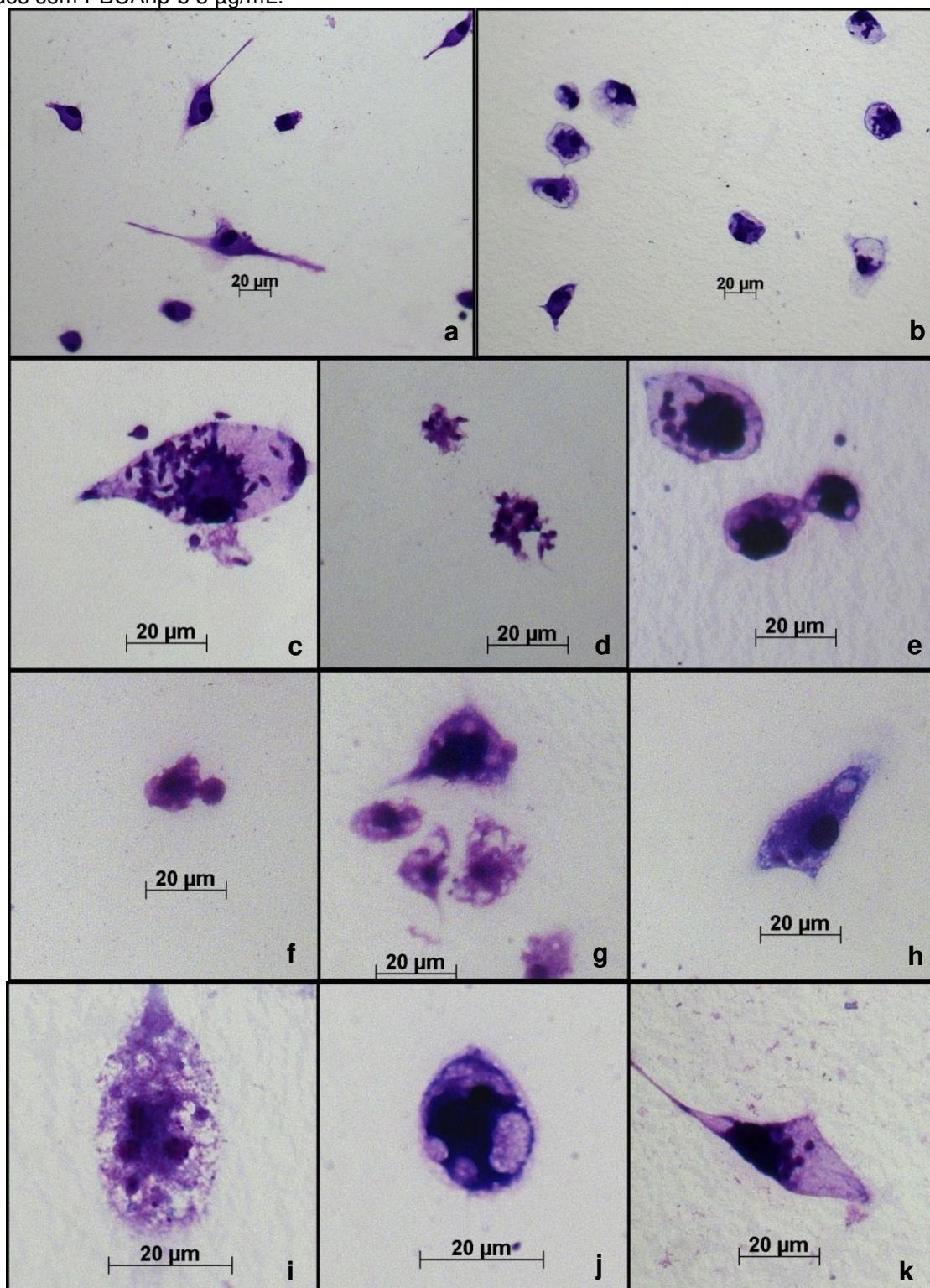


Tabela 12 – Observações realizadas nas lâminas de macrófagos (triplicata), comparados a viabilidade celular (MTT) e a produção de NO.

Tratamento	Infecção	Atividade leishmanicida	Integridade macrófagos	Viabilidade celular (%)	Produção NO (μM)
Sem tratamento	N	*	++	100	11,0
Sem tratamento	I	-	++	100	7,4
Polimixina B 100 $\mu\text{g/mL}$	N	*	+	32,0 $\pm$ 5,0	8,7
Polimixina B 100 $\mu\text{g/mL}$	I	+	+	32,0 $\pm$ 5,0	4,4
Polimixina B 50 $\mu\text{g/mL}$	I	+	+	47,8 $\pm$ 11,5	8,1
Polimixina B 25 $\mu\text{g/mL}$	I	-	++	99,8 $\pm$ 2,6	6,2
PBCAnp-p5 20 $\mu\text{g/mL}$	N	*	+	~ 20	3,6
PBCAnp-p5 20 $\mu\text{g/mL}$	I	+++	+	~ 20	4,6
PBCAnp-p5 10 $\mu\text{g/mL}$	I	+++	+	~ 24	ND
PBCAnp-p5 5 $\mu\text{g/mL}$	I	++	++	~ 50	4,9
PBCAnp-b 20 $\mu\text{g/mL}$	N	*	-	~ 20	ND
PBCAnp-b 20 $\mu\text{g/mL}$	I	+++	-	~ 20	ND
PBCAnp-b 10 $\mu\text{g/mL}$	I	+++	+	~ 24	4,5
PBCAnp-b 5 $\mu\text{g/mL}$	I	++	++	~ 50	3,9
Anfotericina 5 $\mu\text{g/mL}$	I	+++	-	**	6,0

* Não há infecção, portanto não há atividade; ** Dado não disponível. ND não detectado. I: células infectadas; N: sem infecção. Atividade leishmanicida: - 15-20 parasitos por célula (sem atividade), + 10-15 parasitos por célula, ++ 8-10 parasitos por célula, +++ sem parasitos. Integridade dos macrófagos: - células “destruídas”, + poucas células íntegras, ++ células íntegras.

4.3.7 Potencial microbicida das formulações

4.3.7.1 Ensaio de concentração inibitória mínima (MIC)

As feridas causadas pela leishmaniose cutânea estão frequentemente contaminadas por bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a infecção secundária um dos graves problemas decorrentes da leishmaniose (GONÇALVES et al., 2009). Dessa forma, foi testada a atividade microbicida das formulações.

O teste de MIC foi realizado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (tabela 13).

Tabela 13 – Resultados do teste de MIC de polimixina B livre e de NPs de PBCA com e sem incorporação de polimixina B.

	Polimixina B	PBCAnp-b	PBCAnp-p1	PBCAnp-p10
<i>P. aeruginosa</i>	2 µg/mL	Indeterminado*	2 µg/mL	2 µg/mL
<i>E. coli</i>	2 µg/mL	Indeterminado	2 µg/mL	2 µg/mL
<i>K. pneumoniae</i>	2 µg/mL	Indeterminado	2 µg/mL	2 µg/mL
<i>S. aureus</i>	500 µg/mL	Indeterminado	500 µg/mL	-

Teste realizado em triplicata, em três dias diferentes. * A maior concentração de PBCAnp-b utilizada (1:1) não apresentou atividade.

A polimixina B apresentou MICs condizentes com os já relatados na literatura para gram negativas (GALES; REIS; JONES, 2001; URBAN et al., 2011). O MIC para *S. aureus* se mostrou maior que o encontrado na literatura (XIONG et al., 2005). A incorporação da polimixina B nas NPs não alterou a atividade biológica em bactérias, o que configura uma aplicação específica as gram negativas. As concentrações eficazes de MIC foram muito abaixo das concentrações consideradas citotóxicas aos macrófagos, o que viabiliza sua utilização na terapêutica para esse fim.

5 CONCLUSÕES

NPs de quitosana, gelatina e PBCA foram produzidas, com sucesso, para subsequente incorporação de fármaco.

A incorporação de polimixina B nas diferentes NPs estudadas foi variada, sendo que as formulações de PBCA incorporaram a maior quantidade de fármaco.

As formulações de PBCA apresentaram o menor índice de polidispersividade (0,167), mantiveram tamanho reprodutível, estável e adequado ao direcionamento para macrófagos.

PBCAnp vazias foram as únicas que apresentaram atividade leishmanicida.

Polimixina B apresentou atividade leishmanicida relativamente baixa em promastigotas e amastigotas intracelulares, sendo que sua nanoestruturação em PBCA apresentou atividade 18 vezes superior ao fármaco livre.

As concentrações eficazes das nanoestruturas e do fármaco livre foram tóxicas aos macrófagos, o que inviabiliza sua utilização terapêutica como leishmanicida.

As NPs de PBCA com polimixina B se mostraram inadequadas como leishmanicida, mas adequadas como bactericida ou ainda como carreador funcionalizado para outros fármacos leishmanicidas de alto IC50.

PBCAnp não modificaram a atividade biológica da polimixina B frente a bactérias e não apresentam atividade bacteriana sem o fármaco. As concentrações eficazes não apresentam citotoxicidade aos macrófagos.

REFERÊNCIAS

- AÏT-ODHIA, K. et al. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. **Parasitology research**, v. 109, n. 5, p. 1225–1232, nov. 2011.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415–433, 1998.
- ANITHA, A. et al. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1158–1164, 17 mar. 2011.
- ARNOLD, T. M.; FORREST, G. N.; MESSMER, K. J. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. **American journal of health-system pharmacy: AJHP: official journal of the American Society of Health-System Pharmacists**, v. 64, n. 8, p. 819–826, 15 abr. 2007.
- ASTHANA, S. et al. Immunoadjuvant Chemotherapy of Visceral Leishmaniasis in Hamsters Using Amphotericin B-Encapsulated Nanoemulsion Template-Based Chitosan Nanocapsules. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1714–1722, 1 abr. 2013.
- BARKER, K. F. Antibiotic resistance: a current perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 2, p. 109–124, ago. 1999.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, set. 2004.
- BASU, M. K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 681–689, set. 2004.
- BEHAN, N.; BIRKINSHAW, C.; CLARKE, N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particle formation. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1335–1344, 1 jun. 2001.
- BOOTZ, A. et al. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 57, n. 2, p. 369–375, mar. 2004.
- BRAJTBURG, J. et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 2, p. 183–188, fev. 1990.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília - DF - Brasil: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília - DF - Brasil: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BROWN, R. E.; JARVIS, K. L.; HYLAND, K. J. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. **Analytical Biochemistry**, v. 180, n. 1, p. 136–139, jul. 1989.

CABEZA, L. et al. Enhanced antitumor activity of doxorubicin in breast cancer through the use of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1291–1306, 2015.

CARDOSO, L. S. et al. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 1, 3 jan. 2007.

CARNEIRO, G. et al. **Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis**. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 9, p. 1083–1097, set. 2012.

CDC, C. FOR D. C. AND P. **CDC - Leishmaniasis - Biology**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, nov. 2007.

CHENG, F. et al. Modeling of small-molecule release from crosslinked hydrogel microspheres: effect of crosslinking and enzymatic degradation of hydrogel matrix. **International journal of pharmaceutics**, v. 403, n. 1, p. 90–95, 2011.

CHOY, Y. B. et al. Monodisperse Gelatin Microspheres as a Drug Delivery Vehicle: Release Profile and Effect of Crosslinking Density. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 8, p. 758–765, 11 ago. 2008.

COBB, S. L.; DENNY, P. W. Antimicrobial peptides for leishmaniasis. **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 11, n. 8, p. 868–875, ago. 2010.

COPPI, G. et al. Alginate microparticles for Polymyxin B Peyer's patches uptake: microparticles for antibiotic oral administration. **Journal of microencapsulation**, v. 21, n. 8, p. 829–839, dez. 2004.

COPPI, G. et al. Toxicity and gut associated lymphoid tissue translocation of polymyxin B orally administered by alginate/chitosan microparticles in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 21–26, 2008.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. **Journal of Controlled Release**, v. 17, n. 2, p. 187–198, out. 1991.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 899–905, 2001.

CRUZ, T. et al. Interaction between polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 73–79, jan. 1997.

DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 505–521, 10 jul. 2007.

DEVOCELLE, M. Targeted Antimicrobial Peptides. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 5 out. 2012.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407–2412, 1 out. 1988.

DOUNIGHI, N. M. et al. Preparing and characterizing chitosan nanoparticles containing Hemiscorpius lepturus scorpion venom as an antigen delivery system. **Archives of Razi Institute**, v. 67, n. 2, p. 145–153, 2012.

DUQUE BELTRÁN, S. et al. Evaluación del efecto del ácido nalidíxico, ampicilina, kanamicina, penicilina G y polimixina B en los cultivos de promastigotes de leishmania; Evaluation the effect of nalidixic acid, ampicillin, kanamycin, penicillin G and polymyxin B in leishmania promastigote cultures. **Biomédica (Bogotá)**, v. 12, n. 2, p. 68–79, abr. 1992.

DURAND, R. et al. Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against Leishmania infantum in a mouse model. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 1361–1367, nov. 1997.

DUTTA, A. et al. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 54, n. 2, p. 119–122, jun. 2005.

EDWARDS, G.; KRISHNA, S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Parasitic Infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 233–242, 1 abr. 2004.

EJIM, L. et al. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 6, p. 348–350, jun. 2011.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2545–2561, fev. 2012.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 2950–2962, 15 abr. 2009.

FILIPE, V.; HAWES, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, 4 mar. 2010.

GALES, A. C.; REIS, A. O.; JONES, R. N. Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 183–190, 1 jan. 2001.

GASPAR, R. et al. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-loaded nanoparticles against intracellular Leishmania donovani. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 86, n. 1, p. 41–49, fev. 1992.

GIAMARELLOU, H.; POULAKOU, G. Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? **Drugs**, v. 69, n. 14, p. 1879–1901, 1 out. 2009.

GONÇALVES, E. DA G. DO R. et al. Bacterial infection in cutaneous leishmaniasis: bacterial pattern and sensitivity to antibiotics. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 219–221, abr. 2009.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; FARO, J.; FERNÁNDEZ, C. Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice. **Vaccine**, v. 26, n. 3, p. 292–300, 17 jan. 2008.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 21 abr. 2009.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 66, n. 17, p. 2873–2896, set. 2009.

HOEBEN, F. J. M. et al. Polymyxin-Coated Au and Carbon Nanotube Electrodes for Stable [NiFe]-Hydrogenase Film Voltammetry. **Langmuir**, v. 24, n. 11, p. 5925–5931, 1 jun. 2008.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. **Microwaves in nanoparticle synthesis**. 1st. ed. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 22–30, mar. 2005.

KRZEK, J. et al. Simultaneous identification and quantitative determination of neomycin sulfate, polymyxin B sulfate, zinc bacitracin and methyl and propyl hydroxybenzoates in ophthalmic ointment by TLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 4, p. 629–636, fev. 2001.

KULKARNI, M. M. et al. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous Leishmania infection. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 6, p. 913–923, jun. 2011.

MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. **Dynamic Light Scattering Common Terms Defined**. Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf>. Acesso em: 7 maio. 2016.

MARR, A. K.; GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. **Current Opinion in Pharmacology**, Anti-infectives/New Technologies. v. 6, n. 5, p. 468–472, out. 2006.

MARR, A. K.; MCGWIRE, B. S.; MCMASTER, W. R. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1047–1059, set. 2012.

MARSHALL, J. D. et al. Polymyxin B enhances ISS-mediated immune responses across multiple species. **Cellular immunology**, v. 229, n. 2, p. 93–105, jun. 2004.

MATTOS, K. P. H. et al. Acquired skin hyperpigmentation following intravenous polymyxin B treatment: a cohort study. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 29, n. 3, p. 388–390, 1 maio 2016.

MCALLISTER, S. M.; ALPAR, H. O.; BROWN, M. R. W. Antimicrobial properties of liposomal polymyxin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 203–210, 1 fev. 1999.

MCDERMOTT, A. M. Defensins and Other Antimicrobial Peptides at the Ocular Surface. **The ocular surface**, v. 2, n. 4, p. 229–247, out. 2004.

MCQUILLAN, R. F. et al. A randomized controlled trial comparing mupirocin and polysporin triple ointments in peritoneal dialysis patients: the MP3 Study. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 7, n. 2, p. 297–303, fev. 2012.

MOEN, M. D.; LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; SCOTT, L. J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. **Drugs**, v. 69, n. 3, p. 361–392, 2009.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 3, p. 311–330, 1 mar. 2005.

NAHAR, M. et al. Development, characterization, and toxicity evaluation of amphotericin B-loaded gelatin nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 252–261, set. 2008.

NAHAR, M. et al. In vitro evaluation of surface functionalized gelatin nanoparticles for macrophage targeting in the therapy of visceral leishmaniasis. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 2, p. 93–105, 1 fev. 2010.

NELSON, K. G. et al. Nanodisk-Associated Amphotericin B Clears Leishmania major Cutaneous Infection in Susceptible BALB/c Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1238–1244, abr. 2006.

NGUYEN, L. T. et al. Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12684, 10 set. 2010.

NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 1, p. 111–127, 1 jan. 2009.

NITTA, S. K.; NUMATA, K. Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 1629–1654, 2013.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 34, n. 12, p. 551–561, dez. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OPS/OMS. **Informe Epidemiológico das Américas - Leishmanioses** Organização Pan-Americana de Saúde, , jul. 2015. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754>

OSORIO, F. A. et al. Effects of Concentration, Bloom Degree, and pH on Gelatin Melting and Gelling Temperatures Using Small Amplitude Oscillatory Rheology. **International Journal of Food Properties**, v. 10, n. 4, p. 841–851, 26 out. 2007.

PACHIONI-VASCONCELOS, J. DE A. et al. Nanostructures for protein drug delivery. **Biomaterials Science**, v. 4, 26 jan. 2016.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510–517, 1 nov. 2001.

PATTANI, A. S.; MANDAWGADE, S. D.; PATRAVALE, V. B. Development and comparative antimicrobial evaluation of lipid nanoparticles and nanoemulsion of Polymyxin B. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 6, n. 9–10, p. 2986–2990, out. 2006.

PELISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, mar. 2011.

PÉREZ-CORDERO, J. J. et al. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. **Peptides**, v. 32, n. 4, p. 683–690, abr. 2011.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids**. [s.l.] Elsevier, 2009.

POOL, V. et al. Prevalence of anti-gelatin IgE antibodies in people with anaphylaxis after measles-mumps rubella vaccine in the United States. **Pediatrics**, v. 110, n. 6, p. e71, dez. 2002.

RAAFAT, D. et al. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3764–3773, 15 jun. 2008.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 1 jul. 2000.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, jun. 2003.

SALAY, L. C. et al. Dermaseptin 01 as antimicrobial peptide with rich biotechnological potential: study of peptide interaction with membranes containing Leishmania amazonensis lipid-rich extract and membrane models. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 10, p. 700–707, 2011.

SAÚDE, A. C. M. et al. Nanoformulated antibiotics: the next step for pathogenic bacteria control. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 10, p. 1232–1240, 2013.

SCHÄFER-KORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H.-C. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Lipid Nanoparticles: Recent Advances. v. 59, n. 6, p. 427–443, 10 jul. 2007.

SHIH, L. K.; GAIK, C. L. Polymyxin B induced generalized skin hyperpigmentation in infants. **Journal of Pediatric Sciences**, v. 6:e215, 2014.

SOFLAEI, S. et al. *In Vitro* Antiparasitic and Apoptotic Effects of Antimony Sulfide Nanoparticles on *Leishmania infantum*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 26 jun. 2012.

SOROFF, H. S.; SASVARY, D. H. Collagenase ointment and polymyxin B sulfate/bacitracin spray versus silver sulfadiazine cream in partial-thickness burns: a pilot study. **The Journal of burn care & rehabilitation**, v. 15, n. 1, p. 13–17, fev. 1994.

SOUZA, V. L. DE et al. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 23–31, fev. 2011.

TAVARES, G. D. **Nanopartículas de poli (n-butil-cianoacrilato) revestidas com N,N,N-trimetilquitosana: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeabilidade *in vitro***. Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Universidade de São Paulo, 2013.

TRIPODI, S. et al. Severe anaphylaxis to sheep's milk cheese in a child desensitized to cow's milk through specific oral tolerance induction. **European annals of allergy and clinical immunology**, v. 45, n. 2, p. 56–60, abr. 2013.

URBAN, C. et al. Polymyxin-Resistant Clinical Isolates of Escherichia coli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 388–389, jan. 2011.

VERMEERSCH, M. et al. In vitro susceptibilities of Leishmania donovani promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, set. 2009.

WIKLER, M. A. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition**. [s.l.: s.n.].

XIONG, Y. Q. et al. Functional Interrelationships between Cell Membrane and Cell Wall in Antimicrobial Peptide-Mediated Killing of Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3114–3121, ago. 2005.

XU, H. et al. Chitosan–hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 18, n. 11, p. 869–875, 2007.

YANG, C.-H. et al. Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles. **Lab Chip**, v. 9, n. 1, p. 145–150, 2009.

YEAMAN, M. R. et al. Synthetic Peptides That Exert Antimicrobial Activities in Whole Blood and Blood-Derived Matrices. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3883–3891, 1 dez. 2002.

YORDANOV, G. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of econazole-loaded poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 25th Meeting of the European Colloid and Interface Society 25th Meeting of the European Colloid and Interface Society. v. 413, p. 260–265, 5 nov. 2012.

YOSHINO, N. et al. Polymyxins as Novel and Safe Mucosal Adjuvants to Induce Humoral Immune Responses in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61643, 11 abr. 2013.

ZAVASCKI, A. P. et al. Head and Neck Hyperpigmentation Probably Associated With Polymyxin B Therapy. **Annals of Pharmacotherapy**, p. 1060028015595643, 17 jul. 2015.

ZHANG, F. M.; OTANI, H. Immunogenicity and antigenicity of casein phosphopeptides. **Milchwissenschaft**, v. 58, n. 1–2, p. 9–13, 2003.

ZOHRI, M. et al. Nisin-Loaded Chitosan/Alginate Nanoparticles: A Hopeful Hybrid Biopreservative. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 1, p. 40–49, 2013.

ZWIOREK, K. et al. Delivery by Cationic Gelatin Nanoparticles Strongly Increases the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 551–562, 2008.

ANEXOS

Anexo A Cópia da aprovação do comitê de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 07 de Dezembro de 2015

Ilmo(a)

Dr(a). Laura de Oliveira Nascimento

(aos cuidados de Juliana Souza Ribeiro Costa)

Certificamos que o projeto intitulado "**Nanoestruturas biopoliméricas para veiculação de peptídeos antimicrobianos com potencial leishmanicida**", protocolo nº **000323A**, sob a responsabilidade de **Laura de Oliveira Nascimento** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
 Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



Vigência do Projeto: 01/10/2015 a 31/07/2016							
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	balb-c	6 semanas	indiferente	a ser Coletado	30	30	60
Origem: Biotério					TOTAL		60

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
 Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Møireles Jaguaribe Ekman
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

Anexo B Declaração

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Nanoestruturas biopoliméricas para veiculação de peptídeos antimicrobianos com potencial leishmanicida**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de junho de 2016

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Juliana Souza Ribeiro Costa**
RG n.º 43785908-3

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Laura de Oliveira Nascimento**
RG n.º 29992007-0