

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MARIA GABRIELA SIMÕES PIMENTA MACHADO

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PENTAMIDINA, UMA ESTRATÉGIA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor Paulo Costa e
Professora Doutora Anabela Cordeiro

Setembro/2018

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Doutor Paulo Costa, por toda a ajuda, dedicação, e grande disponibilidade. Foi muito importante o seu incentivo nos momentos mais difíceis.

Agradeço também à Professora Doutora Anabela Cordeiro, por toda a dedicação e amabilidade. A sua ajuda foi sem dúvida muito importante para a realização deste projeto.

Ao Doutor Nuno Santarém agradeço toda a ajuda nos ensaios celulares, a paciência e disponibilidade demonstrada, sempre com um sorriso e boa disposição.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Barbora Bruncakova, aluna de Erasmus que se integrou nesta investigação, estou muito agradecida pela ajuda marcante e disponibilidade manifestada sempre. Todos proporcionaram um convívio muito agradável.

Agradeço também aos professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica, por toda a dedicação e pelos conhecimentos que adquiri.

Agradeço ao meu namorado João por me ter acompanhado neste projeto, ter demonstrado um grande apoio e acima de tudo ter-me incentivado sempre.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram presentes neste longo caminho, que de alguma forma me deram força. A vossa amizade é sem dúvida muito importante.

À minha família, como não poderia deixar de ser, pais e irmãos, um grande obrigada por me terem apoiado e acompanhado neste trabalho.

Agradeço sem dúvida à Universidade do Porto e ao I3S por contribuírem para a investigação em Portugal, por permitirem que muitas doenças negligenciadas, como a leishmaniose, não deixem de serem exploradas.

RESUMO

As doenças parasitárias continuam a ser um grande problema de saúde pública, afetando centenas de milhões de pessoas e animais, particularmente em países tropicais e em desenvolvimento. A leishmaniose é uma doença endêmica em 88 países e muito complexa causada por mais de vinte espécies de parasitas protozoários, *Leishmania*, que são transmitidos pela picada do inseto, mosca da areia. Diferentes manifestações clínicas podem surgir e são classificadas como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LM) e visceral (LV). A forma mais comum é a LC, e a LV a forma mais grave da doença. Apesar de geralmente assintomática, esta doença pode tornar-se num grave problema de saúde pública devido à sua morbidade.

Atualmente, a terapêutica disponível está longe de ser satisfatória, devido ao surgimento de resistências, toxicidade elevada e aumento da prevalência de co-infecções por VIH. Assim, a nanotecnologia tem sido uma das estratégias estudadas, para reduzir a toxicidade, os efeitos adversos e adquirir terapêuticas mais eficientes e eficazes.

Neste trabalho desenvolveram-se nanopartículas (NPs) poliméricas de Eudragit contendo o fármaco pentamidina. Apesar da eficácia deste fármaco, já estudada ao longo de anos, o seu uso tem algumas desvantagens, que inclui entre outras a elevada toxicidade e efeitos adversos. O método de preparação foi um sistema de secagem por atomização - *nano spray drying*. Após a preparação, as NPs foram caracterizadas de acordo com o seu tamanho, Potencial Zeta e Índice de Polidispersão. Não foram verificadas diferenças significativas nos tamanhos das NPs contendo o fármaco e NPs vazias. O valor médio mais baixo para o tamanho das NPs contendo pentamidina foi de $243,4 \pm 2,7$ nm, o PZ foi de $29,09 \pm 1,19$ e o IP $0,32 \pm 0,005$. Foi também determinada a eficácia de encapsulação, tendo o resultado demonstrado um valor satisfatório de 62%. O perfil de libertação, demonstrou que a libertação máxima do fármaco (~80%) ocorreu após 60 minutos. Para avaliar a resposta celular ao fármaco e ao veículo que o transporta, foram realizados ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade, comparando o fármaco livre, NPs contendo pentamidina e NPs vazias. Os resultados mostraram IC₅₀ $12,35 \pm 1,09$ μ M para NPs carregadas com fármaco que também apresentaram menor toxicidade. Também foi determinado o IC_{50} , que mostrou uma maior seletividade das NPs contendo pentamidina para as células infetadas. Estes estudos foram também acompanhados de um ensaio de atividade em parasitas *Trypanosoma brucei*, para os quais o fármaco pentamidina é utilizado em tratamentos de 1ª linha. Também neste ensaio foi possível verificar que as NPs contendo pentamidina tinham ação inibitória.

Palavras chave: leishmaniose, nanopartículas, polímero, pentamidina.

ABSTRACT

Parasitic diseases remain a major public health problem affecting hundreds of millions of people and animals, particularly in tropical developing countries. Leishmaniasis is endemic in 88 countries and is a very complex disease caused by more than twenty species of protozoan parasites, *Leishmania*, which are transmitted by the insect sand fly. Three different clinical manifestations can occur: cutaneous *leishmaniasis* (CL), mucocutaneous *leishmaniasis* (ML) and visceral *leishmaniasis* (VL). The most common form of *leishmaniasis* is CL, but LV is the most severe form of the disease. Although generally asymptomatic, this disease can become a serious public health problem due to its morbidity.

Currently available therapeutics are far from satisfactory, especially due to the emergence of resistance, high toxicity and increased prevalence of HIV co-infections. Thus, nanotechnology has been one of the possible strategies that can reduce toxicity, adverse effects and can acquire more efficient and effective therapies.

In this work, pentamidine-loaded Eudragit nanoparticles were developed. Despite the efficacy of this drug, which has been studied over the past years, its use has some drawbacks, including among others the high toxicity and adverse effects. The method of preparation was nano spray drying. After that, NPs were characterized according to their size, Zeta potential and polydispersity index. No significant differences were found in the sizes between NPs loading pentamidine and empty NPs. The medium lower result for size was 243.4 ± 2.7 nm, the Zeta Potential was 29.09 ± 1.19 and the Polydispersity Index was 0.32 ± 0.005 . The efficacy of encapsulation was also determined, and the result demonstrated a satisfactory value of 62%. The release profile demonstrated that the maximum drug release (~80%) occurred after 60 minutes. In order to assess the cell response to a drug and the vehicle carrying it, cell viability and cytotoxicity assays were performed. The studies allowed a comparative analysis of free pentamidine and drug-loaded NPs and empty NPs. The results showed IC_{50} 12.35 ± 1.09 μ M for drug-loaded nanoparticles which also had lower toxicity. We also calculated IS, which showed greater selectivity of pentamidine-loaded polymeric NPs for the infected cells. These studies were also accompanied by an anti-parasitic viability assay against *Trypanosoma brucei*, for which the drug pentamidine is used in 1st line treatments. Also in this assay, it was possible to verify that the formulated NPs had inhibitory action.

Keywords: leishmaniasis, nanoparticles, polymer, pentamidine

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME – absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ADN - ácido desoxirribonucleico
ARN - ácido ribonucleico
CC – capacidade de carga
DC – células dendríticas
DLS - dispersão de luz dinâmica, do inglês *Dynamic Light Scattering*
DNDI-VL 2098 – composto nitroimidazo-oxazole
DP – desvio padrão
EE – eficácia de encapsulação
ELS - espalhamento de luz eletroforético
EROs - espécies reativas de oxigênio
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência
I.M - intramuscular
I.V – intravenoso
ICH – do inglês *International Conference on Harmonisation*
IFN- γ – interferon gama
IL10 – interleucina 10
IL2 – interleucina 2
IL4 – interleucina 4
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
IP – índice de polidispersão
LC – leishmaniose cutânea
LD – difração laser, do inglês *Laser diffraction*
LV – leishmaniose visceral
LM – leishmaniose mucocutânea
MHC - do inglês, *major histocompatibility complex*
MTT – composto também designado brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NO – óxido nítrico
NP(s) – nanopartículas(s)
OMS – Organização Mundial de Saúde
PA 824 – composto também designado pretomanid
PBS – tampão fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*
PCL – policaprolactona
PCR – reação de polimerase em cadeia
PGLA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLA - ácido polilático
PMA - acetato de tetradecanoilforbol
PZ – potencial zeta
RIFI - reação de imunofluorescência indireta
ROS - espécies reativas de oxigênio
SD – *spray drying*
SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida
SLF – sistema de liberação do fármaco
TCR – receptor de células T
Th1 – célula T helper tipo 1
Th2 – célula T helper tipo 2
TND – doenças tropicais negligenciadas
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
Tr1 – célula T reguladora tipo 1
UPLC - cromatografia líquida de ultra eficiência
VIH – vírus da imunodeficiência humana

ÍNDICE

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Leishmaniose | 1 |
| 1.1.1 | Biologia do parasita, Leishmania | 1 |
| 1.1.2 | Manifestações clínicas em humanos | 3 |
| 1.1.2.1 | Leishmaniose cutânea | 4 |
| 1.1.2.2 | Leishmaniose mucocutânea..... | 5 |
| 1.1.2.3 | Leishmaniose visceral..... | 5 |
| 1.1.3 | Manifestações clínicas nos cães | 6 |
| 1.1.4 | Aspectos imunológicos..... | 6 |
| 1.1.5 | Epidemiologia e distribuição geográfica..... | 7 |
| 1.1.6 | Prevenção | 10 |
| 1.1.7 | Farmacoterapêutica, contexto atual..... | 10 |
| 1.1.7.1 | Antimônios pentavalentes | 12 |
| 1.1.7.2 | Anfotericina B..... | 13 |
| 1.1.7.3 | Pentamidina | 14 |
| 1.1.7.4 | Paromomicina | 14 |
| 1.1.7.5 | Miltefosina..... | 15 |
| 1.1.7.6 | Outros fármacos | 15 |
| 1.1.8 | Farmacoterapêutica, contexto futuro | 16 |
| 1.1.8.1 | Fármacos sob investigação..... | 16 |
| 1.1.8.2 | Fitoterapia..... | 17 |
| 1.1.8.3 | Novos sistemas de liberação de fármacos | 18 |
| 1.2 | Avanços da nanotecnologia nas doenças parasitárias..... | 19 |
| 2 | OBJETIVO..... | 21 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 | Materiais..... | 22 |
| 3.1.1 | Pentamidina | 22 |
| 3.1.2 | Eudragit..... | 23 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1.3 | Parasitas e cultura celular..... | 24 |
| 3.1.3.1 | Parasitas..... | 24 |
| 3.1.3.2 | Linha celular monocítica de leucemia humana (células THP-1) | 24 |
| 3.2 | Métodos..... | 24 |
| 3.2.1 | Preparação das nanopartículas poliméricas de pentamidina | 24 |
| 3.2.1.1 | Método de preparação: Nano spray drying..... | 25 |
| 3.2.2 | Caracterização das nanopartículas..... | 29 |
| 3.2.2.1 | Tamanho da partícula | 29 |
| 3.2.2.2 | Dispersão da luz dinâmica - DLS | 29 |
| 3.2.2.3 | Índice de polidispersão (IP)..... | 31 |
| 3.2.2.4 | Potencial Zeta | 32 |
| 3.2.2.5 | Difração laser (LD)..... | 33 |
| 3.2.2.6 | Eficácia de encapsulação..... | 34 |
| 3.2.3 | Desenvolvimento de método analítico espectrofotométrico | 35 |
| 3.2.3.1 | Soluções padrão de pentamidina | 35 |
| 3.2.3.2 | Quantificação da pentamidina contida nas NP de Eudragit..... | 36 |
| 3.2.3.3 | Validação do método analítico | 36 |
| 3.2.4 | Perfil de liberação in vitro da pentamidina | 37 |
| 3.2.5 | Determinação in vitro da atividade das nanopartículas de pentamidina | 39 |
| 3.2.5.1 | Metodologia | 39 |
| 3.2.6 | Determinação in vitro da toxicidade das nanopartículas de pentamidina..... | 41 |
| 3.2.6.1 | Ensaio de MTT em células THP-1 diferenciadas por PMA..... | 41 |
| 3.2.7 | Avaliação in vitro da atividade contra <i>Trypanosoma brucei</i> | 42 |
| 3.2.8 | Índice de seletividade das nanopartículas contendo pentamidina..... | 43 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 4.1 | Desenvolvimento do método analítico para determinar a quantidade de pentamidina encapsulada..... | 44 |
| 4.2 | Eficácia da encapsulação | 46 |
| 4.3 | Caracterização das NP..... | 46 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3.1 | Método por dispersão da luz dinâmica - DLS..... | 46 |
| 4.3.2 | Método por difração a laser – LD..... | 47 |
| 4.4 | Perfil de libertação da pentamidina das nanopartículas | 48 |
| 4.5 | Atividade antiparasitária..... | 50 |
| 4.6 | Citotoxicidade | 52 |
| 4.7 | Índice de seletividade | 52 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 53 |
| 6 | PERSPETIVAS FUTURAS | 54 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – O inseto flebotomíneo vector da leishmaniose, mosca da areia. Adaptado de (4). | 1 |
| Figura 2 – Esquema representativo do ciclo de vida da Leishmania. Adaptado de (6).. | 2 |
| Figura 3 - Lesão característica de leishmaniose cutânea. Adaptado de (11). | 4 |
| Figura 4 - Lesão característica de leishmaniose mucocutânea. É possível verificar a destruição parcial da mucosa nasal. Adaptado de (11)..... | 5 |
| Figura 5 - Lesão característica de leishmaniose visceral. É possível observar-se a esplenomegalia e pancitopenia. Adaptado de (11). | 6 |
| Figura 6 – Mapa representativo dos países onde a leishmaniose visceral é uma infecção endêmica. Casos reportados em 2015. Adaptado de (17). | 8 |
| Figura 7 - Mapa representativo dos países onde a leishmaniose cutânea é uma infecção endêmica. Casos reportados em 2015. Adaptado de (17). | 9 |
| Figura 8 - Estrutura química do estibogluconato de sódio (A) e do antimoniato de meglumina (B). | 12 |
| Figura 9 - Estrutura química da anfotericina B. | 14 |
| Figura 10 - Estrutura química da pentamidina..... | 14 |
| Figura 11 – Estrutura química da paromomicina..... | 15 |
| Figura 12 - Estrutura química da miltefosina..... | 15 |
| Figura 13 - Cronologia das descobertas ao nível da farmacoterapêutica da leishmaniose. | 16 |
| Figura 14 - Escala mostrando diferentes tamanhos de partículas. Geralmente considera-se a amarelo a escala para as nanopartículas. Adaptado de (44)..... | 19 |
| Figura 15 - Estrutura química na forma isetonato de pentamidina..... | 22 |
| Figura 16 - Estrutura química do Eudragit - Consoante as cadeias R1, R2, R3 e R4 variam as designações do polímero..... | 23 |
| Figura 17 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoesfera e uma nanocápsula. | 25 |
| Figura 18 - Representação esquemática do método de nanospray drying- Aparelho utilizado: Nano Spray Dryer B-90. Adaptado de (61)..... | 27 |
| Figura 19 - Princípio de funcionamento da cabeça de atomização do aparelho Nano Spray Dryer B-90. Adaptado de (61)..... | 28 |
| Figura 20 - Fotografias das amostras obtidas pelo método de preparação Nano spray drying. NPs com pentamidina (A) e sem pentamidina (B). | 28 |
| Figura 21 – Representação do funcionamento do método DLS..... | 30 |

| | |
|--|----|
| Figura 22 - Representação das curvas obtidas para dois lotes de nanopartículas de uma população monodispersa e polidispersa após análise por DLS. Adaptado de (45). | 31 |
| Figura 23 – Representação esquemática do efeito obtido pela luz incidente em diferentes tamanhos de partículas. | 33 |
| Figura 24 - Fotografia do aparelho LD com ligação informática ao software correspondente..... | 34 |
| Figura 25 – Representação do método de diálise | 38 |
| Figura 26 - Representação do sal MTT reduzido a formazan pela atividade das desidrogenases mitocondriais..... | 42 |
| Figura 27 – A) Reta de regressão linear obtida por espectrofotometria UV-Vis a 262 nm; B) Gráfico dos resíduos. | 44 |
| Figura 28 - Espectro de absorção da pentamidina, com o seu máximo a 262 nm..... | 45 |
| Figura 29 - Espectro de absorção do Eudragit, sem apresentar pico máximo de absorção entre os 200 e os 400 nm. | 46 |
| Figura 30 - Distribuições de tamanho de partícula: a) densidade volume vs classes de tamanho e b) tamanho vs tipo de partícula (parte inferior dos retângulos representa o Dv10, a linha no centro representa o Dv50 e no topo do retângulo representa o Dv90). | 47 |
| Figura 31 - Fotografia representativa do gobelé contendo o saco diálise de uma das três amostras, sobre o agitador magnético. | 48 |
| Figura 32 – Gráfico representativo dos resultados obtidos do ensaio de libertação da pentamidina. | 49 |
| Figura 33 - Gráfico representativo da curva dose resposta (IC50) para a pentamidina, nanopartículas contendo pentamidina – NPs(P), e nanopartículas vazias – NPs..... | 50 |
| Figura 34 - Atividade antiparasitária, representada sob a forma de curva dose resposta (IC50) para a pentamidina, miltefosina e nanopartículas contendo pentamidina e vazias. | 51 |
| Figura 35 - Gráfico representativo da curva dose resposta (IC50) para a pentamidina, nanopartículas contendo pentamidina – NPs(P), e nanopartículas vazias – NPs. | 52 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela I – Correspondência entre espécie de Leishmania, forma clínica, principal reservatório e espécie de vetor envolvido. | 3 |
| Tabela II - Principais fármacos para a terapêutica da leishmaniose e respetivos mecanismos de ação envolvidos. Adaptado de (26). | 12 |
| Tabela III – Exemplos de SLF desenvolvidos – Adaptado de (42). | 18 |
| Tabela IV - Representação do tamanho da partícula (nm), IP e PZ para duas amostras de NPs contendo pentamidina e uma amostra de NPs vazias. | 46 |
| Tabela V - IC50 médio dos ensaios para os fármacos pentamidina e miltefosina e NPs contendo pentamidina e vazias. | 51 |
| Tabela VI - Resultados para IC50, CC50 e IS da pentamidina livre e encapsulada. ... | 52 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças parasitárias provocadas por protozoários constituem uma dificuldade não resolvida para a saúde pública, especialmente em regiões tropicais (1). A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciada em termos de descoberta e desenvolvimento de novas terapêuticas e, em todo o mundo, o número de casos tem vindo a aumentar. No cerne desta questão estão, entre vários motivos, a falta de vacinas, as dificuldades no controlo de vetores responsáveis por esta parasitose, toxicidade dos tratamentos disponíveis e o crescente número de parasitas resistentes aos tratamentos atuais (2).

1.1 *Leishmaniose*

1.1.1 *Biologia do parasita, Leishmania*

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae. Esta infeção ocorre através da picada de insetos flebotomíneos infetados (Figura 1), seguida da transmissão do parasita (3).



Figura 1 – O inseto flebotomíneo vector da leishmaniose, mosca da areia.

Adaptado de (4).

Os parasitas de *Leishmania* são organismos dimórficos, ou seja, com duas formas morfológicas no seu ciclo de vida. Um estágio de desenvolvimento extracelular no inseto flebótomo fêmea e, um estágio de desenvolvimento em mamíferos, sendo este

principalmente intracelular (5). A figura 2 representa um esquema do ciclo de vida de *Leishmania*.

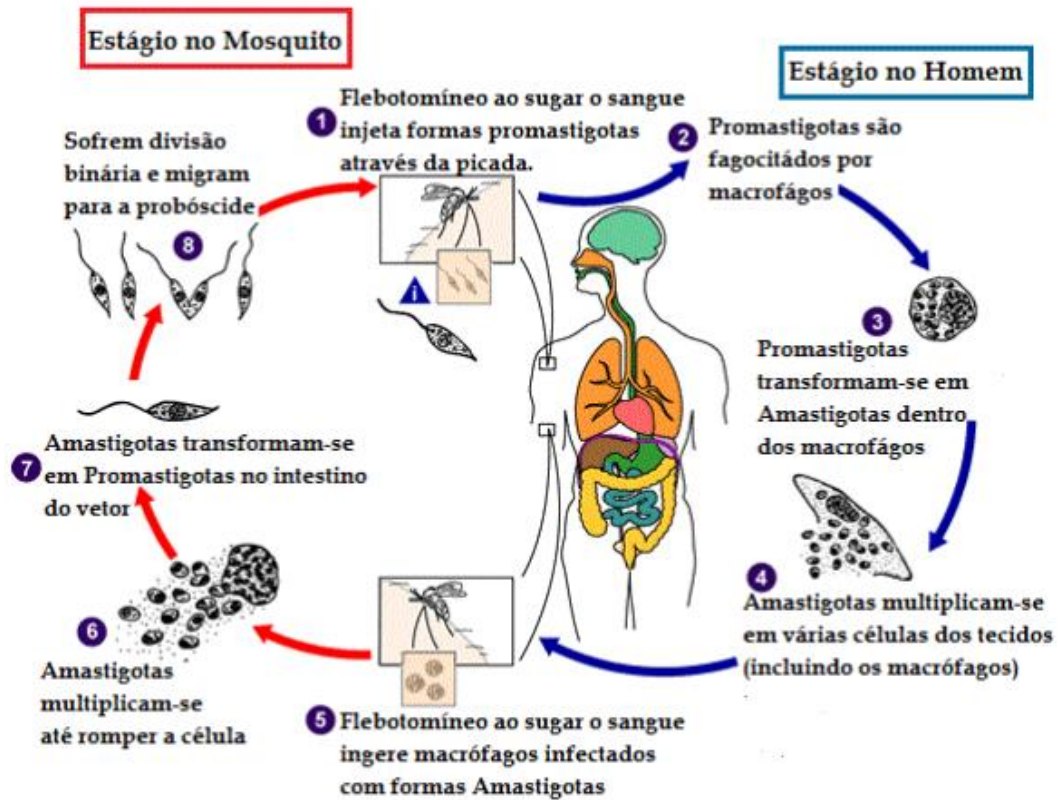


Figura 2 – Esquema representativo do ciclo de vida da *Leishmania*. Adaptado de (6).

Nos flebotomíneos, o desenvolvimento do parasita ocorre no canal alimentar com a formação de uma forma móvel, flagelada e alongada denominada "promastigota". O promastigota amadurece no intestino médio do inseto e origina uma forma promastigota metacíclica infecciosa. A inoculação no hospedeiro mamífero ocorre quando os flebótomos se alimentam de sangue, o que é um requisito para a oviposição. Em cada inoculação cerca de 100-1.000 formas promastigotas metacíclicas são transmitidas. Estas formas, rapidamente são fagocitadas por leucócitos, particularmente macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Já nas células do hospedeiro, os parasitas passam por uma nova transformação para originarem a forma amastigota (3). Após este episódio, o parasita replica-se, dando origem à ruptura da célula hospedeira (1, 3).

A leishmaniose é uma doença que afeta o Homem e os animais (domésticos e selvagens) em todo o mundo. A maioria dos ciclos de transmissão é zoonótica, envolvendo hospedeiros reservatórios como roedores, marsupiais, macacos, cães domésticos e canídeos silvestres. Na Europa, o cão doméstico é o único hospedeiro de grande

importância para a saúde pública. A infecção em gatos e cavalos também foi relatada em áreas onde a doença é comum em cães, mas o papel dessas espécies como reservatórios permanece incerto (7).

Tabela I – Correspondência entre espécie de Leishmania, forma clínica, principal reservatório e espécie de vetor envolvido.

| Espécie de Leishmania | Forma clínica | Principal reservatório | Espécie do vetor |
|------------------------------|----------------------|-------------------------------|--|
| <i>L. infantum chagasi</i> | LV | Cão, humano | <i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lutzomyia evansi</i> . |
| <i>L. infantum</i> | LV, LC | Cão | <i>Papatasi pernicious</i> , <i>Papatasi ariasi</i> , <i>Papatasi tobbi</i> , <i>Papatasi neglectus</i> . |
| <i>L. donovani</i> | LV | Humano | <i>Papatasi argentipes</i> , <i>Papatasi orientalis</i> , <i>Papatasi Martini</i> . |
| <i>L. tropica</i> | LC | Humano | <i>Papatasi sergenti</i> |
| <i>L. major</i> | LC | Roedores | <i>Papatasi papatasi</i> , <i>Papatasi duboscqi</i> , <i>Papatasi salehi</i> , <i>Papatasi bergeroti</i> . |
| <i>L. braziliensis</i> | LC, LM | Cão, humano, roedor | <i>Lutzomyia intermedia</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia .wellcomei</i> , <i>Lutzomyia ovallesi</i> |
| <i>L. amazonensis</i> | LC | Roedor | <i>Lutzomyia flaviscutellata</i> |
| <i>L. guyanensis</i> | LC, LM | Marsupial, roedor. | <i>Lutzomyia umbratilis</i> , <i>Lutzomyia anduzei</i> , <i>Lutzomyia whitmani</i> . |
| <i>L. mexicana</i> | LC | Marsupial, roedor. | <i>Lutzomyia olmeca</i> , <i>Lutzomyia shannoni</i> , <i>Lutzomyia diabólica</i> . |

1.1.2 Manifestações clínicas em humanos

A leishmaniose é uma doença complexa causada por parasitas protozoários transmitidos pela picada de insetos flebotômíneos, dos quais existem cerca de 500 espécies conhecidas, sendo apenas o mosquito fêmea responsável pela transmissão de

parasitas (8). Por outro lado, igualmente diversas espécies de parasitas do género *Leishmania* são responsáveis pela infeção resultante da picada do vetor e, este episódio pode originar três formas de leishmaniose de acordo com a localização dos parasitas em tecidos de mamíferos. São a leishmaniose visceral (LV), a cutânea (LC) e a mucosa (LM). Em todo o mundo, anualmente, cerca de 1,5 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e 500 mil novos casos de leishmaniose visceral são detetados (8, 9). Na tabela I é possível observar a correspondência entre algumas espécies de *Leishmania*, a principal manifestação clínica, reservatório envolvido e espécie de vetor responsável (10).

1.1.2.1 *Leishmaniose cutânea*

Esta é a manifestação mais comum da doença. Pode surgir apenas uma única lesão cutânea autorreparadora ou múltiplas lesões localizadas ou difusas, com demonstração a figura 3, que levam a um estado crónico da doença. O desfecho clínico depende principalmente das espécies dos parasitas envolvidas, mas também é influenciado pelas espécies do vetor e pela resistência inata ou adquirida do hospedeiro humano. Embora a maioria dos casos resulte em cicatrização espontânea nas quais as lesões cutâneas desapareçam em menos de um ano, cerca de 15% dos casos levam a recidivas e 2 a 40% dos casos de LC evoluem para a forma mucocutânea da doença. As espécies responsáveis por esta forma de leishmaniose são: *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. shawi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. Guyanensis*, *L. lainsoni* e *L. naiffi* (1).



Figura 3 - Lesão característica de leishmaniose cutânea. Adaptado de (11).

1.1.2.2 *Leishmaniose mucocutânea*

Esta forma da doença consiste numa progressão da forma cutânea e acontece quando a infeção atinge as regiões das mucosas. Pode afetar e destruir os tecidos das cavidades oronasal e faríngea e pode levar a mutilações faciais severas e dolorosas (figura 4). Esta forma pode ocorrer uma semana após o aparecimento da primeira lesão cutânea, mas pode também surgir após vários anos das manifestações cutâneas, demonstrando que os parasitas persistem nos tecidos por muito tempo. As espécies responsáveis por esta forma de leishmaniose são: *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*. Há também relatos de leishmaniose mucocutânea causada por *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* em indivíduos com doenças imunossupressoras (9).



Figura 4 - Lesão característica de leishmaniose mucocutânea. É possível verificar a destruição parcial da mucosa nasal. Adaptado de (11)

1.1.2.3 *Leishmaniose visceral*

É a forma mais grave e fatal da doença, compreendendo uma ampla gama de manifestações clínicas (figura 5). O parasita invade e multiplica-se nos órgãos do sistema fagocitário mononuclear como o baço, fígado e nódulos linfáticos, originando sintomas como febre prolongada e irregular, esplenomegalia, linfadenopatia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva, perda de peso e hipergamaglobulinemia com hipoalbuminemia. Em muitos casos, pode também acontecer que infeção não tem um curso agudo ou crónico, permanecendo assintomática ou subclínica e, em certos casos, pode até ocorrer um cenário de autocura. As espécies responsáveis por esta forma de leishmaniose são *L. donovani* e *L. infantum* (1, 9).



Figura 5 - Lesão característica de leishmaniose visceral. É possível observar-se a esplenomegalia e pancitopenia. Adaptado de (11).

1.1.3 Manifestações clínica nos cães

Nos cães, o período de incubação, isto é, desde a infecção até ao surgimento dos primeiros sintomas, pode ser entre um mês a vários anos. Embora nem todos os cães infetados apresentem sinais clínicos óbvios, são reservatórios de infecção e podem transmitir o parasita através do vetor para humanos e outros mamíferos (12).

A leishmaniose canina (LCA) é uma doença crônica e sistêmica com amplo espectro de manifestações clínicas inespecíficas causadas por *L. infantum* em cães domésticos. As manifestações mais frequentes são lesões cutâneas, no entanto, os animais podem apresentar outros sinais clínicos como doença renal ou qualquer outro sintoma característico da LV humana (13).

Uma vez que a infecção pelo parasita da leishmaniose nem sempre está relacionada com doença clínica, há uma alta prevalência de animais infetados subclínicos e assintomáticos nas regiões endêmicas. Para além deste facto, os cães domésticos compartilham o mesmo habitat e, frequentemente, estão em contato com humanos, sendo por isso o cão o reservatório mais importante para a *L. infantum*. Outras espécies de *Leishmania* também foram relacionadas com a infecção em cães: *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* (13, 14).

1.1.4 Aspectos imunológicos

Após a transmissão de parasitas de *Leishmania* por flebotomíneos, a manifestação da infecção requer mecanismos que permitem aos parasitas replicarem-se no hospedeiro mamífero e resistir (15).

A distribuição dos parasitas e as manifestações clínicas da infecção variam amplamente de acordo com as espécies de parasitas e a resposta imune subjacente do hospedeiro. No entanto, uma característica comum à infecção de mamíferos com todas as espécies de parasitas é que a infecção ocorre intracelular e os parasitas apenas são expostos de modo muito breve ao ambiente extracelular no momento da inoculação. Isto tem importantes implicações para a imunidade do hospedeiro e no desenvolvimento de potenciais candidatos terapêuticos. Os parasitas de *Leishmania* possuem uma variedade de mecanismos de virulência que permitem à fase amastigota sobreviver no ambiente hostil do fagolisossoma. A saliva da mosca da areia é um exemplo de um fator de virulência pois permite aumentar a invasão de macrófagos pelos promastigotas, o que leva ao surgimento da doença com inoculações de menores quantidades de parasitas (3).

Outros mecanismos de resposta imune estão relacionados com a captura de parasitas pelas células apresentadoras de antígenos (DCs), posteriormente apresentados às células T (Th0) em associação com moléculas MHC de classe I e II no recetor de células T (TCR). Este episódio permite a diferenciação de células T e a produção de citocinas, dando origem a quatro principais resultados (3):

- Diferenciação de Th2 com produção de IL-4 e incapacidade de erradicar parasitas e um fenótipo suscetível;
- Diferenciação de Th1 com a produção de IFN- γ e IL-2, levando a níveis elevados de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) e morte intracelular de parasitas;
- Estimulação de células T reguladoras específicas do antígeno (Tr1) produzindo IL-10 e, possivelmente, inibindo preferencialmente as respostas Th1 ou o desenvolvimento de células T de memória;
- As células T reguladoras (Treg) também podem desempenhar um papel no equilíbrio geral das respostas de Th1: Th2 (3).

1.1.5 *Epidemiologia e distribuição geográfica*

A leishmaniose é relatada em 88 países e estima-se que 350 milhões de pessoas da população mundial corre o risco de adquirir a doença. Em 2017, cerca de 12 milhões de pessoas contraíram a infecção, sendo a taxa de ocorrência anual de cerca de 1,5 a 2 milhões de pessoas (16).

Esta doença ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais e está presente em todos os continentes, exceto na Antártida. São consideradas regiões endêmicas para esta infecção a América do Sul e Central, o Norte e Leste de África, o Médio Oriente, o

subcontinente indiano, a Ásia Central e Oriental e o sul da Europa, reunindo um total de 88 países. Mais de 90% de todos os casos de Leishmaniose Visceral (figura 6) ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A prevalência de Leishmaniose Cutânea (figura 7) é mais disseminada, sendo a ocorrência de cerca de 70 a 75% do total de casos da leishmaniose e afetando principalmente dez países do mundo: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irão, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (14).

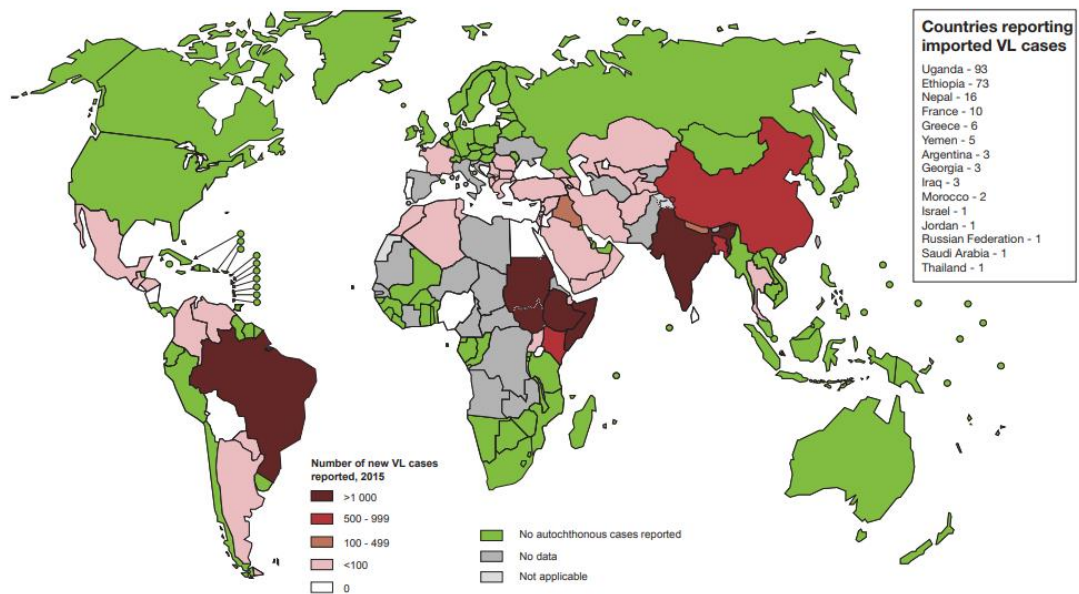


Figura 6 – Mapa representativo dos países onde a leishmaniose visceral é uma infecção endêmica. Casos reportados em 2015. Adaptado de (17).

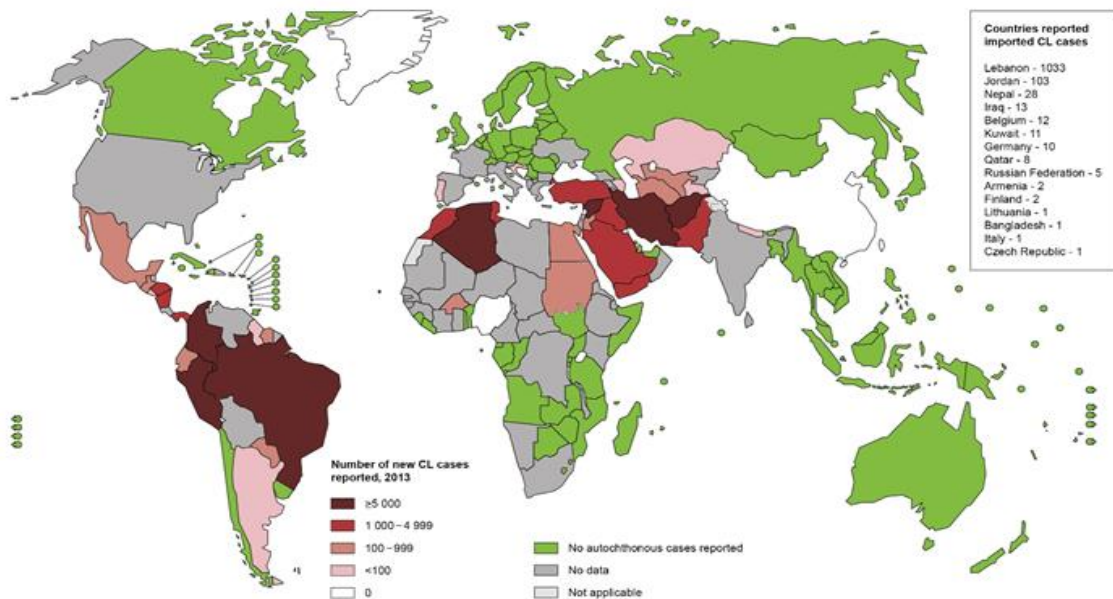


Figura 7 - Mapa representativo dos países onde a leishmaniose cutânea é uma infecção endêmica. Casos reportados em 2015. Adaptado de (17).

A leishmaniose emergiu como uma das principais infecções oportunistas que afetam indivíduos infetados pelo VIH, sendo a forma visceral a que mais contribui para esta coinfeção. Segundo a OMS, até agora 35 países em todo o mundo relataram casos de coinfeção por *Leishmania* / VIH. Contudo, importa ressaltar que a taxa real de incidência é cerca 4 a 5 vezes maior do que a prevalência relatada (5, 14, 16).

Nos países na zona Mediterrânea, o cão é considerado o principal hospedeiro para o parasita *Leishmania*, em particular para a espécie *Leishmania infantum*. É, de facto, o principal reservatório para a infeção visceral humana e, estudos de seroprevalência em Portugal, Espanha, França e Itália estimaram que cerca de 2,5 milhões de cães foram infetados nos últimos anos (18).

As mudanças climáticas globais estão associadas a uma maior densidade e atividade de flebotomos durante um maior período de dias considerados favoráveis à transmissão de parasitas a humanos e animais. São por isso, consideradas responsáveis pelo aumento da incidência desta doença. Contudo, apesar de haver já essa noção, da associação entre a mudança climática global e a disseminação de vetores e outros agentes infecciosos na Europa, esta continua a ser uma doença negligenciada (13).

1.1.6 *Prevenção*

A OMS designou a leishmaniose como uma doença da categoria 1 (emergente e não controlada) com prevenção focada no controlo de vetores, de reservatórios de animais e na pesquisa de possíveis vacinas (3).

As medidas preventivas baseiam-se principalmente no uso de produtos registados como coleiras para uso veterinário, contendo piretroides sintéticos, permetrina ou deltametrina com um efeito repelente contra moscas da areia. Outras medidas úteis na prevenção de picadas de vetores incluem manter o cão dentro de casa durante a temporada de flebotomíneos do anoitecer ao amanhecer; reduzindo micro-habitats favoráveis a moscas da areia, como pilhas de madeira e pedras nas proximidades da casa e em outros locais onde os cães passam tempo; uso de tratamento inseticida em ambientes fechados (19).

Apenas vacinas contra a leishmaniose canina estão disponíveis. Atualmente, a vacinação parece ser a maneira mais eficaz e promissora de prevenir a leishmaniose canina (19).

As principais vacinas disponíveis são a Canileish[®], Letifend[®] e Leisguard[®]. A primeira, comercializada em Portugal desde 2011, contém proteínas excretadas de *L. infantum* associadas a um adjuvante, uma fração altamente purificada de *Quillaja saponaria* que demonstrou melhorar a resposta imunológica. Os Extratos de *Quillaja saponaria*, a árvore de sabão chilena, contém várias saponinas triterpênicas fisiologicamente ativas que exibem forte atividade adjuvante quando usadas em vacinas humanas ou para animais (20, 21). A segunda vacina que foi a mais recente introdução no mercado utiliza uma tecnologia de ADN recombinante (22). Por último, a Leisguard[®] é uma suspensão contendo domperidona que demonstrou ser eficaz na estimulação da resposta imunológica (23).

1.1.7 *Farmacoterapêutica, contexto atual.*

As doenças parasitárias são de enorme significado global, pois cerca de 30% da população mundial sofre de infeções parasitárias. Além disso, as infeções parasitárias impõem uma carga substancial de mortalidade e morbidade em todo o mundo e, em particular nos países em desenvolvimento (16).

Embora avanços consideráveis tenham sido feitos na compreensão da biologia celular, farmacogenómica, etiologia e fisiopatologia da maioria das infeções parasitárias, na última década, o cenário na área da terapêutica é dececionante. Apesar dos grandes

esforços, até o momento, não existe uma vacina eficaz contra as principais infecções parasitárias. Deste modo, a quimioterapia antiparasitária continua a ser a única arma para combater infecções parasitárias. No entanto, a maioria dos agentes antiparasitários atualmente existentes foram introduzidos há mais de 50 anos. Embora esses agentes sejam eficazes, a maioria deles não está muito próximo do desejável em termos de toxicidade, tolerabilidade, regime terapêutico, duração do tratamento, especificidade e adesão à terapêutica. O problema da resistência emergente a agentes antiparasitários anteriormente eficazes na última década agravou o cenário. Paradoxalmente, a taxa de desenvolvimento e investigação para novas terapêuticas no segmento de doenças parasitárias é muito baixa em comparação com os outros segmentos, principalmente devido à falta de incentivos económicos nessa área. De facto, cerca de 1223 novos medicamentos comercializados entre 1975 e 1996, apenas 1% compreendia medicamentos introduzidos para o tratamento de doenças tropicais (16). A negligência em relação às doenças parasitárias continuou até aos dias atuais, uma vez que apenas cerca de 0,1% do investimento global em pesquisa na saúde foi dedicado à descoberta de medicamentos para agentes antiparasitários (24).

No que diz respeito à farmacoterapêutica da leishmaniose, nas últimas décadas, o desenvolvimento de novos fármacos ou novas formulações foi muito baixo, assim sendo, até agora, nenhuma das terapêuticas existentes é ideal para tratamento devido à elevada toxicidade dos fármacos disponíveis, problemas relacionados com resistência às terapêuticas, preços proibitivos, longa duração do tratamento e vias de administração não adaptadas e adequadas às necessidades (25).

As combinações de medicamentos demonstraram resultados positivos e podem ser uma solução a curto prazo para retardar ou prevenir o surgimento de resistência, aumentar a eficácia ou encurtar o curso do tratamento (25).

Atualmente, a maioria dos medicamentos contra a *Leishmania* podem ser considerados órfãos. De fato, a leishmaniose é um exemplo de doença tropical negligenciada (TND – *tropical neglected diseases*), pois recebe pouca atenção dos governos e da indústria farmacêutica (2).

Na tabela II está representada uma lista dos principais medicamentos utilizados, nos dias de hoje, para o tratamento da leishmaniose e, as hipóteses para os respetivos mecanismos de ação.

Tabela II - Principais fármacos para a terapêutica da leishmaniose e respetivos mecanismos de ação envolvidos. Adaptado de (26).

| Compostos | Mecanismo de ação |
|---------------------------------|---|
| Antimónios pentavalentes | Ligam-se a diferentes proteínas do parasita, inibindo-as especialmente, enzimas envolvidas na glicólise e no metabolismo dos ácidos gordos. |
| Pentamidina | Liga-se ao ADN cinetoplastial |
| Anfotericina B | Liga-se à membrana plasmática aumentando a sua permeabilidade |
| Paramomicina | Inibe a síntese proteica e afeta o funcionamento mitocondrial do parasita |
| Miltefosina | Inibe ou modela a transdução de sinal e homeostasia do cálcio |

1.1.7.1 Antimónios pentavalentes

Estes fármacos, Pentostam[®] e Glucantime[®] (figura 8), foram desenvolvidas em 1945 e continuam a ser o tratamento de primeira escolha para a leishmaniose visceral e cutânea na maior parte do mundo. Desde há muitos anos, os antimónios pentavalentes - antimoniato de meglumina (Glucantime[®], Sanofi-Aventis) e estibogluconato de sódio (Pentostan[®], GlaxoSmithKline) têm sido os fármacos recomendados para LV e LC (2).

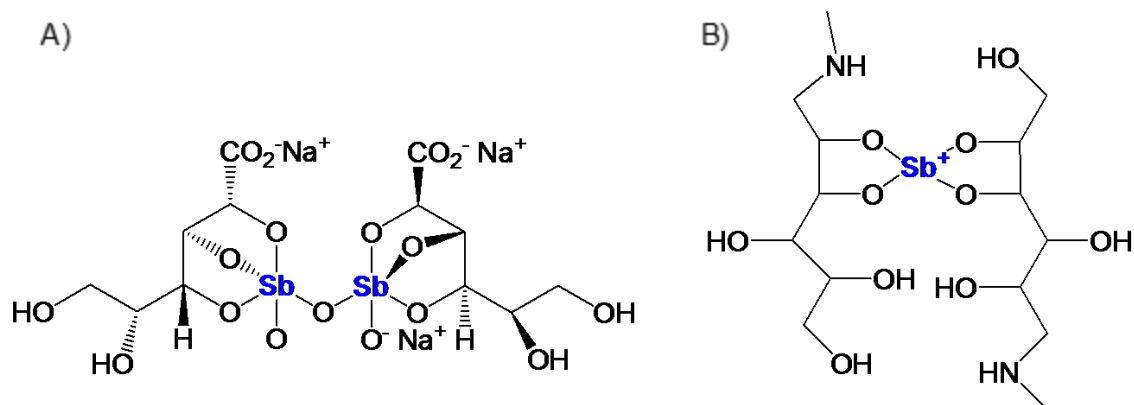


Figura 8 - Estrutura química do estibogluconato de sódio - Pentostam[®] (A) e do antimoniato de meglumina -Glucantime[®] (B).

Estes compostos foram fármacos de primeira linha para tratamento da leishmaniose por mais de 70 anos na maioria dos países onde esta é endêmica. A terapêutica associada a estes fármacos é demorada, potencialmente tóxica e dolorosa. Os efeitos adversos mais comuns incluem problemas cardiovasculares, frequentemente associados a arritmias cardíacas fatais. Artralgia e mialgia, elevação das enzimas hepáticas e pancreatite são outros eventos adversos bastantes comuns (27, 28).

Ao longo dos anos, o tratamento com antimônios pentavalentes tornou-se ineficaz à medida que foram surgindo casos de resistência. Mesmo assim, estes compostos continuam a ser eficazes em alguns países do Sudeste Asiático e América do Sul, e atualmente a OMS recomenda uma combinação de antimônio pentavalente e paromomicina (um outro fármaco que será referido mais à frente) como opções de terapia de primeira linha (27).

Atualmente, existem esforços para reduzir a toxicidade e melhorar a distribuição destes fármacos nos tecidos. Deste modo, novos desenvolvimentos incluem formulações baseadas em lipossomas para o tratamento da LV. Apesar dos bons resultados a nível de eficácia terapêutica, a toxicidade continua a ser um problema (29).

1.1.7.2 Anfotericina B

É um antifúngico sistêmico (figura 9) e eficaz contra os parasitas da *Leishmania*. Devido à crescente resistência aos antimônios, é atualmente utilizado como um medicamento alternativo para a LV, mas também de primeira linha em muitos países e no norte de África (30). Formulações lipídicas de anfotericina B foram desenvolvidas com o objetivo de melhorar a sua biodisponibilidade e propriedades farmacocinéticas, reduzindo consideravelmente os seus efeitos adversos. Foi demonstrado que as maiores partículas lipídicas eram rapidamente assimiladas pelo sistema mononuclear fagocitário e, por outro lado, os lipossomas menores permaneciam na corrente sanguínea por mais tempo do que o fármaco na forma livre. A formulação lipossômica (AmBisome[®], Gilead Sciences) é considerado um tratamento para a LV com menor toxicidade e alto nível de eficácia. Apesar disso, as principais limitações são o seu elevado custo, a via de administração e falta de estabilidade em elevadas temperaturas, o que torna este medicamento inadequado principalmente em países em desenvolvimento (25, 31, 32).

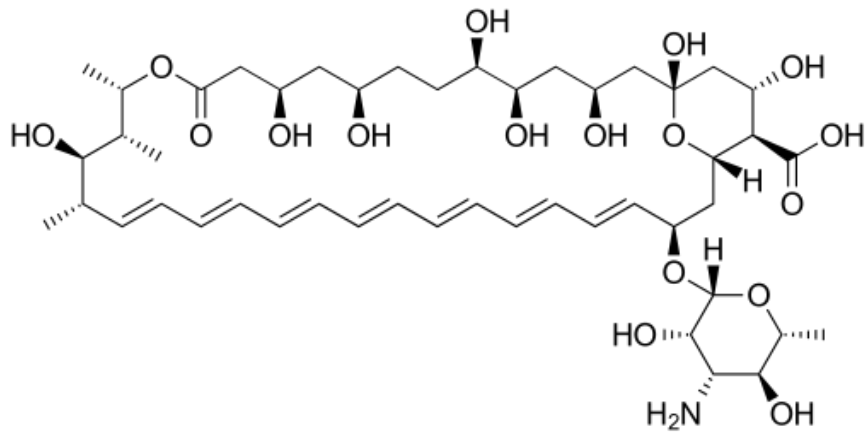


Figura 9 - Estrutura química da anfotericina B.

1.1.7.3 Pentamidina

A pentamidina (Pentacarinat[®], Sanofi-Aventis) (figura 10) é uma diamina aromática, e tem sido utilizado também como fármaco de segunda linha em tratamento de LV resistente aos antimónios. Devido à sua elevada toxicidade e de certa forma diminuição de eficácia no tratamento da LV devido a casos de resistência, este fármaco foi praticamente extinto na Índia. No entanto, esta molécula ainda é valiosa especialmente usada para terapias combinadas (19, 22).

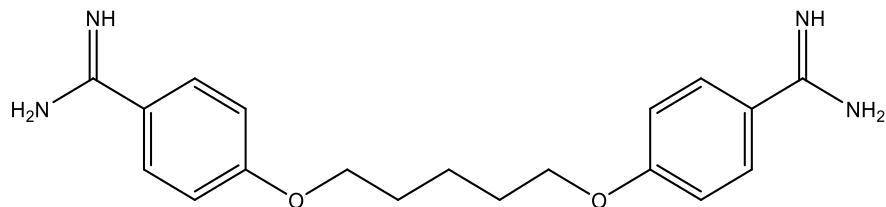


Figura 10 - Estrutura química da pentamidina.

1.1.7.4 Paromomicina

Este fármaco é um antibiótico aminoglicosídeo com atividade anti-*Leishmania* (figura 11). É utilizado essencialmente como aplicação tópica para LC e também para administração IV no tratamento da LV. Atualmente não tem patente e foi considerado um medicamento órfão (25).

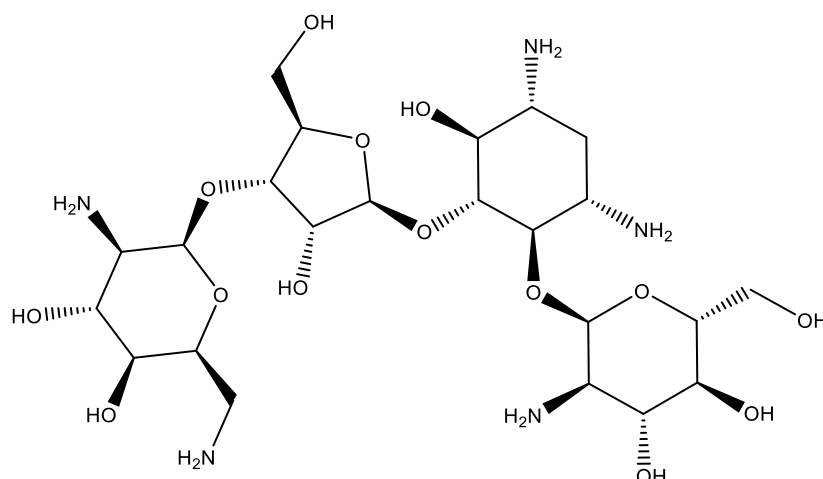


Figura 11 – Estrutura química da paromomicina.

1.1.7.5 Miltefosina

Também conhecida como hexadecilfosfolina (figura 12), foi descoberto simultaneamente como um fármaco com atividade anticancerígena e contra parasitas da *Leishmania*. É utilizado atualmente como a única formulação oral no tratamento oral efetivo contra LV e LC. Na Europa, este fármaco apenas está disponível como medicamento para uso veterinário (Milteforan[®], Virbac) (19, 21).

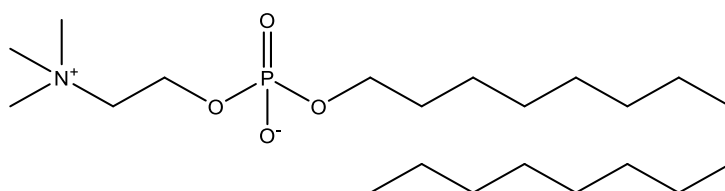


Figura 12 - Estrutura química da miltefosina.

1.1.7.6 Outros fármacos

Além dos fármacos mencionados, são poucos os outros compostos que também demonstraram a eficácia contra a *Leishmania*. O alopurinol é um exemplo de um fármaco de segunda linha utilizado no tratamento da leishmaniose devido à falta de resposta ou mesmo à resistência de outros considerados de primeira linha. A sua atividade foi relatada pela primeira vez em 1974 e é administrado por via oral, isoladamente ou em combinação com outros fármacos. É utilizado principalmente no tratamento de leishmaniose canina, de forma prolongada ou até mais frequentemente durante toda a vida do animal (33).

Administrado por via oral também os fármacos cetoconazol, itraconazol e fluconazol têm sido considerados nos tratamentos da leishmaniose mas, nenhuma é tão eficaz quanto os antimônios pentavalentes. No entanto, dado o reduzido perfil de efeito adversos, estes compostos podem ser úteis no tratamento da LC que não progride para a forma mucosa e tende a ser autocurada (34). O imiquimod também é usado no tratamento da leishmaniose em combinação com os antimônios, nos casos de resistência ou infecções muito graves (34). A dapsona é outro fármaco que demonstrou ser eficaz na maioria dos casos de leishmaniose cutânea indiana após 6 semanas de tratamento (34).

A figura 13 representa as descobertas de fármacos contra a leishmaniose, de forma cronológica, indicando o ritmo lento a que estas têm ocorrido. Apenas uma nova classe de fármacos para administração oral foi descoberta nos últimos vinte anos, mas também essa tem demonstrado uma certa resistência em alguns casos (35).



Figura 13 - Cronologia das descobertas ao nível da farmacoterapêutica da leishmaniose.

1.1.8 Farmacoterapêutica, contexto futuro

No que diz respeito aos fármacos utilizados atualmente, nenhum conjuga elevada eficácia, baixa toxicidade e custo acessível. Por isso, ainda é uma prioridade o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos para o tratamento da leishmaniose. A pesquisa atual sobre novas terapêuticas é especialmente focada em compostos já existentes, tentando encontrar novas formulações que permitam obter melhores resultados, também compostos usados para o tratamento de outras doenças, mas que podem ser benéficos contra os parasitas da *Leishmania*, e ainda compostos fitoterapêuticos (38).

1.1.8.1 Fármacos sob investigação

O fármaco anti-tripanososoma fexinidazol demonstrou potencial para o tratamento da LV (36). Este medicamento, deixado de lado nos anos 80, foi recuperado há uma década e também está a ser alvo de testes contra outras doenças parasitárias. Para além deste, o

composto nitroimidazo-oxazol DNDI-VL-2098 com ação antituberculosa, mostrou ser um candidato a fármaco pré-clínico, eficaz por via oral, no tratamento da LV (37), e o enantiômero R do fármaco antitubercular PA-824, igualmente com potencial para o tratamento oral para LV (38).

Neste momento, o principal foco de preocupação relacionado com as descobertas de fármacos contra a leishmaniose reside no aumento gradual da resistência (22).

1.1.8.2 Fitoterapia

A pesquisa farmacêutica em produtos naturais representa uma importante estratégia para descobrir e desenvolver novos medicamentos. O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças parasitárias é documentado desde a antiguidade (29).

Sen e Chatterjee (2011) estabeleceram o mecanismo de ação de vários compostos derivados de plantas (39, 40)

- chalconas – atuam sobre as mitocôndrias dos parasitas, resultando na inibição da cadeia respiratória;
- flavonóides - inibem a síntese de ADN do parasita e induzem a produção de ROS desencadeando apoptose;
- saponinas – reagem sobre as membranas celulares dos parasitas da *Leishmania*, levando à perda de integridade da membrana;
- quinonas – geram um aumento de radicais livres no parasita induzindo a morte celular;
- alcalóides - interferem na biossíntese macromolecular e inibem a respiração de amastigotas. Levam à produção de enzimas reguladoras para a apoptose e inflamação, induzindo a morte celular apoptótica mediada por radicais livres e produção de NO;
- linhanos – interferem no ciclo celular e impedem a ligação do parasita aos macrófagos e sua posterior entrada;
- taninos - aumentam a produção de NO em macrófagos infectados e aumentam a expressão de citocinas, incluindo IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ ;
- terpenóides - aumentam a produção de NO, induzem a apoptose via inibição da topoisomerase do ADN do parasita e inibem o crescimento parasitário;

- oxilipinas - inibem a super-oxidase dismutase, levando ao aumento da produção de EROs e à morte do parasita. Levam também ao aumento da produção de NO e TNF- α dentro dos macrófagos.

De facto, os fitocompostos bioativos presentes nas plantas, incluindo os extratos brutos, óleos essenciais e outros compostos úteis, podem ser uma boa fonte para descobrir e produzir novos medicamentos para o tratamento da leishmaniose (41).

1.1.8.3 Novos sistemas de libertação de fármacos

Outras estratégias estão relacionadas com o desenvolvimento de novos sistemas de libertação de fármacos (SLF), incluindo lipossomas, nanopartículas, nanotubos de carbono e microesferas, entre outros (tabela III). O facto de serem naturalmente absorvidos por macrófagos através da fagocitose, permite direccionar os fármacos passivamente ao local alvo. Desta forma, é possível também que ocorra uma diminuição da toxicidade dos fármacos através do desenvolvimento de um sistema ideal de libertação dos fármacos. Por outro lado, os nanossistemas não constituem apenas uma nova plataforma que atua como adjuvante, mas também um mecanismo combinado de um sistema de transporte de antigénios para promover uma resposta imunológica, e um sistema de transporte de fármacos direccionados para o alvo terapêutico (42).

Tabela III – Exemplos de SLF desenvolvidos – Adaptado de (43).

| <u>Nanossistemas</u> | <u>Fármaco</u> | <u>Características</u> |
|-----------------------------------|--------------------------|--|
| Niossomas | Anfotericina | Ciclodextrinas |
| | Antimónios pentavalentes | Dextrano |
| Nanoesferas | Piperina | Nanosferas lipídicas baseadas em emulsão O/A |
| Nanopartículas poliméricas | Anfotericina | Conjugação com goma arábica |
| | Anfotericina | Microsferas de albumina |
| | Pentamidina | Conjugação com polimetacrilato |
| | Metoxichalconas | Conjugação com polimetacrilato |
| | Triterpenos | Microemulsão |

Atualmente o único medicamento baseado na estratégia “nano” é a anfotericina lipossómica B. No entanto, várias pesquisas foram feitas nos últimos anos no sentido de encontrar alternativas terapêuticas. A tabela II sumariza algumas das muitas investigações realizadas neste âmbito.

1.2 Avanços da nanotecnologia nas doenças parasitárias

O desenvolvimento de SLF no contexto da nanomedicina deve ser visto como uma estratégia complexa à escala nanométrica (10 –1000 nm) (figura 14), que consiste, fundamentalmente na investigação em torno de um composto, dotado de atividade terapêutica ou de prevenção ou diagnóstico de uma doença, e do seu transportador. Os principais objetivos da pesquisa incluem: entrega ao local alvo, redução da toxicidade e maior segurança e biocompatibilidade. As principais questões na busca de transportadores apropriados relacionam-se com a incorporação e libertação dos fármacos, estabilidade da formulação, biocompatibilidade, biodistribuição e eficácia (44).

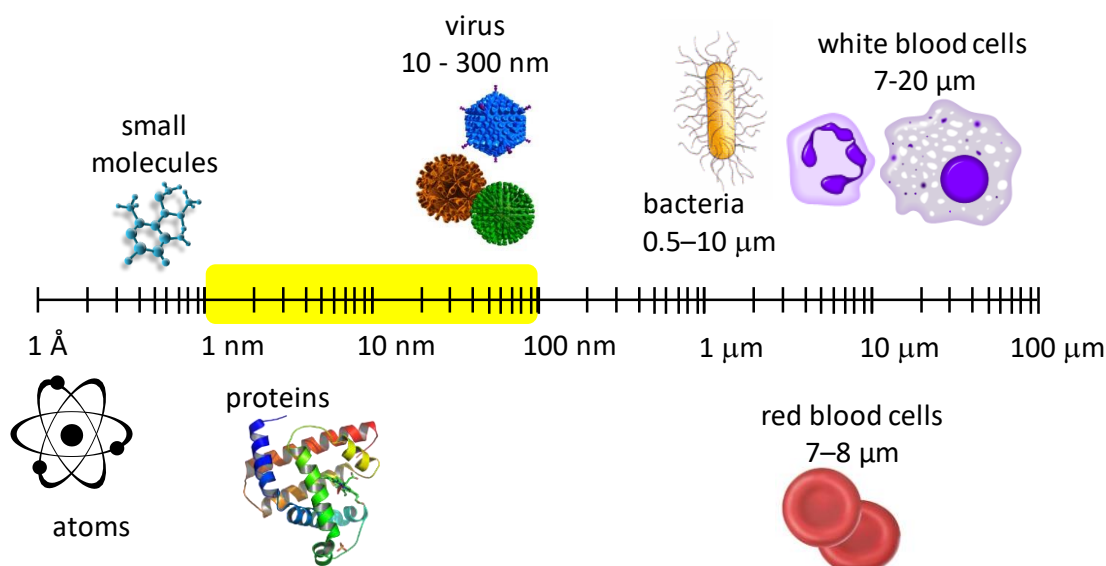


Figura 14 - Escala mostrando diferentes tamanhos de partículas. Geralmente considera-se a amarelo a escala para as nanopartículas. Adaptado de (45).

O tamanho das partículas é um dos aspetos mais importantes para a sua utilização na terapêutica. Partículas com um tamanho entre os 100 e 500 nm têm sido reportadas como as NPs com maior potencial para a terapêutica, uma vez que permanecem mais tempo na circulação sanguínea. As partículas com tamanho inferior a 100 nm são rapidamente eliminadas pela excreção renal e as partículas com mais de 500 nm são rapidamente fagocitadas pelas células do sistema fagocitário mononuclear (46).

Um dos principais objetivos da nanotecnologia no contexto das doenças parasitárias é direcionar especificamente o fármaco para o respetivo agente patogénico enquanto minimiza os efeitos adversos para o hospedeiro. Esta situação é mais complicada quando os agentes patogénicos persistem na forma intracelular como é o caso da *Leishmania*. No

desenvolvimento de estratégias terapêuticas, vários aspetos biofarmacêuticos e fisiopatológicos devem ser considerados. Primeiro, devem ser consideradas as propriedades físico-químicas do fármaco, no contexto da farmacocinética, considerar a ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de forma a determinar a sua via de administração. Seguidamente deve ser analisada a dose terapêutica que, obviamente deverá ser a suficiente para erradicar o parasita. Posteriormente os mecanismos de penetração das membranas celulares também deverá ser estudado. Depois deverá ser importante conhecer a localização do agente patogénico no interior celular, as condições do meio que o rodeiam e por último a sensibilidade do agente patogénico ao fármaco e possível resistência (32).

2 OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho foi a preparação de nanopartículas poliméricas contendo pentamidina.

A propagação de doenças infecciosas transmitidas por vetores em todo o mundo é um problema de Saúde Pública emergente. A leishmaniose é endêmica na bacia do mediterrâneo e, uma vez que as terapias atuais, em particular contra a LV, a forma mais grave da doença, têm vários inconvenientes, é de grande importância desenvolver tratamentos alternativos. Uma das estratégias possíveis baseia-se na nanotecnologia, e permite substituir ou complementar os tratamentos já disponíveis.

No presente trabalho, a pentamidina foi o fármaco selecionado em virtude das suas características biológicas e químicas. Além de atividade antiparasitária, possui uma ampla gama de propriedades terapêuticas incluindo atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e anticancerígenas (35). A pentamidina é utilizada há mais de 50 anos na terapia e profilaxia da tripanossomíase africana, também conhecida como doença do sono, e pneumonia por *Pneumocystis carinii* em doentes com SIDA, bem como na leishmaniose resistente aos antimônios. Contudo o seu uso clínico é limitado devido à sua toxicidade, administração por via I.V ou I.M, e desenvolvimento de resistência (35, 47).

As nanopartículas de poli (ácido D, L-láctido) e polimetacrilato contendo pentamidina foram previamente estudadas contra *Leishmania* (*L. infantum* e *L. major*). Estes estudos demonstraram que as NPs contendo o fármaco foram 3,3 e 6,0 vezes, respetivamente, mais eficazes que a pentamidina na forma livre (48-50). Para além disso, também demonstraram serem bem toleradas (50). De facto, as nanopartículas têm a capacidade de serem absorvidas pelas células mononucleares do sistema fagocitário, tornando-as transportadores ideais para o transporte seletivo de fármacos para os tecidos-alvo em doenças como a leishmaniose em que estão envolvidas as células fagocitárias (48).

Com base nestas considerações, concentrou-se o interesse em formular e caracterizar nanopartículas poliméricas de polimetacrilato contendo pentamidina (48).

O método de preparação das nanopartículas deve ter em consideração a solubilidade do fármaco em causa (43). Neste sentido, tendo em consideração que o sal utilizado de pentamidina é muito solúvel em água (51), o nano *spray drying* (SD) foi o método escolhido uma vez que se adequa a substâncias ativas hidrófilas (52).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Materials*

3.1.1 *Pentamidina*

O fármaco utilizado neste trabalho foi a pentamidina na forma de isetionato de pentamidina adquirido à firma Sigma-Aldrich® (Lote 117K3731V). Este composto (figura 15) é obtido pela reação de pentamidina com dois equivalentes de ácido 2-hidroxietilsulfônico.

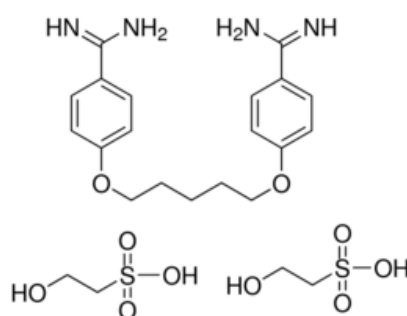


Figura 15 - Estrutura química na forma isetionato de pentamidina.

Esta molécula apresenta como características físicas a fórmula molecular C₂₃H₃₆N₄O₁₀S₂ e peso molecular de 592,68 Da. A pentamidina apresenta-se de acordo com as suas características físicas, sólida, sob a forma de cristais brancos amarelados e com odor característico.

É uma diamidina aromática, grupo de compostos orgânicos que se caracterizam por possuírem uma cadeia alceno central inerte unida através de ligação éter ao grupo terminal amidino polar, sendo assim molécula polar e, portanto, muito solúvel em água, superior a 30 mg/mL (51, 53). Relativamente ao seu mecanismo de ação, estudos indicam que o fármaco interfere no metabolismo nuclear, produzindo inibição da síntese de ADN, ARN, fosfolípidios e proteínas. Para tratamento da LV a dose recomendada é 4 mg/kg/dia, administrada três vezes por semana, num total de 15 a 20 doses (I.M ou I.V) (28, 53). Esta molécula apresenta baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral, sendo, no entanto o isetionato de pentamidina bem absorvido após administração parenteral (53).

3.1.2 Eudragit

Para a preparação de nanopartículas poliméricas, utilizou-se a dispersão aquosa de Eudragit RS 30 D – Lote G140118506, (Evonik Industries, Alemanha). O polímero é apresentado como uma dispersão aquosa na concentração de 30%, o seu aspeto é líquido branco leitoso e de baixa viscosidade com um odor fraco.

O Eudragit (figura 16) foi comercializado pela primeira vez na década de 1950 e é obtido através da polimerização de ácidos acrílicos e metacrílicos ou seus ésteres, com grau variável de solubilidade que o torna adequado para formulações de libertação modificada (54, 55).

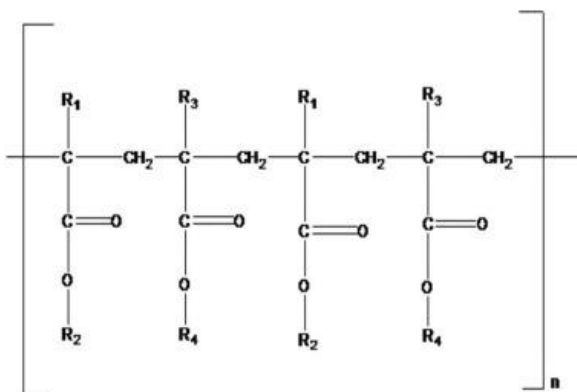


Figura 16 - Estrutura química do Eudragit - Consoante as cadeias R1, R2, R3 e R4 variam as designações do polímero.

De um modo geral, os polímeros de Eudragit podem ser classificados com base no seu uso ou tipo de formulação produzida. Estes incluem polímeros para (55, 56):

- Libertação modificada – prolongada ou retardada,
- Gastro-resistência ou absorção gastrointestinal,
- Proteção da formulação contra humidade e odor ou também mascaramento de sabor.

O Eudragit escolhido para a formulação deste trabalho, Eudragit RS 30D, diz respeito a um copolímero metacrilato de amónio.

O interesse de pesquisa na área da nanotecnologia sofreu um enorme crescimento nos últimos anos. Neste sentido, também uma diversidade de polímeros tem vindo a ser utilizada no desenvolvimento de NPs baseadas em polímeros, que apresentam várias vantagens, pois possuem elevada capacidade de nanodispersão permitindo um menor

tamanho das partícula, carga superficial positiva, força bio adesiva moderada, excelente estabilidade e não produzem efeito irritante nas superfícies das mucosas (57).

A água utilizada durante este projeto foi água purificada pelo Sistema de Purificação de Água Direct-Q® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), e foi obtida por um processo de osmose reversa.

3.1.3 *Parasitas e cultura celular*

3.1.3.1 *Parasitas*

Uma linha clonada de promastigotas de *Leishmania infantum* (MOM/MA671TMAP263), expressando o gene luciferase (LUC), foi mantida em cultura em meio RPMI 1640 suplementada com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS), 1% de L-glutamina, 2.2% HEPES 1M, 100 U / mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina (todos da BioWhittaker, Verviers, Bélgica) a 28 °C.

3.1.3.2 *Linha celular monocítica de leucemia humana (células THP-1)*

A linhagem celular de leucemia mononuclear humana THP-1 foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 pg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas em cultura a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ por sub-passagem a cada 4 dias. As células foram contadas num hemocítmetro (Marienfeld, Alemanha) na presença de azul de tripano para excluir células não viáveis. Células humanas THP-1 (10⁵ células/mL) foram diferenciadas na presença de 20 ng/mL de acetato de tetradecanoilforbol (PMA) (Sigma Aldrich, Sintra, Portugal) por 18h a 37 °C e foram deixadas por mais 24 h com meio fresco sem PMA.

3.2 **Métodos**

3.2.1 *Preparação das nanopartículas poliméricas de pentamidina*

As nanopartículas poliméricas são SLF que apresentam geralmente diâmetro inferior a 1 µm. O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural.

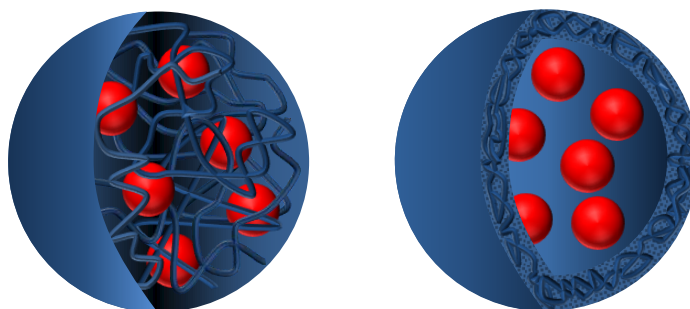


Figura 17 - Representação esquemática da estrutura de uma nanoesfera e uma nanocápsula.

Os tipos de nanopartículas desenvolvidas neste trabalho foram as nanoesferas, que consistem em sistemas matriciais (homogêneos) nos quais o fármaco é disperso no polímero. Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares (heterogêneos) nos quais o fármaco está confinado a uma cavidade circundada por uma única membrana polimérica, sendo consideradas um sistema de reservatório (figura 17) (58).

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monómeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (Eudragit) (59). A grande variedade de aplicações, bem como o número crescente de pesquisas envolvidos em estudos de polímeros de Eudragit devido às suas propriedades únicas, fizeram contribuições significativas para muitos tipos de formulações e sugerem que o potencial dos Eudragit como novos e versáteis polímeros será ainda mais significativo no futuro (56).

No presente trabalho o polímero utilizado, Eudragit RS 30D já se encontrava pré-formado. Realizou-se a preparação de nanopartículas poliméricas de Eudragit com e sem pentamidina.

3.2.1.1 Método de preparação: Nano spray drying

Esta técnica tem sido amplamente utilizada na indústria farmacêutica e também na indústria alimentar. Permite uma rápida evaporação do solvente e, embora na maioria das vezes seja considerado um processo de secagem, a atomização seguida da evaporação do solvente também pode ser usada como um método de encapsulação uma vez que retém a substância ativa dentro de uma matriz protetora, que é essencialmente inerte ao material

que está sendo encapsulado. Em comparação com outras técnicas convencionais de micro e nanoencapsulamento, oferece a vantagem atraente de produzir micro e nanopartículas num processo contínuo e relativamente simples (60).

O processo de secagem por atomização ocorre dentro de um ou mais cilindros de secagem (cilindro de atomização e cilindro de extensão opcional) onde gotículas minúsculas do material da amostra são ejetadas pelo nebulizador num fluxo de gás quente pré-programado, permitindo que as gotículas sequem (61). Devido ao seu pequeno tamanho, as partículas produzidas podem ser coletadas do fluxo de gás de secagem por um eléctrodo e um campo eléctrico com energia suficiente (61).

O processo de secagem por atomização pode ser dividido em três etapas distintas que ocorrem de forma sequencial. O primeiro passo é o estabelecimento de um circuito de gás de secagem para formar o fluxo de gás co-corrente que acompanha o líquido evaporizado; de seguida ocorre o processo de formação de gotículas por atomização que posteriormente originará o conseqüente processo de coleta das mesmas partículas (61).

Neste trabalho, obtiveram-se nanopartículas de Eudragit contendo pentamidina numa razão de 1:10. Desta forma, pesou-se o Eudragit RS 30 D que se encontrava inicialmente numa concentração de 30% (m/m), de forma a obter uma concentração final de 0,25% para um volume final correspondente a 250 mL. Posteriormente, adicionou-se à dispersão anterior a quantidade de pentamidina suficiente para obter a razão 1:10 pretendida e, completou-se o volume com água purificada. A razão fármaco/polímero desejada, implicou que o fármaco a encapsular ficasse numa percentagem de 10% do volume total de NP. Este facto, corresponde à capacidade de carga das NPs (*drug loading*), que pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$drug\ loading = \frac{quantidade\ fármaco\ na\ formulação}{peso\ total\ das\ NPs} \times 100$$

Idealmente, o nanoencapsulamento deve permitir uma elevada CC a fim de reduzir a quantidade de nanopartículas necessárias para a administração.

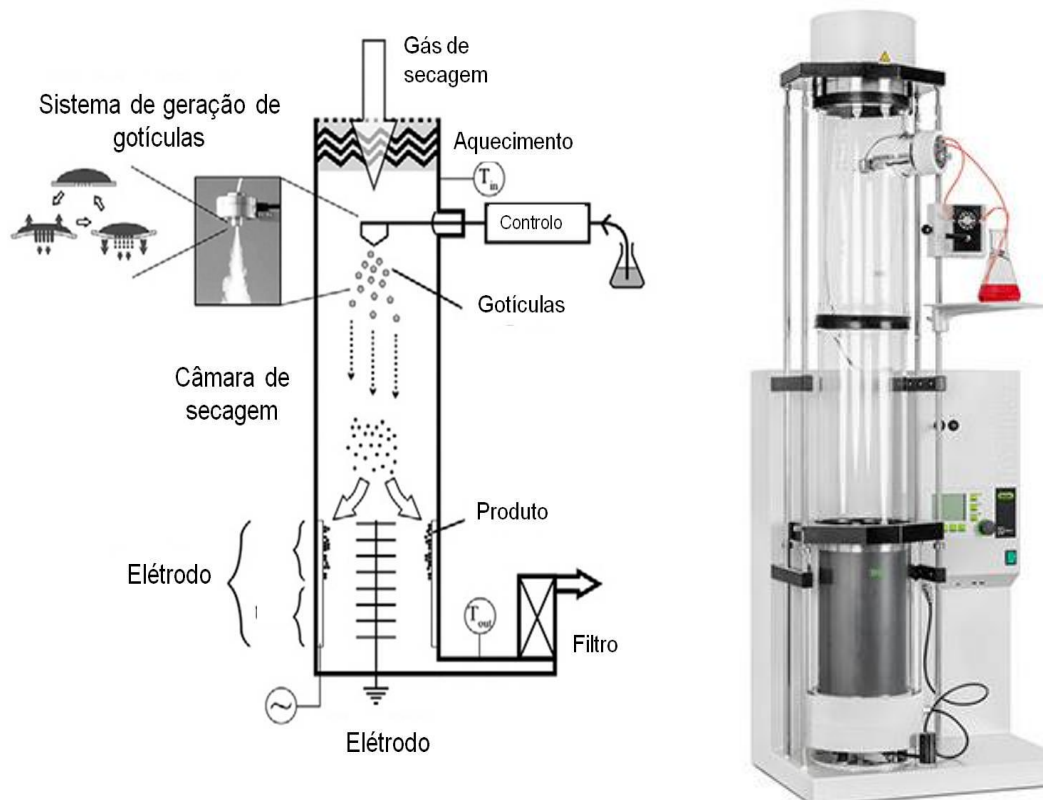


Figura 18 - Representação esquemática do método de nanospray drying- Aparelho utilizado: Nano Spray Dryer B-90. Adaptado de (62)

O aparelho usado (figura 18) corresponde a um Nano Spray Dryer B-90 (Büchi B-90; BüchiLabortechnik GmbH, Essen, Alemanha) e, as condições experimentais utilizadas foram: temperatura de 80^oC; membrana atomizadora 5,5 µm; fluxo de gás 90 L/min; pressão 30 mbar.

Tal como representado na figura 19, o instrumento inclui uma cabeça de atomização que incorpora o nebulizador. Este gera microgotículas precisamente controladas a partir de soluções líquidas usando a tecnologia piezoelétrica. Inclui um atuador piezoelétrico com uma fina membrana de aço inoxidável. O centro da membrana contém uma variedade de furos. Neste trabalho utilizou-se o diâmetro de 5,5 µm, e a membrana vibra em frequências ultrassónicas, permitindo a ejeção de gotículas de tamanho preciso em alta velocidade (figura 18).

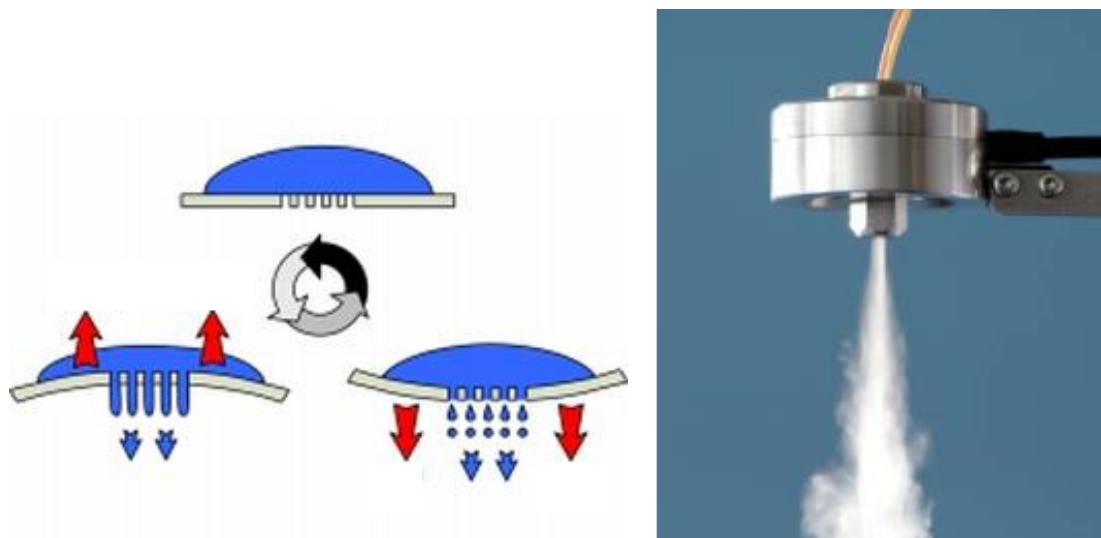


Figura 19 - Princípio de funcionamento da cabeça de atomização do aparelho Nano Spray Dryer B-90. Adaptado de (62).

O elétrico, por sua vez, cria um campo elétrico que permite a coleta das partículas pulverizadas. A bomba peristáltica faz recircular a solução a ser pulverizada entre o recipiente que a contém e a membrana de atomização. O aparelho fornece entrada de energia para elevar a temperatura do gás de secagem (61).

O processo demorou cerca de 48 horas e foi realizado para amostras com e sem a pentamidina e sem o fármaco presente. As partículas foram coletadas com um raspador de plástico e armazenadas à temperatura de 4^oC. As fotografias apresentadas na figura 20, demonstram as partículas obtidas. Tanto as NPs contendo pentamidina como as NPs vazias tinham visualmente o mesmo aspeto.



Figura 20 - Fotografias das amostras obtidas pelo método de preparação Nano spray drying. NPs com pentamidina (A) e sem pentamidina (B).

3.2.2 *Caracterização das nanopartículas*

A capacidade das nanopartículas atingirem de forma efetiva os órgãos e tecidos alvo é influenciada por características morfológicas, granulometria, carga superficial e química, e eficácia com a qual o fármaco é encapsulado e libertado. Assim, o seu uso como SLF implica que seja feita uma caracterização sistemática, a fim de verificar se as suas propriedades são as mais adequadas para aplicações farmacêuticas (63).

3.2.2.1 *Tamanho da partícula*

O tamanho da partícula é um parâmetro muito importante, não só porque irá influenciar o perfil de libertação do fármaco e a taxa de degradação das nanoformulações, mas também porque permite determinar a captação das nanopartículas pelas células mononucleares do sistema fagocitário (MPS) e a sua biodistribuição. Embora diferentes técnicas baseadas em diferentes princípios físicos possam ser usadas para medir o tamanho de nanopartículas, a dispersão de luz dinâmica (DLS), também chamado de espectroscopia de correlação fotónica é o método mais utilizado (63), juntamente com a difração laser (LD) (64).

3.2.2.2 *Dispersão da luz dinâmica - DLS*

O DLS é uma técnica analítica que permite a medição de partículas numa gama de tamanho de poucos nm a 3 μm . Um feixe de luz (normalmente *laser*) incide na amostra, e a intensidade da luz dispersa, num determinado ângulo, é medida em função do tempo. A taxa de conversão da intensidade da luz dispersa depende dos movimentos brownianos, ou seja, esta técnica mede o diâmetro hidrodinâmico baseado na dispersão da luz. O movimento browniano das partículas, não é mais que o movimento aleatório das partículas devido às moléculas de solvente que as rodeiam. Partículas menores (figura 21) têm maior difusão no solvente, movem-se mais rápido e apresentam maior variação de intensidade da luz dispersa. Assim, a análise dessas flutuações de intensidade depende da velocidade do movimento browniano e, conseqüentemente, do tamanho da partícula usando a relação de Stokes-Einstein (65).

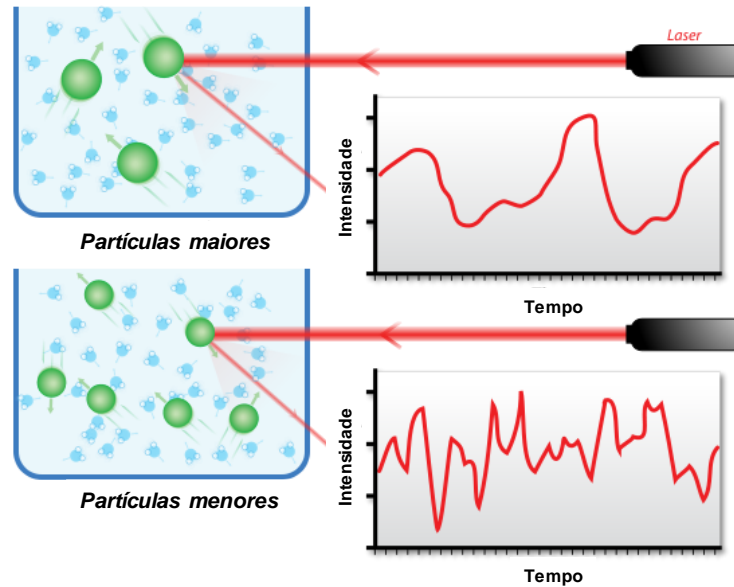


Figura 21 – Representação do funcionamento do método DLS.

A equação de Stokes-Einstein para o cálculo do diâmetro efetivo (Def), ou hidrodinâmico, das partículas em equilíbrio térmico com o solvente é definida por:

$$Def = \frac{kBT}{3\pi\eta DT}$$

sendo, kB a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do solvente e D o coeficiente de difusão translacional. Para o diâmetro efetivo, considera-se o diâmetro da partícula associada aos contra-íões e às camadas de hidratação que difundem com a partícula (66).

Nesta técnica, o modelo de cálculo assume que todas as partículas têm uma forma esférica, portanto, se alguns agregados estiverem presentes na suspensão, o tamanho médio aumentará significativamente. Para ter uma medida mais precisa vários parâmetros como viscosidade, pH, temperatura e índice de refração do meio de suspensão devem ser previamente conhecidos (66).

As vantagens deste método são a velocidade de análise, a não necessidade de calibração e a sensibilidade às partículas submicrométricas. Isso significa que o DLS é uma ferramenta útil para caracterizar nanopartículas, mas não é capaz de detetar micropartículas maiores. Estas podem ser vistas usando o método de dispersão laser (LD) que será descrito mais à frente (66).

3.2.2.3 Índice de polidispersão (IP)

O DLS também nos dá uma ideia da amplitude da distribuição do tamanho através do índice de polidispersão (IP). As distribuições de tamanho (figura 22) podem ser do tipo monomodal (uma população) ou do tipo plurimodal (várias populações) e monodispersas (distribuição estreita) ou polidispersas (distribuição ampla), como demonstra a figura 21. Assumindo que os valores de IP estão numa faixa de 0 a 1, valores abaixo de 0,1 são normalmente associados a populações com uma distribuição de tamanho estreita (46). Alguns autores defendem que valores de IP abaixo de 0,25 demonstram que a amostra é monodispersa (67).

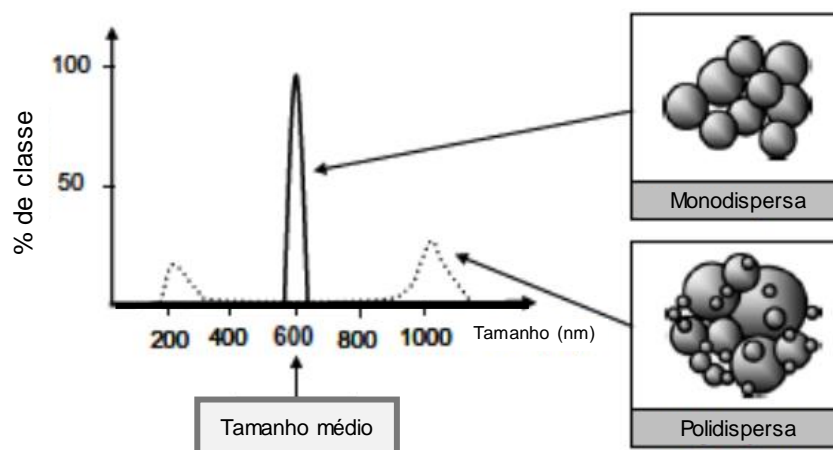


Figura 22 - Representação das curvas obtidas para dois lotes de nanopartículas de uma população monodispersa e polidispersa após análise por DLS. Adaptado de (46).

Neste trabalho, o tamanho e o IP das nanopartículas foi avaliado por DLS, utilizando um aparelho ZetaPALS (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA). Antes das medições, as amostras foram diluídas em água purificada numa cuvete. A quantidade de água foi a suficiente, considerando o *current count rate* entre 300 e 500 kcps. Os resultados foram determinados pelo BIC PALS Effective Diameter – o *software* incorporado no aparelho. As amostras diluídas foram analisadas a 25 °C, com um ângulo de incidência de luz fixa de 90 °. O diâmetro hidrodinâmico médio (Z-average) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos calculando a média de seis medições, com a duração de dois minutos cada. As medições foram realizadas para duas amostras de NPs contendo pentamidina e uma amostra de NPs vazias.

3.2.2.4 *Potencial Zeta*

Outro parâmetro a avaliar é o Potencial Zeta (PZ). O PZ é a carga global de superfície da partícula dispersa, adquirida num ambiente específico. Este parâmetro indica o grau de repulsão elétrica entre as partículas próximas e igualmente carregadas. É então uma medida da magnitude da carga eletrostática de repulsão ou atração entre as partículas em suspensão líquida e pode ajudar a entender e controlar as suspensões coloidais (68). É um dos principais parâmetros conhecidos que afetam a estabilidade de uma dispersão coloidal.

Considera-se que o potencial de 5 a 15 mV (valor absoluto) resulta numa certa aglomeração das partículas e, por isso numa floculação limitada, enquanto o potencial de 0 a 5 mV (valor absoluto) resulta numa aglomeração máxima, ou seja, floculação máxima. Geralmente, um valor absoluto acima de 30 mV é suficiente para uma boa estabilidade de uma dispersão (65, 68). O potencial de superfície positivo tem como vantagem facilitar a interação das NPS com as membranas biológicas fosfolípidicas além de prevenir a destabilização das nanoestruturas de poliéster devido à adsorção de cátions e proteínas catiónicas presentes nos fluidos biológicos. O Eudragit é um polímero capaz de promover carga superficial positiva às NPs (59).

O espalhamento de luz eletroforético (ELS) é uma técnica usada para medir a mobilidade eletroforética das partículas ou moléculas dispersas em solução. Esta mobilidade é geralmente convertida em Potencial Zeta. O princípio físico fundamental é a eletroforese. A amostra é introduzida numa célula contendo um eletrodo e um campo elétrico é aplicado. Assim, partículas / moléculas carregadas migram em direção ao eletrodo de uma carga oposta. A velocidade que eles migram é conhecida como mobilidade eletroforética e está relacionada ao PZ. Essa velocidade é medida pela técnica de Laser Doppler (64).

O PZ é determinado medindo a mobilidade eletroforética usando um aparelho ZetaPALS (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, USA). Para determinação dos resultados, as mesmas amostras foram diluídas (1:1000) com água milli-Q e analisadas a 25 °C. Estas foram colocadas numa cuvette, na qual foi inserido o eletrodo e foram analisadas através do *software* designado BIC PALS Zeta Potencial Analyzer. Os resultados foram obtidos calculando a média de seis corridas, cada uma com dez ciclos.

3.2.2.5 Difração laser (LD)

A difração laser (LD) é outra técnica amplamente utilizada para medir o tamanho das partículas (64). Este método, também conhecido como espalhamento de luz estática (SLS) ou difração de Fraunhofer, baseia-se na dependência entre o ângulo de difração e o diâmetro da partícula quando um feixe laser passa através da amostra contendo partículas dispersas. As partículas menores causam uma maior dispersão de luz e, portanto, maiores ângulos quando comparadas com partículas maiores, tal como é demonstrado na figura 23. (64).

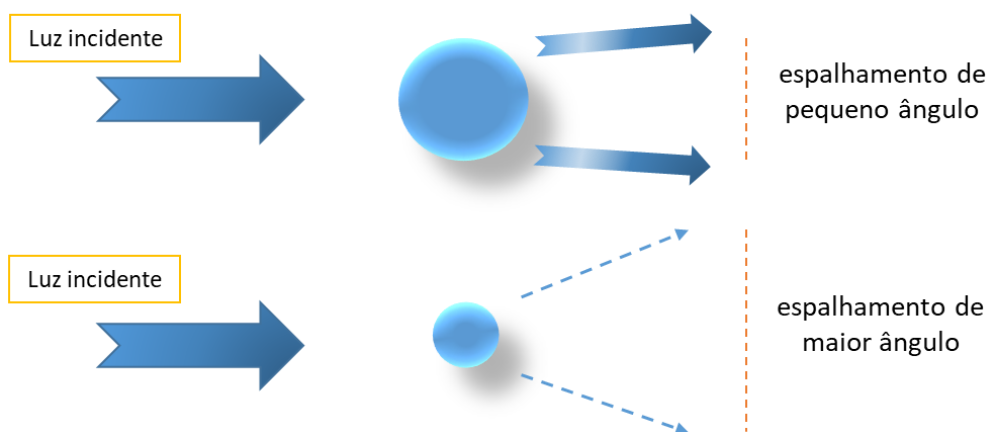


Figura 23 – Representação esquemática do efeito obtido pela luz incidente em diferentes tamanhos de partículas.

Nesta técnica, os resultados são apresentados de acordo com o tamanho de partícula para uma determinada percentagem do volume da amostra. Os percentis mais comumente relatados são os Dv10, Dv50 e Dv90. Por exemplo, o Dv50 corresponde ao diâmetro máximo de partícula para 50% do volume da amostra existente. Também pode ser definido como o tamanho mediano de partícula por volume.

Este é um método rápido e robusto que permite medir a dimensão de milhares de partículas, abrangendo uma maior gama de tamanhos, variando desde centenas de nanômetros a vários milímetros de tamanho (66).

Neste trabalho, para analisar o tamanho das nanopartículas vazias ou contendo pentamidina, foi também utilizado o método LD com o aparelho Mastersizer 3000 (Malvern, Worcestershire, UK) (figura 24). A água foi usada como dispersante. As propriedades

ópticas das NPs, consideradas para o teste foram o índice de refração de 1,4 e índice de absorção de 0,01. A amostra foi adicionada ao dispersante até atingir 5-10% de obscuração. O Dv10, Dv50, Dv90 foram obtidos calculando a média de cinco corridas. As medições foram realizadas usando uma amostra de NPs com pentamidina e uma amostra de NPs vazias.



Figura 24 - Fotografia do aparelho LD com ligação informática ao software correspondente.

É altamente recomendável o uso das técnicas de DLS e LD simultaneamente. Deve-se ter em mente que ambos os métodos não "medem" o tamanho das partículas, mas detectam efeitos de dispersão de luz, que são usados para calcular o tamanho das partículas. Em ambos surgem incertezas que podem resultar em formas de partículas não esféricas. Além disso, podem surgir dificuldades nas medições LD e DLS para amostras contendo várias populações de diferentes tamanhos. Como referido, o DLS é uma técnica com maior sensibilidade para partículas mais pequenas, enquanto que a técnica LD, permite medir distribuições de tamanho de maiores amplitudes. Desta forma, estes dois métodos complementam-se (66).

3.2.2.6 Eficácia de encapsulação

A eficácia da encapsulação (EE, expressa em percentagem) representa a razão entre a quantidade de fármaco aprisionado nas nanopartículas e a quantidade de fármaco inicialmente introduzido na formulação.

$$EE = \frac{\text{quantidade de fármaco na formulação}}{\text{quantidade de fármaco inicial introduzido na formulação}} \times 100$$

A determinação precisa da quantidade de fármaco não é fácil, porque as nanopartículas são sistemas coloidais e requerem uma separação prévia das nanopartículas do fármaco não encapsulado, normalmente por ultracentrifugação (69). Para determinar a EE usualmente realiza-se a extração de fármaco através da dissolução das NPs num solvente orgânico. Em seguida, a concentração do fármaco na solução pode ser medida por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (70), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (71), ou técnicas de espectrofotometria UV-visível (72). Em vez disso, pode-se determinar a quantidade de fármaco não encapsulado que permanece na fase aquosa após a preparação e recuperação de nanopartículas, sendo que o valor de EE é calculado como a diferença entre a quantidade de fármaco adicionado à solução de nanopartículas e a quantidade de fármaco que permanece na fase aquosa (73).

Para a determinação da EE, utilizou-se o método analítico espectrofotométrico ultravioleta-visível (UV-Vis). Os comprimentos de onda de maior absorvência da pentamidina foram determinados em espectrofotómetro V-650 Jasco, recorrendo ao *software* incorporado Spectra Manager.

3.2.3 *Desenvolvimento de método analítico espectrofotométrico*

3.2.3.1 *Soluções padrão de pentamidina*

As soluções padrão foram preparadas a partir da diluição da pentamidina em solução tampão de fosfatos (PBS) com pH 7,2.

Esta solução foi preparada a partir da adição de 10,5 g de Na₂HPO₄ (Acofarma), 3,55 g de NaH₂PO₄.H₂O (Sigma Aldrich) e 82 g de NaCl (Acofarma) em água purificada até obtenção do volume final de 1 L. A partir desta solução procedeu-se à diluição 1:100 em água purificada. Foram preparadas 6 soluções padrão de pentamidina com a referida solução tampão. Para a obtenção destas soluções foi necessária a preparação de três soluções mãe independentes. O método pode ser descrito da seguinte forma:

- Para a solução 1 foi pesado 1,1 mg de pentamidina dissolvidos em 25 mL de solução tampão (solução mãe 1) e seguidos de uma diluição 1:10.
- Para a solução 2 foi pesado 12,1 mg para um balão de 100 mL e fez-se o volume com solução tampão (solução mãe 2). Desta solução retirou-se

16,67 mL para um balão de 25 mL, perpez-se o volume e diluiu-se (1:10) com a solução tampão.

- A solução 3 foi preparada a partir da solução mãe 2 seguida da diluição 1:10.
- A solução 4 foi preparada após pesar 24,10 mg de pentamidina para um balão de 100 mL, perfazendo o volume com solução tampão (solução mãe 3). Depois disso, foi retirado exatamente 16,67 mL para um balão de 25 mL, perpez-se o volume e procedeu-se à diluição 1:10.
- A solução 5 foi preparada a partir da solução mãe 3, da qual se retirou 20,83 mL para um balão de 25 mL, perpez-se o volume com a solução tampão e posteriormente procedeu-se à diluição 1:10.
- A solução 6 foi preparada a partir da solução mãe 3, seguida da diluição 1:10.

3.2.3.2 *Quantificação da pentamidina contida nas NP de Eudragit*

Pesou-se 10 mg de NPs contendo teoricamente 1 mg de pentamidina e, transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, tendo-se completado com solução tampão PBS pH 7,2. A solução foi submetida a ultrassons através do aparelho Sonorex RK 100H por 5 minutos para obtenção da solubilização das nanopartículas e libertação do conteúdo de pentamidina encapsulada. A solução obtida foi filtrada através de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) uma membrana sintética com poro de diâmetro 0,2 µm (VWR). Os ensaios foram realizados em triplicado. Com os valores obtidos de absorvências das 3 amostras foi possível, recorrendo à equação do gráfico do doseamento da pentamidina, quantificar a quantidade de pentamidina presente nas NPs, e a EE.

3.2.3.3 *Validação do método analítico*

A validação de um método analítico é definida como o processo pelo qual é estabelecida, por estudos laboratoriais, a eficiência do método correspondendo aos requisitos necessários e à aplicação analítica desejada (74).

Os parâmetros de validação de linearidade, precisão, especificidade e amplitude foram avaliados segundo os critérios preconizados pela ICH (International Conference on Harmonisation – ICH of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005) (75).

3.2.3.3.1 Linearidade

A linearidade do método foi verificada a partir da análise de seis concentrações padrão. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A qualidade do ajustamento é determinada pelo coeficiente de correlação linear – R (entre -1 e 1) ou coeficiente de determinação – R² (entre 0 e 1). A correlação é a medida da “qualidade” da aproximação da relação entre duas variáveis por uma recta. Por convenção sugere-se que R entre 0,9 e 1 indica uma associação muito alta. Da mesma forma, o coeficiente de determinação próximo de zero indica não haver relação linear e, quando próximo de 1, uma relação linear perfeita (75).

3.2.3.3.2 Precisão

A precisão corresponde à proximidade dos valores, uns em relação aos outros, para um certo número de determinações, nas mesmas condições analíticas (75). Para esta análise determinou-se o coeficiente de variação das absorvências de seis concentrações padrão.

3.2.3.3.3 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método em determinar um analito na presença de outras substâncias (75). Este parâmetro foi conseguido pela análise do espectro de absorvência da pentamidina e do Eudragit separadamente. Ambas as amostras foram obtidas pela dissolução dos compostos em água purificada utilizando o intervalo de comprimento de onda 200 - 400 nm.

3.2.3.3.4 Amplitude

A amplitude do método é geralmente derivada de estudos de linearidade. É estabelecido que o método analítico resulta num aceitável grau de linearidade, exatidão e precisão quando aplicado a amostras contendo uma determinada quantidade de analito, incluído ou, nos extremos da amplitude do método. Normalmente para doseamento de substâncias ativas deve estar entre 80 e 120 % da concentração teste. Neste trabalho considerou-se a amplitude do método de 20 a 120% e, procedeu-se ao estudo da linearidade do método neste intervalo de concentrações (75).

3.2.4 *Perfil de libertação in vitro da pentamidina*

O perfil de libertação do fármaco *in vitro* é também um parâmetro importante, devido principalmente à aplicação de nanopartículas na libertação modificada de fármacos. No

caso das nanopartículas poliméricas, dependendo do tipo de polímero, do método de preparação, da EE e do tamanho das nanopartículas, a liberação do fármaco pode ocorrer por quatro mecanismos: desorção da superfície, difusão através de poros, difusão pela matriz polimérica ou como resultado da dissolução do polímero, sendo que na maioria dos casos pode ocorrer uma combinação dos processos de erosão e difusão (76, 77).

Os métodos para determinação da liberação de fármacos em nanopartículas são normalmente realizados *in vitro* utilizando a centrifugação (78, 79) ou métodos de diálise (80). Normalmente, nestas técnicas, e para simular as condições biológicas em que o sistema de liberação do fármaco atuará, diferentes tampões com pHs fisiológicos (próximos de 5 para ensaios na pele e próximos de 7 para ensaios sistêmicos) são usados e as amostras são colocadas a temperatura também fisiológica (32 °C para ensaios na pele e 37 °C para ensaios sistêmicos).

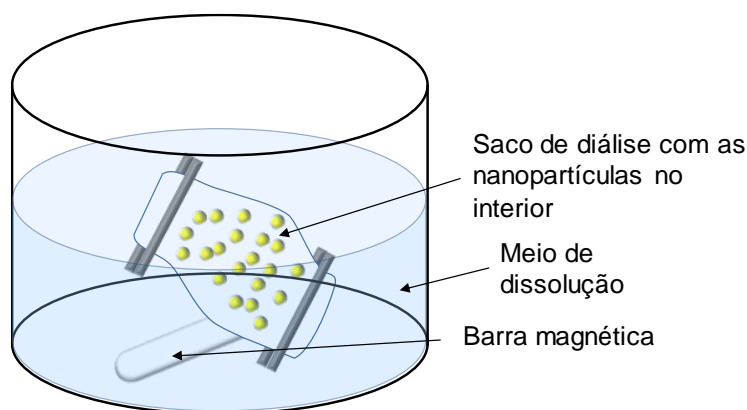


Figura 25 – Representação do método de diálise

O estudo da liberação de pentamidina foi realizado a 37 °C em triplicado, seguindo o método do saco de diálise, utilizando uma membrana tubular de celulose regenerada (CelluSep T1) (figura 25). A liberação foi determinada em PBS a pH 7,2. O tamanho do poro do saco de diálise era de 3500 Da. Neste ensaio, 1 mL de suspensão de nanopartículas (contendo, teoricamente, 0,1 mg/mL de pentamidina) foi pipetado para dentro dos sacos e as duas extremidades fixadas por molas. Os sacos foram colocados em gobelés contendo 100 mL da fase de receção e foram agitados, com agitador magnético a 200 rpm. Alíquotas de 5 mL foram retiradas em diferentes tempos (10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min e 24 horas) e diluídas em 10 mL de PBS. Posteriormente as amostras foram analisadas quanto ao teor de pentamidina por espectrometria UV-Vis a 262 nm.

3.2.5 Determinação *in vitro* da atividade das nanopartículas de pentamidina

O método utilizado foi um ensaio de viabilidade antiparasitária de 96 poços, não automatizado e quimioluminescente. O objetivo do ensaio foi determinar a atividade da pentamidina na forma livre e em nanopartículas contra a forma amastigota intracelular do parasita *L. infantum*, agente causador da leishmaniose visceral.

Neste método, os dados de viabilidade são determinados usando valores de quimioluminescência bruta (contagens por minuto, C.P.M.) obtidos a partir da leitura da luz gerada quando a luciferina é monooxigenada pela enzima luciferase de parasitas ativamente metabólicos, na presença de Mg²⁺, ATP e oxigênio molecular. Neste método, a média dos valores de controlo positivo (fármaco de referência tratado com EC100) é determinada e a média dos valores de controlo negativo (apenas DMSO a 0,5%) é também determinado (média negativa). A percentagem de atividade antiparasitária é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ atividade antiparasitária} = \frac{(\text{média do controlo negativo} - \text{valor de teste})}{(\text{média de controlo negativo} - \text{média do controlo positivo})} \times 100$$

Neste ensaio o fármaco de referência utilizado como controlo positivo foi a miltefosina. A atividade antiparasitária é estimada de acordo com a concentração de fármaco usado no ensaio. Assim, a concentração inicialmente adicionada de miltefosina foi de 20 µM e de pentamidina foi de 50 µM, seguida de diluições seriadas de 1:2. A concentração inicial para as nanopartículas contendo a pentamidina foi também 50 µM e para as nanopartículas vazias o equivalente em nanopartículas seguidas de diluições seriadas de 1:2.

A atividade antiparasitária teve com base a viabilidade do parasita no ensaio de exposição durante 3 dias, medindo a quimioluminescência, que resulta da atividade da luciferase, como dito anteriormente.

Este ensaio deteta compostos que são ativos contra a forma amastigota de *L. infantum*. No entanto, não permite concluir acerca da citotoxicidade, sendo necessária outra técnica para possibilitar retirar conclusões relativamente aos fármacos tóxicos para as células hospedeiras.

3.2.5.1 Metodologia

1. Cultura celular THP1

Para esta técnica foi necessária uma suspensão de células da linha tumoral, THP1 em RPMI e adição de acetato de tetradecanoilforbol (PMA). Foram colocadas 1×10^5 células por poço até um volume final de 100 μ L numa placa de 96 poços. Depois disso, as culturas de células foram incubadas por 18 horas a 37 °C, com 5% de CO₂.

2. Cultura dos parasitas

A preparação dos parasitas consistiu na suspensão de promastigotas *L. infantum* que expressam luciferase numa razão de macrófagos: amastigotas de 1:10, em RPMI.

3. Infeção

Após a diferenciação celular, lavou-se a cultura de células duas vezes com RPMI para remover totalmente o PMA. Adicionou-se 1×10^6 parasitas por poço, num volume total de 100 μ L. Incubou-se por 4 horas a 37^o C, 5% de CO₂, para permitir a diferenciação promastigota na forma amastigota.

4. Adição dos compostos

A adição dos compostos sucedeu após a lavagem das células infetadas duas vezes novamente para remoção de parasitas não internalizados. Posteriormente, procedeu-se à incubação durante 72 horas a 37 °C, 5% de CO₂.

5. Atividade da luciferase

A atividade da luciferase foi determinada após lavagem dos poços duas vezes em PBS, seguida de adição de PBS e 25 μ L de tampão de lise (Glo-lysis buffer, Promega). Mais tarde, adicionou-se 30 μ L de solução de substrato (Steady-Glo, Promega) e o conteúdo de cada poço foi transferido para placas de 96 poços de fundo branco.

6. Leitura dos resultados

A leitura da luminescência produzida pela luciferase foi detetada em Synergy 2 (Biotek). Foi realizada no modo de deteção de emissão do ponto final, com uma sensibilidade de 175. Os valores foram expressos como unidades relativas de luz (RLU). A percentagem de inibição do crescimento foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left(1 - \frac{RLU \text{ células tratadas}}{RLU \text{ células não tratadas}} \times 100\right)$$

As curvas de dose resposta foram obtidas automaticamente por análise de regressão linear usando o GraphPad Prism. A equação para este modelo é:

$$y = bot + \frac{(top - bot)}{1 + (x/IC_{50})^{slope}}$$

Na equação y corresponde à atividade e x à concentração. IC 50 diz respeito à concentração de fármaco que permite 50% de inibição. Realizou-se o ensaio em duplicado.

3.2.6 *Determinação in vitro da toxicidade das nanopartículas de pentamidina*

3.2.6.1 *Ensaio de MTT em células THP-1 diferenciadas por PMA*

O efeito dos compostos em macrófagos derivados de THP-1 foi avaliado pelo ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio).

Inicialmente preparou-se a cultura celular, linhagem de células THP-1 através do método anteriormente descrito. Seguidamente, 1×10^6 células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos por adição de 20 ng/mL de PMA (Sigma Aldrich) durante 18 horas, com posterior substituição com meio fresco durante 24 horas. As células foram incubadas com os compostos (pentamidina livre, pentamidina encapsulada e nanopartículas vazias) variando de 100 a 3 μ M após diluição em meio completo RPMI contendo uma quantidade máxima de 1% de DMSO. Após incubação durante 72 h a 37 °C, 5% de CO₂, o meio foi removido e foi adicionada uma solução de MTT a 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 4 horas para permitir que células viáveis convertessem o MTT num produto azulado designado formazan. Esta capacidade está relacionada com as desidrogenases mitocondriais que se encontram apenas em células metabolicamente viáveis e que clivam o anel de tetrazólio, transformando-se num composto de coloração azul escuro, chamado de formazan (figura 26). O formazan são cristais insolúveis em soluções aquosas e a sua produção, neste caso, reflete o estado funcional da cadeia respiratória das células a serem testadas. A solubilização dos cristais de formazan foi conseguida por adição de 2-propanol e a absorvência foi lida a 570 nm no Synergy 2 Multi-Mode Reader (Biotek).

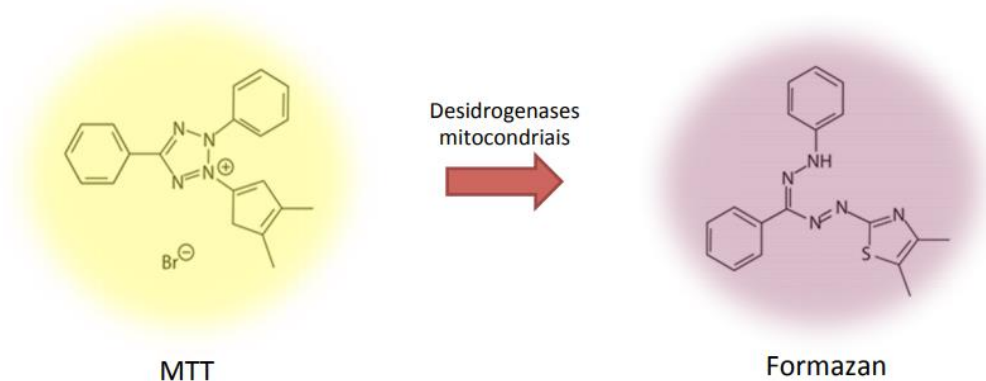


Figura 26 - Representação do sal MTT reduzido a formazan pela atividade das desidrogenases mitocondriais.

O leitor de placas utilizado permitiu assim determinar a densidade ótica (DO) lida a 570 nm sendo a viabilidade celular para cada amostra calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{DO \ 570 \ \text{células tratadas}}{DO \ 570 \ \text{células não tratadas}} \times 100$$

A citotoxicidade foi avaliada pela determinação do valor de CC50 (concentração de fármaco que reduziu a percentagem de células viáveis em 50%) e calculada por análise de regressão linear usando GraphPad Prism.

3.2.7 Avaliação *in vitro* da atividade contra *Trypanossoma brucei*

Como anteriormente referido, a pentamidina é utilizada há mais de 50 anos na terapia e profilaxia da tripanossomíase africana, também conhecida como doença do sono. Esta infeção é causada por protozoários do género *Trypanosoma*, transmitida pela picada da mosca tsé-tsé. No hospedeiro, os tripomastigotas são formas extracelulares que circulam na corrente sanguínea e vasos linfáticos (81). Uma vez que, a pentamidina é o fármaco de primeira escolha para esta infeção, pretendeu-se determinar a sua atividade antiparasitária sob a forma livre, em comparação com a forma encapsulada, a fim de concluir acerca da sua atividade biológica.

O método utilizado foi um ensaio de viabilidade antiparasitária de 96 poços, não automatizado e quimioluminescente. O objetivo do ensaio foi determinar a atividade da pentamidina na forma livre e em nanopartículas contra formas na corrente sanguínea de *T. brucei*. Os dados de viabilidade consistiram em valores de unidade de fluorescência relativa (R.F.U.) obtidos a partir da leitura da redução da resazurina em resofurina presente nos parasitas metabolicamente ativos.

Este ensaio teve uma metodologia muito idêntica à realizada para determinar a atividade antiparasitária nos parasitas *L.infantum*. Contudo, os parasitas, neste caso *T.brucei*, (5×10^3 / mL) foram adicionadas a um volume igual de diluições em série dos compostos a testar, em meio HMI-9 completo. Iniciou-se em 20 nM seguida de diluições seriadas 1:2. Após incubação durante 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂, adicionou-se 20 µL de uma solução de resazurina a 0,5 mM e as placas foram incubadas durante 4 horas nas mesmas condições. A fluorescência foi medida a 540 nm e a 620 nm, respectivamente, que são comprimentos de onda de excitação e emissão, usando um Synergy 2 Multi-Mode Reader (Biotek). Valores para IC₅₀ foram calculadas usando GraphPad Prism.

3.2.8 Índice de seletividade das nanopartículas contendo pentamidina

O índice de seletividade (IS) permite conhecer a capacidade de um composto ser ativo contra o parasita sem causar danos à viabilidade das células não infectadas. Através dos ensaios de citotoxicidade foi possível obter resultados dos vários compostos para CC₅₀ (concentração citotóxica 50%), que corresponde à dose necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células. O IS é então a razão do CC₅₀ pelo IC₅₀. Assim, quanto maior esta razão, mais seletivo é o composto sobre o parasita e, conseqüentemente, menor efeito citotóxico tem sobre as células hospedeiras. O IS pode ser calculado pela fórmula:

$$IS = \frac{CC50}{IC50}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método analítico para determinar a quantidade de pentamidina encapsulada

O método foi desenvolvido na amplitude de 20 a 120% da concentração de pentamidina. A linearidade foi avaliada através de análise de regressão linear, utilizando ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados. A curva de regressão linear foi obtida através de seis concentrações diferentes de pentamidina: 0,004; 0,008; 0,012; 0,016; 0,020 e 0,024 mg/mL em função dos valores de absorvência obtidos. O gráfico representado na figura 27 A) diz respeito à curva obtida.

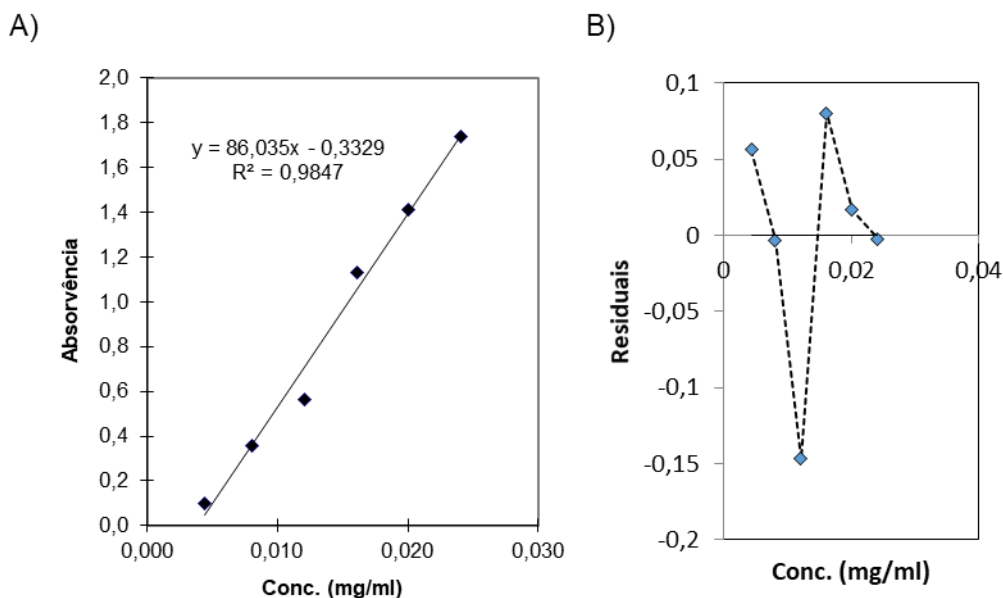


Figura 27 – A) Retas de regressão linear obtidas por espectrofotometria UV-Vis a 262 nm; B) Gráfico dos resíduos.

A partir da reta de calibração, conseguiu verificar-se que os valores de absorvência foram proporcionais às concentrações das soluções padrão. O valor de R, coeficiente de correlação linear, foi de 0,9923, o que indica uma associação alta entre as duas variáveis, concentração e absorvência.

Este método permitiu também determinar o gráfico dos resíduos (figura 27 B)). Através da análise do gráfico dos resíduos verificou-se que a dispersão dos resultados ocorreu de modo aleatório. O valor da soma dos quadrados dos resíduos (SQD) foi de

0,0315. A análise da precisão foi feita através do valor do coeficiente de variação que não foi superior a 1,42%.

Quanto à especificidade do método, ao analisar o espectro de absorção da pentamidina, revelou-se o pico máximo de absorvência no comprimento de onda de 262 nm (figura 28).

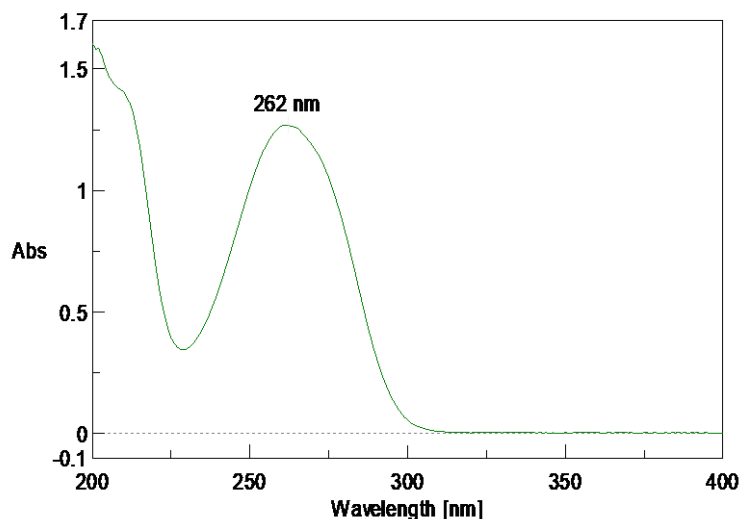


Figura 28 - Espectro de absorção da pentamidina, com o seu máximo a 262 nm.

Por outro lado, ao analisar o espectro de absorvência do Eudragit, a 262 nm este apresentou uma absorvência baixa (figura 29). Este facto permitiu concluir acerca da especificidade do método, uma vez que não há sobreposição de curvas de absorvência tanto da pentamidina como do Eudragit e, por isso, não houve dúvida de que a 262 nm quantificou-se apenas o fármaco em estudo, a pentamidina.

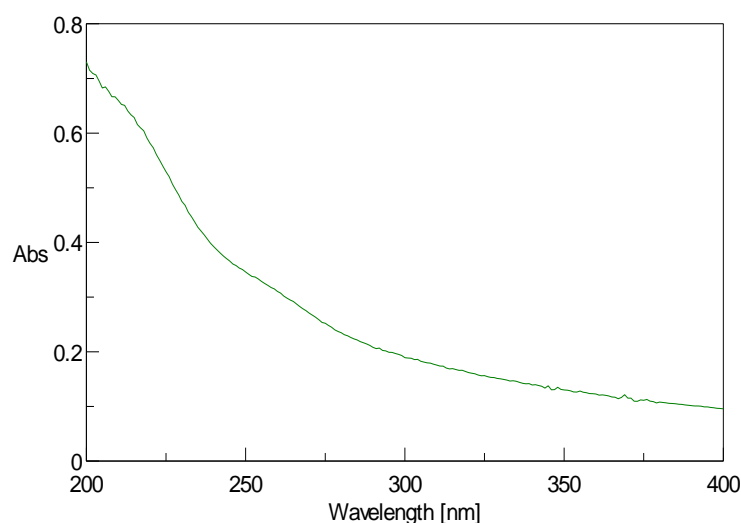


Figura 29 - Espectro de absorção do Eudragit, sem apresentar pico máximo de absorção entre os 200 e os 400 nm.

4.2 Eficácia da encapsulação

A eficácia da encapsulação para as 3 amostras foi de 61,35%, 63,16% e 62,13%. O valor médio foi de $62,21 \pm 0,009\%$, sendo o valor considerado satisfatório.

4.3 Caracterização das NP

4.3.1 Método por dispersão da luz dinâmica - DLS

A tabela IV representa a média dos valores obtidos através do método de DLS para o tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Para as NPs contendo pentamidina estão representados dois lotes e para as NPs vazias apenas um lote.

Tabela IV - Representação do tamanho da partícula (nm), IP e PZ para duas amostras de NPs contendo pentamidina e uma amostra de NPs vazias.

| | Tamanho da partícula (nm) | IP (\pm DP) | PZ mV (\pm DP) |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| NP-pentamidina (1) | 243,4 \pm 2,7 | 0,324 \pm 0,004 | 38,15 \pm 1,68 |
| NP-pentamidina (2) | 263,9 \pm 2,4 | 0,324 \pm 0,005 | 29,09 \pm 1,19 |
| NP | 536,3 \pm 8,3 | 0,402 \pm 0,002 | 50,96 \pm 0,93 |

DP- desvio-padrão

O tamanho médio das partículas demonstrou que as nanopartículas contendo pentamidina apresentaram valores inferiores relativamente às partículas vazias. Este facto pode estar diretamente relacionado com a interação fármaco polímero. No entanto, o estudo mais aprofundado das nanopartículas fazendo variar as razões fármaco/polímero poderiam ser úteis para compreender de que forma as concentrações dos compostos podem ou não interferir nesta interação.

O IP apresentou valores superiores a 0,25, o que pareceu indicar um grau elevado de polidispersão.

Ao analisarmos o PZ, as nanopartículas apresentaram superfície catiónica, como seria de esperar devido à presença do Eudragit. A análise do valor PZ não mostrou diferenças substanciais entre as propriedades de carga superficial das NPs contendo pentamidina e NPs vazias, indicando que a pentamidina estava contida na matriz polimérica das NPs, em vez de estar apenas na superfície.

4.3.2 Método por difração a laser – LD

Através do método LD determinou-se o diâmetro médio das NPs contendo pentamidina e NPs vazias. Os gráficos representados na figura 30, permitem a comparação dos tamanhos obtidos. Para ambas as amostras, é possível verificar que o tamanho se encontra numa gama entre 0,5 μm e 100 μm .

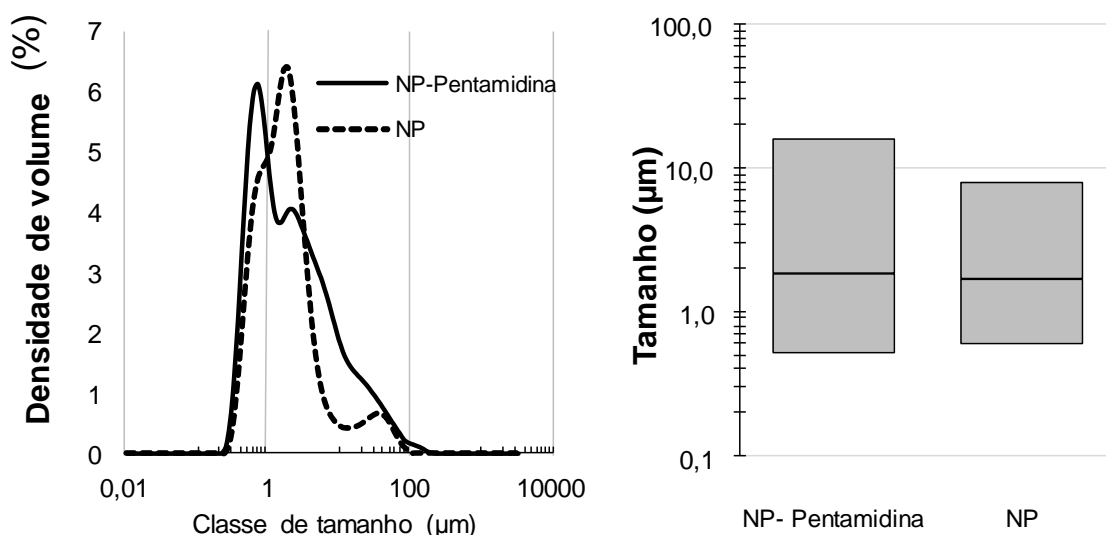


Figura 30 - Distribuições de tamanho de partícula: a) densidade volume vs classes de tamanho e b) tamanho vs tipo de partícula (parte inferior dos retângulos representa o Dv_{10} , a linha no centro representa o Dv_{50} e no topo do retângulo representa o Dv_{90}).

Através do método LD, foi possível também analisar os percentis 10, 50 e 90 para as nanopartículas com e sem fármaco. O valor representativo de Dv_{50} , mediana, surgiu semelhante para ambas as amostras, com valores próximos de $1,8 \mu\text{m}$. Cerca de 80% das amostras possuem nanopartículas com tamanhos entre 500 nm e $15 \mu\text{m}$, e que, portanto, deram origem a uma distribuição monodispersa mas ampla. É possível igualmente afirmar que existe uma gama relativamente grande de diferentes tamanhos de NPs.

Da análise dos métodos DLS e LD, é possível afirmar que os resultados obtidos não são completamente concordantes. De facto, estes métodos apresentam parâmetros estatísticos diferentes, mas a sua análise simultânea torna-se de extrema importância. O método DLS permite medir o grau de movimentação das partículas e, desta forma permite obter um valor médio de tamanho da partícula para toda amostra, estando os resultados entre 250 nm e 500 nm, ou seja, não é um método tão preciso para partículas grandes. Já o método LD, mede a distorção provocada pelas partículas ao feixe de laser. Assim, as partículas pequenas refletem muito mais que as partículas grandes. O LD permite medir milhares de partículas, sendo por isso um método mais robusto, diferentemente do DLS pois este determina a mediana, e não o valor médio. Deste modo, a mediana não é influenciada pelos valores extremos e por isso pode trazer uma resposta muito mais consistente sobre uma distribuição de valores.

4.4 Perfil de libertação da pentamidina das nanopartículas

O perfil de libertação da pentamidina foi conseguido através do método do saco de diálise (figura 31).

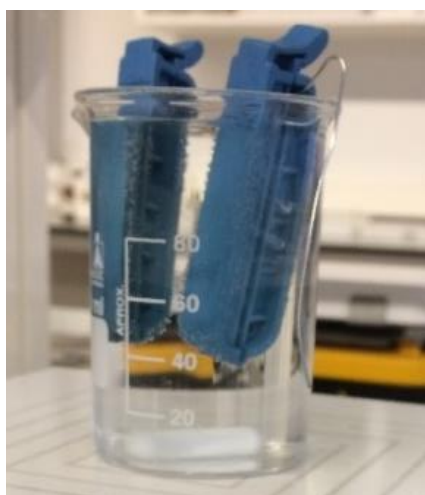


Figura 31 - Fotografia representativa do gobelé contendo o saco diálise de uma das três amostras, sobre o agitador magnético.

Os resultados obtidos permitiram a elaboração do gráfico representado pela figura 32, na qual a percentagem de fármaco libertada varia em função do tempo do ensaio. Após a análise deste gráfico, foi possível verificar que ao final de cerca de 60 min do ensaio atingiu-se a um *plateau* de libertação da pentamidina (~73%). O ensaio decorreu, no entanto, durante 24h, embora não esteja representado no gráfico. A libertação ao final de 24h mostrou um ligeiro aumento da quantidade de fármaco libertado (~80%).

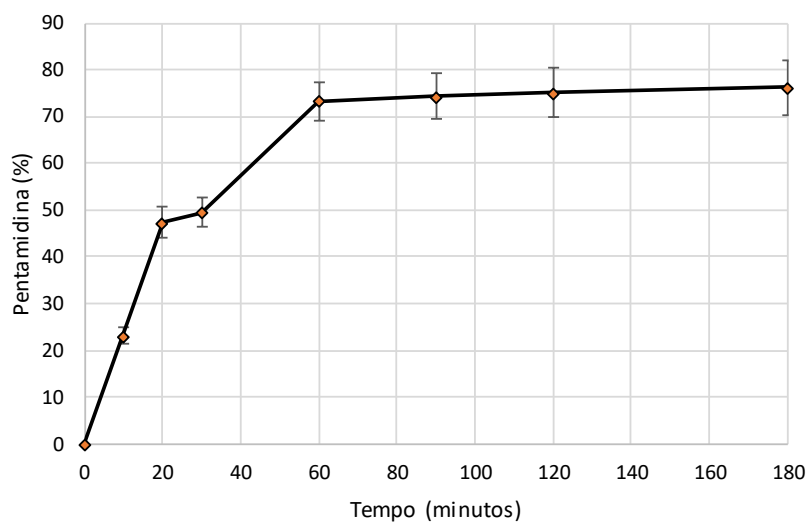


Figura 32 – Gráfico representativo dos resultados obtidos do ensaio de libertação da pentamidina.

O perfil de libertação do fármaco pode ser interessante uma vez que se consegue uma libertação rápida após cerca de uma hora o que, se poderá traduzir numa possível ação rápida. Após a primeira hora a libertação é muito menos acentuada o que pode igualmente trazer vantagens no sentido de permitir concentrações plasmáticas ideais, por mais tempo, não sendo necessárias tantas administrações por exemplo e, possivelmente resultando em menor toxicidade.

Estes resultados devem, no entanto, serem comparados à eficácia de encapsulação. Nesse sentido, o resultado máximo obtido para a EE foi 63%. Era, deste modo, de esperar que o perfil de libertação apresentasse valores semelhantes, o que não se verificou. Esta diferença verificada no ensaio de EE pode estar relacionada com a utilização de ultrassons à qual as amostras foram submetidas para solubilização das nanopartículas e libertação do conteúdo de pentamidina encapsulada. Por outro lado, também o filtro utilizado, de membrana PTFE, pode de alguma forma ter retido parte da pentamidina.

4.5 Atividade antiparasitária

T. brucei

A capacidade das NPs contendo pentamidina inibirem o crescimento de *T. brucei* foi avaliada pela análise dos valores de unidade de fluorescência relativa (R.F.U.) obtidos a partir da leitura da redução da resazurina em resofurina presente nos parasitas metabolicamente ativos. A figura 33 permite analisar o gráfico na qual a atividade antiparasitária (eixo das ordenadas) varia com o logaritmo da concentração dos compostos (eixo das abscissas).

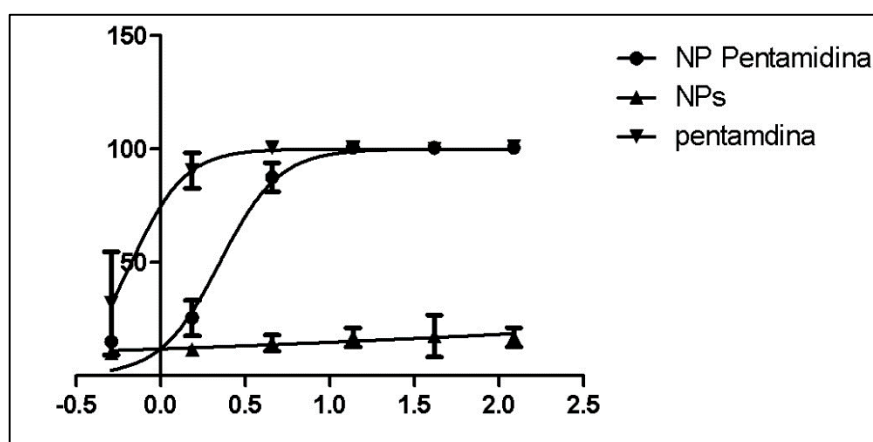


Figura 33 - Gráfico representativo da curva dose resposta (IC50) para a pentamidina, nanopartículas contendo pentamidina – NPs(P), e nanopartículas vazias – NPs.

Neste gráfico, é possível concluir-se que a pentamidina incorporada em NPs não melhorou a atividade antiparasitária em comparação com a pentamidina livre. As NPs sem fármaco não apresentaram efeito antiparasitário

L. infantum

A capacidade das NPs contendo pentamidina inibirem o crescimento de amastigotas intracelulares de *L. infantum* foi avaliada através da determinação da atividade da luciferase parasitária. Os resultados são representados pelos seguintes gráficos (figura 34).

Os valores para a média de IC50 em μM e o respetivo desvio padrão estão representados na tabela V.

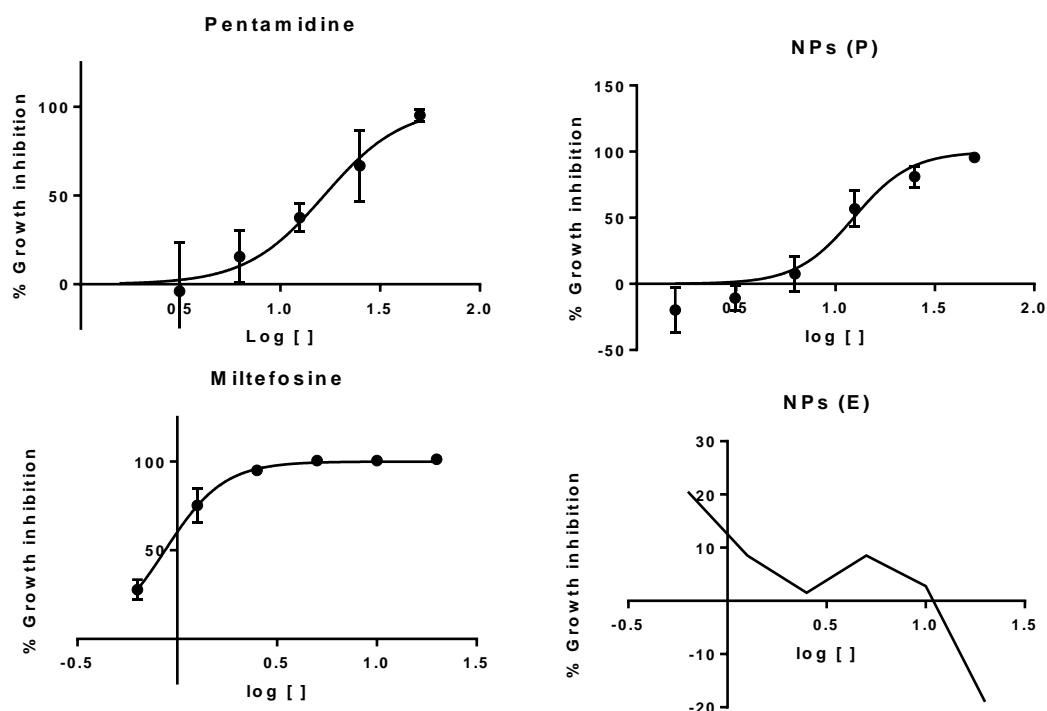


Figura 34 - Atividade antiparasitária, representada sob a forma de curva dose resposta (IC50) para a pentamidina, miltefosina e nanopartículas contendo pentamidina e vazias.

Tabela V - IC50 médio dos ensaios para os fármacos pentamidina e miltefosina e NPs contendo pentamidina e vazias.

| | Pentamidina | Miltefosina | NPs (Pentamidina) | NPs (vazias) |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|
| IC50 (µM) | 16,57 ± 1,17 | 0,87 ± 1,03 | 12,35 ± 1,09 | --- |

Os dois ensaios realizados não foram repetidos em número suficiente de vezes, para obter uma amostra com poder estatístico e avaliar a significância estatística.

De acordo com os resultados, é possível verificar que IC50 para a pentamidina livre foi ligeiramente superior comparativamente à pentamidina encapsulada, ou seja, a concentração de fármaco que permite inibir 50% do crescimento do parasita foi ligeiramente superior no caso da pentamidina livre. Para as nanopartículas vazias, não houve resposta inibitória dos parasitas.

4.6 Citotoxicidade

Ao analisarmos os valores para a citotoxicidade a partir do ensaio colorimétrico de MTT em células THP-1 diferenciadas por PMA, realizado em duplicado, verificou-se a concentração de fármaco que reduziu a percentagem de células viáveis em 50%. Assim, os resultados foram de $26 \pm 7,11 \mu\text{M}$ para a pentamidina livre e $61,06 \pm 6,58 \mu\text{M}$ para as NPs contendo o fármaco.

A encapsulação do fármaco levou a uma diminuição da sua toxicidade.

O gráfico representado pela figura 35, representa uma das curvas obtidas no ensaio, fazendo variar o IC50, % de inibição celular, em função do logaritmo da concentração. O IC50 da pentamidina livre foi superior ao IC50 das nanopartículas contendo pentamidina.

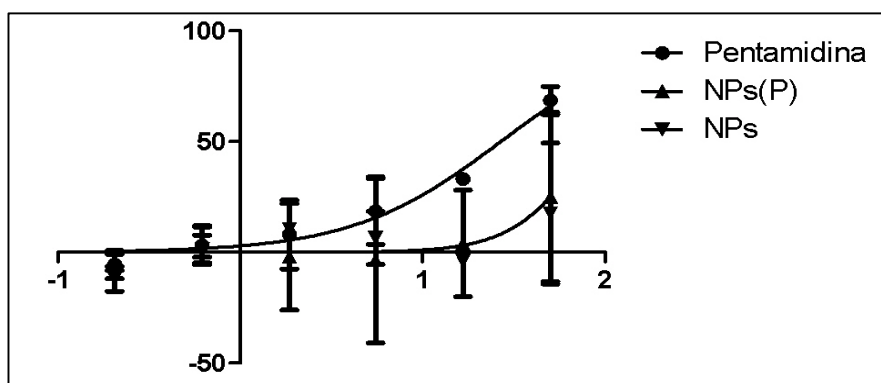


Figura 35 - Gráfico representativo da curva dose resposta (IC50) para a pentamidina, nanopartículas contendo pentamidina – NPs(P), e nanopartículas vazias – NPs.

4.7 Índice de seletividade

Ao analisar o índice de seletividade, verificou-se que a pentamidina encapsulada foi cerca de 3 vezes mais seletiva para os parasitas em comparação com a pentamidina na forma livre. Os resultados para IC50 e CC50 em μM e IS do fármaco livre e encapsulado estão representados na tabela VI.

Tabela VI - Resultados para IC50, CC50 e IS da pentamidina livre e encapsulada.

| | Pentamidina | NPs (P) |
|------------------------|------------------|------------------|
| IC50 (μM) | $16,57 \pm 1,17$ | $12,35 \pm 1,09$ |
| CC50 (μM) | $26 \pm 7,11$ | $61,06 \pm 6,58$ |
| IS | 1,57 | 4,94 |

5 CONCLUSÕES

O objetivo deste projeto foi desenvolver nanopartículas contendo o fármaco pentamidina. Esta meta foi conseguida utilizando como polímero encapsulante o Eudragit RS 30 D, através do método de preparação *nanospray drying*. Este método demonstrou ser eficaz, simples e relativamente rápido. As partículas desenvolvidas apresentaram o menor tamanho médio em nm de 243.4 ± 2.7 , através do método DLS, não havendo uma diferença significativa das partículas contendo o fármaco e das partículas vazias. O PZ teve como resultado médio mais baixo $29,09 \pm 1,19$. A dispersão de tamanhos foi relativamente ampla, apresentando um valor de $0,32 \pm 0,005$, que foi também confirmado pelo método DL. Relativamente à EE o valor médio apresentado foi de cerca de 63%, um valor que pode ser considerado satisfatório. A carga máxima das partículas foi de 6% o que, para um objetivo proposto de 10% do peso total das partículas, não ficou muito distante. De acordo com o estudo realizado para determinar o perfil de libertação da pentamidina, este demonstrou um *plateau* de libertação do fármaco (~73%) ao final de cerca de 60 min do ensaio. Posteriormente, houve apenas um pequeno aumento da quantidade de pentamidina libertada (~80%), o que do ponto de vista terapêutico pode ser benéfico, sendo necessária uma maior investigação para conseguirmos elucidar melhor este fenómeno.

Pretendeu-se também que as nanopartículas desenvolvidas apresentassem atividade contra parasitas de *Leishmania* e que demonstrassem baixa citotoxicidade. Os resultados do IC50 da pentamidina encapsulada foram de $12,35 \pm 1,09 \mu\text{M}$ e, as partículas desenvolvidas não só se mostraram menos tóxicas que o fármaco livre como também se mostraram mais seletivas para as células infetadas.

A leishmaniose é um exemplo de muitas das doenças parasitárias que afetam milhões de pessoas e animais em todo o mundo e, com as alterações climáticas é possível que a sua incidência venha a aumentar severamente nos próximos anos. Atualmente, os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, não são satisfatórios e a aparente resistência aos fármacos existentes parece complicar ainda mais o controlo desta emergente doença. Mais investigação nesta área é assim necessária para assegurar uma terapêutica eficaz para o combate à leishmaniose.

6 PERSPETIVAS FUTURAS

Este trabalho abriu uma eventual porta para pesquisas futuras. Assim otimizar o método de preparação, combinar mais um fármaco com atividade antileishmania, desenvolver estudos *in vivo*, são apenas alguns exemplos do que se pode vir a desenvolver a partir do projeto realizado.

De uma forma geral, prevê-se que no futuro novos estudos venham a destacar algumas tecnologias biofarmacêuticas no desenvolvimento de estratégias de libertação, tais como, entre outras as nanopartículas e os lipossomas. Este é um dos trajetos para o desenvolvimento e conceção de terapêuticas eficazes no tratamento da leishmaniose.

Por outro lado, a pesquisa farmacêutica sobre fitocompostos deverá representar uma outra grande estratégia para descobrir e desenvolver novos medicamentos. Esta é também uma área rica em possibilidades e, em todo o mundo, a flora representa uma enorme fonte de recursos para investigar.

A reutilização de fármacos já existentes, mas que deixaram de serem utilizados, e as terapêuticas de combinação também poderão ser uma grande aposta no desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes contra a leishmaniose.

Em suma, torna-se fundamental que haja no futuro maior financiamento para apoiar este tipo de pesquisas. A indústria farmacêutica também deve desempenhar o seu papel, na medida em que detém tecnologias modernas para a investigação e desenvolvimento de novas terapêuticas.

Atualmente, muitas das pesquisas relacionadas com a leishmaniose, são feitas em centros de investigação e universidades. Assim, no futuro, é de esperar que estes locais venham a contribuir ainda mais para que doenças negligenciadas como a leishmaniose não deixem de serem exploradas, visto que são um nicho de mercado pouco apelativo para a Indústria Farmacêutica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zucca M, Savoia D. Current developments in the therapy of protozoan infections. *The open medicinal chemistry journal*. 2011;5:4.
2. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(8):e525-e32.
3. Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin*. 2005;75-76(1):115-30.
4. World Health Organization. Leishmaniasis: Access to essential antileishmanial medicines and treatment 2017 [cited 6 June 2017]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>. [acedido em: 06/06/2017].
5. Vermelho AB, Supuran CT, Cardoso V, Menezes D, de Andrade Silva JR, Ferreira JLP, et al. Leishmaniasis: possible new strategies for treatment. *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment: InTech*; 2014.
6. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in parasitology*. 2011;27(9):403-9.
7. Chakravarty J, Sundar S. Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*. 2010;2(2):167-176.
8. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004349.
9. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017;6.
10. De Oliveira CI, de Carvalho AM, Oliveira F. Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: the trigger trio. *Frontiers in immunology*. 2013;4:375.
11. WHO. Clinical forms of the leishmaniasis. 2018.
12. petMD. petmd 2017 [cited. Available from: http://www.petmd.com/dog/conditions/infectious-parasitic/c_dg_leishmaniasis. [acedido em: 17/06/2017].
13. Campino L, Maia C. Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Medica Port*. 2010;23(5):859-864.
14. Shahcheraghi SH, Ayatollahi J, Lotfi M, Bafghi AF, Khaleghinejad SH. Application of nano drugs in treatment of leishmaniasis. *Global Journal of Infectious Diseases and Clinical Research*. 2016;2(1):018-20.
15. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*. 1998;28(1):121-34.
16. Norouzi R. A review on Most Nanoparticles Applied Against Parasitic Infections. *Journal of Biology and Today's World*. 2017;6(10):196-203.
17. WHO. WHO | Epidemiological situation.
18. Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1026(1):154-157.
19. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*. 2011;4(1):86.
20. Agency EM. CaniLeish EMA/296055/2010. 2010.
21. Roner MR, Sprayberry J, Spinks M, Dhanji S. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *Journal of general virology*. 2007;88(1):275-85.
22. Leti Univet. Vacuna Letifend, disponível em: http://saludanimal.leti.com/vacuna-contra-leishmaniosis-letifend/?utm_source=webcorp&utm_medium=bannerhome&utm_campaign=letifendv.

23. Sabate, David & Mayós, I & Cepeda, E & Homedes, Josep. (2013). Rapid stimulatory effect of Leisguard® on the canine innate immune system. International Scivac Congress. 2013 - PISA - ITALY.
24. Pink R, Hudson A, Mouriès M-A, Bendig M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2005;4(9):727- 740.
25. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2012;2:11-9.
26. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology*. 2003;19(11):502-8.
27. Wortmann G, Miller RS, Oster C, Jackson J, Aronson N. A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10-or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. *Clinical infectious diseases*. 2002;35(3):261-7.
28. Singh OP, Sundar S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Frontiers in immunology*. 2014;5:296.
29. Passero LFD, Laurenti MD, Santos-Gomes G, Campos BLS, Sartorelli P, Lago JHG. In Vivo Antileishmanial Activity of Plant-Based Secondary Metabolites. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. *Academic Press*; 2013; 7: 95-107.
30. Rosenthal E, Delaunay P, Jeandel P-Y, Haas H, Pomares-Estran C, Marty P. Le traitement de la leishmaniose viscérale en Europe en 2009. Place de l'amphotéricine B liposomale. *Médecine et maladies infectieuses*. 2009;39(10):741-4.
31. Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerging infectious diseases*. 2003;9(12):1617.
32. Kayser O, Kiderlen AF. Delivery strategies for antiparasitics. Expert opinion on investigational drugs. 2003;12(2):197-207.
33. Maddison JE, Page SW, Church DB. *Small animal clinical pharmacology*: Elsevier Health Sciences (Second Edition), W.B. Saunders; 2008; 10:198-260.
34. Craig G Stark M. *Leishmaniasis Treatment & Management*. Medscape. May 15, 2017.
35. Kumar A, Pandey SC, Samant M. Slow pace of antileishmanial drug development. *Parasitology Open*. 2018;4: 1-7.
36. Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FR, Norval S, Kime R, et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Science translational medicine*. 2012;4(119): 1-16.
37. Gupta S, Yardley V, Vishwakarma P, Shivahare R, Sharma B, Launay D, et al. Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemoth*. 2014;70(2):518-27.
38. Patterson S, Wyllie S, Stojanovski L, Perry MR, Simeons FR, Norval S, et al. The R enantiomer of the anti-tubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;AAC. 00722-13.
39. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian journal of veterinary research*. 2015;16(1): 1-19.
40. Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*. 2011; 18 (12): 1056-1069.
41. Alviano DS, Barreto ALS, de Almeida Dias F, de Almeida Rodrigues I, dos Santos Rosa MdS, Alviano CS, et al. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Frontiers in microbiology*. 2012;3 (283): 1-10.
42. Tamargo B, Monzote L, Piñón A, Machín L, García M, Scull R, et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Essential Oil from *Artemisia absinthium* L. Formulated in Nanocochleates against Cutaneous Leishmaniasis. *Medicines*. 2017; 4 (38): 1-11.

43. Romero EL, Morilla MJ. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert opinion on drug delivery*. 2008;5(7):805-23.
44. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomed*. 2008;3(2): 133-149.
45. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical science*. 2008;115(6):175-187.
46. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, Delie F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2008;69(1):1-9.
47. Micale N, Piperno A, Mahfoudh N, Schurigt U, Schultheis M, Mineo P, et al. A hyaluronic acid–pentamidine bioconjugate as a macrophage mediated drug targeting delivery system for the treatment of leishmaniasis. *RSC Advances*. 2015;5(116):95545-50.
48. Durand R, Paul M, Rivollet D, Houin R, Astier A, Deniau M. Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. *International journal for parasitology*. 1997;27(11):1361-7.
49. Durand R, Paul M, Rivollet D, Fessi H, Houin R, Astier A, et al. Activity of pentamidine-loaded poly (D, L-lactide) nanoparticles against *Leishmania infantum* in a murine model. *Parasite*. 1997;4(4):331-6.
50. Fusai T, Deniau M, Durand R, Bories C, Paul M, Rivollet D, et al. Action of pentamidine-bound nanoparticles against *Leishmania* on an in vivo model. *Parasite*. 1994;1(4):319-24.
51. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem substance and compound databases. *Nucleic acids research*. 2015;44(D1):D1202-D13.
52. Oliveira A, Guimarães K, Cerize N, Tunussi A, Poço J. Nano spray drying as an innovative technology for encapsulating hydrophilic active pharmaceutical ingredients (API). *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* 2013;4(186): 1-6.
53. Mauricio J. O USO CLÍNICO DAS PENTAMIDINAS COM ESPECIAL REFERENCIA NAS LEISHMANIOSES. *Acta Amazônica*. 1993;23(2-3):163-172.
54. Kadian SS, Harikumar S. Eudragit and its pharmaceutical significance. 2016. Disponível em: <http://www.pharmainfo.net/satishsinghkadian/publications/eudragit-and-its-pharmaceutical-significance>. [acedido em 17/07/2018].
55. Singh S, Neelam S, Singla Y. An overview of multifaceted significance of eudragit polymers in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2015;8(5):1-6.
56. Nikam VK, Kotade KB, Gaware VM, Dolas R, Dhamak K, Somwanshi S, et al. Eudragit a versatile polymer: a review. *Pharmacologyonline*. 2011;1:152-64.
57. El-Nahas AE, Allam AN, Abdelmonsif DA, El-Kamel AH. Silymarin-Loaded Eudragit Nanoparticles: Formulation, Characterization, and Hepatoprotective and Toxicity Evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(8):3076-86.
58. Suffredini G, East J, Levy LM. New applications of nanotechnology for neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*. 2014;35(7):1246-53.
59. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LLdL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química nova São Paulo Vol 26, n 5 (2003)*, p 726-737. 2003.
60. Arpagaus C, John P, Collenberg A, Rütli D. Nanocapsules formation by nano spray drying. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. Academic Press. 2017. p. 346-401.
61. Labortechnik B. Operation Manual, Nano Spray Dryer B-90 HP. 2017.
62. Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleiteix F, Vandamme TF. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release*. 2010;147(2):304-10.
63. Bhatia S. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. *Natural polymer drug delivery systems: Springer, Cham* 2016. p. 33-93.
64. Instruments M. A basic guide to particle characterization. MRK1806-01. 2012.

65. Das S, Chaudhury A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *Aaps Pharmscitech*. 2011;12(1):62-76.
66. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64:83-101.
67. Martins S, Tho I, Ferreira D, Souto E, Brandl M. Physicochemical properties of lipid nanoparticles: effect of lipid and surfactant composition. *Drug development and industrial pharmacy*. 2011;37(7):815-24.
68. Potential Z. A complete course in 5 minutes. Zeta-Meter Inc. 2012. Disponível em: http://zetarod.com/zeta_library/zeta-potential/. [acedido em 09/08/2018].
69. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;75(1):1-18.
70. Calvo J, Lavandera JL, Agüeros M, Irache JM. Cyclodextrin/poly (anhydride) nanoparticles as drug carriers for the oral delivery of atovaquone. *Biomedical microdevices*. 2011;13(6):1015-25.
71. Nahar M, Jain NK. Preparation, characterization and evaluation of targeting potential of amphotericin B-loaded engineered PLGA nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2009;26(12): 2588-98.
72. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*. 1999;57(2):171-85.
73. Lima SC, Rodrigues V, Garrido J, Borges F, Lin PKT, da Silva AC. In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012;39(5):424-30.
74. Pérez-Lozano P, Garcia-Montoya E, Orriols A, Miñarro M, Ticó J, Suñé-Negre J. Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of alprazolam in tablets. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004;34(5):979-87.
75. Association EM. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CGMP/ICH/381/95); ICH topic Q2 (R1). European Medicines Association, London, United Kingdom. 1995.
76. Lamprecht A. Nanotherapeutics: drug delivery concepts in nanoscience: Pan Stanford; 2008; 8: 227-253.
77. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):505-22.
78. Berchane N, Carson K, Rice-Ficht A, Andrews M. Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: Experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;337(1-2):118-26.
79. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review. *International journal of pharmaceutics*. 2011;415(1-2):34-52.
80. D'Souza SS, Faraj JA, DeLuca PP. A model-dependent approach to correlate accelerated with real-time release from biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech*. 2005;6(4):E553-E64.
81. Corp MSD. Trypanosoma - Manuais MSD 2018 [cited. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/SearchResults?query=Trypanosoma>. [acedido em 18/09/2018].