



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ROBERTA LILLYAN RODRIGUES REIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ALCALOIDE
EPIISOPILOTURINA NANOESTRUTURADO EM GOMA DO CAJUEIRO
CARBOXIMETILADA**

PARNAÍBA

2018

ROBERTA LILLYAN RODRIGUES REIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ALCALOIDE
EPIISOPILLOTURINA NANOESTRUTURADO EM GOMA DO CAJUEIRO
CARBOXIMETILADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Nanotecnologia aplicada à Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leiz Maria Costa Veras

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Durcilene Alves da Silva

PARNAÍBA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

R375a Reis, Roberta Lillyan Rodrigues.

Avaliação da atividade anti Leishmania do alcaloide episopiloturina nanoestruturado em goma do cajueiro carboximetilada [manuscrito] / Roberta Lillyan Rodrigues Reis. – 2018.

63 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Leiz Maria Costa Veras.

ROBERTA LILLYAN RODRIGUES REIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO ALCALOIDE
EPIISOPILOTURINA NANOESTRUTURADO EM GOMA DO CAJUEIRO
CARBOXIMETILADA**

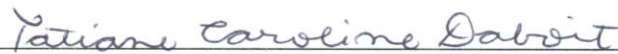
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 26 / 03 / 18


BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Leiz Maria Costa Veras
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso



Prof.^a. Dr.^a. Tatiane Caroline Daboit
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso



Prof. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial à minha irmã Lindsay, pelo
amor, carinho, incentivo e apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus por suas bênçãos, por ter me sustentado e fortalecido ao longo dessa jornada árdua, sem ti eu nada seria.

Agradeço aos meus pais, pelo amor, afeto, valores transmitidos, por nunca terem medido esforços para que eu tivesse a melhor educação possível, por acreditarem em mim e me presenteado, como dizem, com a maior herança que podiam: conhecimento. Aos meus irmãos, Renan e Lindsay, pelo companheirismo, carinho, compreensão e por sempre acreditarem no meu futuro profissional. À minha irmã Lindsay, em especial, por ter sido o meu maior apoio, ajudando-me a ultrapassar os obstáculos que apareceram no caminho, obrigada por sua dedicação e incentivo constantes na busca dos meus objetivos. Família, esta conquista não teria sido possível sem vocês, obrigada por terem apoiado as minhas escolhas, mesmo que isso significasse eu mudar de cidade.

Às professoras Dr^a Leiz Veras e Dr^a. Durcilene Silva, pela orientação. Agradeço à prof.^a Durcilene por todos os ensinamentos sobre nanotecnologia e incorporação de bioativos que tanto me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à equipe do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC/UFPI) pelos momentos compartilhados e contribuições diretas ou indiretas para esta pesquisa.

À Ma. Jéssica Rodrigues por ter me recebido no Biotec e me ensinado os primeiros procedimentos. Agradeço pela atenção, pelo auxílio na execução e desenvolvimento dos protocolos mesmo em meio a sua rotina corrida, e por sua amizade.

Ao Dr. Joilson Ramos-Jesus, em especial, a quem serei eternamente grata. Você foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho. Em meio às minhas dúvidas, incertezas e dificuldades, sempre pude contar com a sua ajuda. Muito obrigada pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade, prestatividade, paciência, incentivo e suas incontáveis contribuições para esta pesquisa.

À minha amiga Arilene Santos, por ter sempre ouvido os meus desabafos e me aconselhado, quando as coisas se complicavam eu sabia que independente da hora ou da distância eu poderia contar com você. Obrigada por ter feito tudo que estava ao seu alcance para me ajudar.

Às minhas queridas amigas Samara e Raquel, obrigada por terem compreendido as minhas ausências, por suas orações, torcida, pelos momentos de descontração e por sempre se fazerem presentes no meu dia-a-dia com suas mensagens. À minha amiga Iracema, por nossas

conversas, suas palavras de incentivo, sua atenção mesmo com uma rotina atribulada de mestrado e docência. Meninas, a amizade de vocês é uma benção de Deus na minha vida!

À minha amiga Juelina Santos, com quem tive o prazer de morar durante o mestrado, obrigada pelo companheirismo, auxílio e apoio ao longo dessa jornada. Aos meus vizinhos “irmãos” do Condomínio Guimarães, Keyte e Mayck, por ajudarem quando precisei, pelas ótimas conversas e momentos que dividimos. Levarei comigo boas lembranças desses dois anos em Parnaíba!

À Naiara pelas melhores caronas e conversas ao longo das viagens Teresina-Parnaíba, pela sua amizade e principalmente por seus conselhos fundamentais no fim desta trajetória.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV/UFPI), em especial a Solranny, pela contribuição na caracterização das nanopartículas. Obrigada à equipe do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM/UFPI): prof. Dr. Fernando Aécio, Me. Michel, Erika, Layane e Enoque; pela receptividade, colaboração e conhecimentos repassados durante a execução dos ensaios antileishmania. Agradeço também ao funcionário Josy pela receptividade e atenção.

Agradeço ao professor Dr. Marcelo Filgueiras, por ter realizado sob sua supervisão o estágio a docência em Anatomia Musculoesquelética, que tanto contribui para a minha formação profissional e lembrou-me do grande privilégio que é poder contribuir com a formação discente. Obrigada aos alunos da turma 2017.1 de Fisioterapia da UFPI-CMRV pelo carinho e receptividade. Sempre terei ótimas lembranças das nossas aulas, ensinar vocês foi maravilhoso!

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de qualificação. Aos mestres, pelos ensinamentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida. Ao Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS), pelo financiamento do projeto.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho. Esta jornada se encerra, mas outros desafios e conquistas virão. Muito obrigada!

*Eu sei que mesmo sem entender você está no controle
Então, me esconda no teu coração
Me amarre a ti pra eu não desistir
Eu sei que vai ser difícil
Mas, você estará sempre comigo
Eu vou confiar, eu vou descansar
E se eu cair a tua mão me levantará
E se eu chorar, toda lágrima você enxugará
Então vem
Aquieta minh'alma
Faz meu coração ouvir Tua voz
Espera em Deus, confia nele, descansa nele...
(Aquieta minh'alma- Ministério Zoe)*

*Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
(Trem Bala- Ana Vilela)*

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas causadas por mais de vinte espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que apresentam uma variedade de manifestações clínicas, envolvendo a pele, membranas mucosas e órgãos internos. Como os tratamentos convencionais têm alto custo, longa duração, efeitos adversos graves e casos relatados de resistência, tornam-se necessários a investigação e o desenvolvimento de fármacos mais eficientes. As plantas medicinais representam uma fonte potencial de princípios ativos com propriedades terapêuticas para doenças negligenciadas e a entrega destes bioativos em sistemas nanoestruturados pode representar uma estratégia viável, devido à sua capacidade de melhorar o potencial terapêutico. A epiisopiloturina (EPI), um alcaloide imidazólico encontrado em plantas do gênero *Pilocarpus*, apresenta comprovada atividade, *in vitro* e *in vivo*, contra *Schistosoma mansoni* e promissores efeitos anti-inflamatório e antinoceptivo. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania do alcaloide epiisopiloturina nas formas livre e nanoestruturada. As nanopartículas à base de goma do cajueiro carboximetilada com EPI incorporada (NE) e sem EPI (N0) sintetizadas por nanoprecipitação foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico, apresentando, respectivamente, um tamanho médio de 265,2 nm e 423,3 nm. Os valores de índice de polidispersão foram inferiores a 0,3; indicando uniformidade de tamanho das partículas no sistema. A avaliação *in vitro* da atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi realizada por ensaio colorimétrico de resazurina e demonstrou inibição do crescimento com concentração inibitória média (CI₅₀) de 20,3 µg/mL para NE e CI₅₀ de 32,8 µg/mL para EPI. N0, por sua vez, não apresentaram atividade contra o parasita. A avaliação da atividade hemolítica revelou que a epiisopiloturina em suas formas livre e nanoestruturada nas concentrações ≤125 µg/mL não foram tóxicas para eritrócitos humanos, mostrando que, além de eficazes em sua ação antiparasitária, EPI e NE são seguras. Além disso, a nanoestruturação do alcaloide em uma matriz polimérica de goma do cajueiro modificada potencializou a sua atividade antileishmania, evidenciando, que um sistema nanoparticulado como plataforma de entrega de bioativo pode favorecer a atividade do composto carregado. Investigações futuras devem ser feitas para avaliar a atividade antileishmania sobre formas amastigotas e o potencial citotóxico sobre macrófagos.

Palavras-chave: Alcaloide, Citotoxicidade, Goma do cajueiro, Leishmaniose, Nanopartículas.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases caused by more than twenty species of *Leishmania* protozoa that present a variety of clinical manifestations involving the skin, mucous membranes and internal organs. Because conventional treatments have a high cost, long duration, serious adverse effects and reported cases of resistance, research and development of more efficient drugs is required. Medicinal plants represent a potential source of active ingredients with therapeutic properties for neglected diseases and the handing over of these bioactives in nanostructured systems may represent a viable strategy because of their ability to improve therapeutic potential. Epiisopiloturin (EPI), an imidazole alkaloid found in plants of the genus *Pilocarpus*, has proven *in vitro* and *in vivo* activity against *Schistosoma mansoni* and promising anti-inflammatory and antinoceptive effects. In this context, this work had as objective to evaluate the antileishmania activity of the alkaloid epiisopiloturina in the free and nanostructured forms. The carboxymethylated cashew gum nanoparticles with EPI incorporated (NE) and without EPI (N0) synthesized by nanoprecipitation were characterized by dynamic light scattering, presenting, respectively, an average size of 265.2 nm and 423.3 nm. The polydispersion index values were less than 0.3; indicating uniformity of particle size in the system. *In vitro* evaluation of antileishmania activity on *Leishmania amazonensis* promastigotes were analyzed by resazurin colorimetric assays and showed growth inhibition with IC₅₀ of 20.3 µg/mL for NE and IC₅₀ of 32.8 µg/mL for EPI. N0, in turn, showed no activity against the parasite. The evaluation of hemolytic activity revealed that epiisopiloturin in its free and nanostructured forms at concentrations ≤125 µg/mL was non-toxic to human erythrocytes, showing that, in addition to being effective in their antiparasitic action, EPI and NE are safe. Moreover, the nanostructuring of the alkaloid in a polymeric matrix of modified cashew gum potentiated its antileishmania activity, thus demonstrating that a nanoparticulate system as a bioactive delivery platform can favor the activity of the compound. Future investigations should be made to evaluate the antileishmania activity on amastigote forms and the cytotoxic potential on macrophages.

Key words: Alkaloid, Cytotoxicity, Cashew gum, Leishmaniasis, Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	19
Figura 2. <i>Pilocarpus microphyllus</i> (Jaborandi) e sua distribuição no Brasil	24
Figura 3. Estrutura química da epiisopiloturina	25
Figura 4. Goma do cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> Linn).....	32
Figura 5. Distribuição de tamanho das nanopartículas poliméricas obtida por espalhamento dinâmico de luz: nanopartículas com epiisopiloturina incorporada (NE) e nanopartículas sem epiisopiloturina incorporada (N0).. ..	42
Figura 6. Atividade antileishmania de epiisopiloturina na forma livre (EPI), epiisopiloturina nanoestruturada (NE) sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/67/PH-8). .	45
Figura 7. Ensaio de biocompatibilidade em eritrócitos humanos: atividade hemolítica de nanopartículas poliméricas (NE, N0) e epiisopiloturina (EPI) em diferentes concentrações, incubadas com uma suspensão de eritrócitos a 2,5% por 30 min. Solução salina (0,85%) foi utilizada como controle positivo e TritonX (0,1%v/v) como controle negativo. Resultados representam média±erro padrão.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formas de manifestação da doença e espécies de protozoários relacionadas.....	20
Tabela 2. Distribuição de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas poliméricas sintetizadas. Dados obtidos por espalhamento dinâmico de luz e análise de mobilidade eletroforética.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anf B	Anfotericina B
Anf B-desoxi	Anfotericina B desoxicolato
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (<i>Biochemical Oxygen Demand</i>)
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
EPI	Epiisopiloturina
GC	Goma do Cajueiro
GCC	Goma do Cajueiro Carboximetilada
CLAE	Cromatografia líquida de Alta Eficiência
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (<i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i>)
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NE	Nanopartículas de goma do cajueiro carboximetilada contendo epiisopiloturina
N0	Nanopartículas de goma do cajueiro carboximetilada
NPs	Nanopartículas
PDI	Índice de Polidispersão (<i>Polydispersity Index</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Ácido 2-fosfoglicólico
PLA	Ácido Polilático
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PZ	Potencial Zeta
SFB	Soro Fetal Bovino
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Scienses</i>
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Leishmanioses	17
2.1.1. Epidemiologia	17
2.1.2. Etiologia e ciclo biológico.....	18
2.1.3 Tratamento das Leishmanioses	20
2.1.3.1 Plantas medicinais e produtos naturais.....	21
2.2 Alcaloides oriundos do jaborandi.....	23
2.2.1 Epiisopiloturina	25
2.3 Nanotecnologia, nanomedicina e plataforma de entrega de bioativos	26
2.4 Nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos	28
2.5 Polissacarídeos	30
2.5.1 Goma do cajueiro	31
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2. Objetivos Específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Coleta do material	36
4.2 Obtenção de farmoquímicos.....	36
4.3 Isolamento da goma do cajueiro.....	36
4.4 Carboximetilação da goma do cajueiro.....	36
4.5 Preparação das nanopartículas a base de goma do cajueiro carboximetilada	37
4.6 Determinação de tamanho e potencial zeta	37
4.7 Quantificação da epiisopiloturina incorporada na nanopartícula	38
4.8 Avaliação da atividade antileishmania	38
4.8.1 Substâncias utilizadas.....	38

4.8.2 Parasitas.....	38
4.8.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania sobre formas promastigotas	38
4.9 Toxicidade sobre eritrócitos	39
4.10 Análise estatística	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Caracterização das nanopartículas.....	41
5.2 Ensaio da atividade antileishmania em formas promastigotas	44
5.3 Toxicidade sobre eritrócitos	48
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7 PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Os parasitas protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis por um espectro de doenças, coletivamente conhecidas como leishmanioses, que acometem a pele, membranas mucosas e órgãos internos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as leishmanioses como estando entre as principais doenças negligenciadas do mundo, com registro anual estimado de 700.000 a 1 milhão de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes, afetando principalmente a população pobre de países subdesenvolvidos e países em desenvolvimento. Acomete em especial o Brasil, tornando-a um caso de saúde pública para este país (WHO, 2016).

O tratamento é de longa duração e realizado com quimioterápicos que apresentam elevada toxicidade, com efeitos adversos graves, que muitas vezes levam ao abandono da terapia. Além disso, esse tratamento nem sempre é eficiente e há o surgimento de casos resistentes (MENEZES et al., 2015). Desse modo, a necessidade de encontrar novos compostos antileishmania mais eficazes e menos tóxicos em relação às medicações convencionais tem levado os cientistas à busca de novos fármacos (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; TIWARI et al., 2018).

Analisando o contexto histórico, é possível observar que as plantas constituem os primeiros recursos com fins terapêuticos utilizados pela população. No entanto, as pesquisas dos componentes ativos presentes nas plantas medicinais iniciaram no século XIX, levando à concepção dos primeiros medicamentos com as características que conhecemos hoje (DUTRA et al., 2016). Diversos estudos abordam os produtos naturais como uma fonte potencial de novos agentes para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, tais como as leishmanioses (RIBEIRO et al., 2014; SINGH et al., 2014; MORAES et al., 2015; TIWARI et al., 2018). Nesse contexto, os metabólitos secundários (como quinonas, alcaloides, terpenos, saponinas, compostos fenólicos e seus derivados) se destacam devido à variedade de suas estruturas químicas e sua ampla gama de atividades biológicas. Tais compostos são potenciais moléculas bioativas de interesse para o tratamento de doenças parasitárias e modelos estruturais para a descoberta de fármacos (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; MISHRA, et al., 2009; SCHMIDT et al., 2012; PASSERO et al., 2014).

Outra linha de pesquisa que tem se destacado é a entrega racional e segmentada de produtos terapêuticos em escala nanométrica, devido a sua capacidade de melhorar o potencial terapêutico, ao contribuir para o aumento da solubilidade das moléculas bioativas, sua biodisponibilidade e permeabilidade (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). As

nanopartículas sintetizadas com polímeros biodegradáveis modificados têm despertado grande interesse dos pesquisadores devido às suas aplicações potenciais para administração de agentes terapêuticos e sua maior estabilidade tanto nos fluidos biológicos quanto durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003). A goma do cajueiro, um heteropolissacarídeo obtido a partir de exsudados da planta *Anacardium occidentale* Linn, apresenta potenciais aplicações farmacêuticas, biomédicas e alimentícias (KUMAR, A. et al., 2012; PORTO; CRISTIANINI, 2014). Alterações químicas nesses polissacarídeos podem contribuir para ampliar a sua utilização em sistemas poliméricos nanoestruturados de liberação de fármacos (PITOMBEIRA et al., 2015; DIAS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016).

Ressalta-se a espécie *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew, popularmente conhecida como “jaborandi”, como exemplo de planta medicinal brasileira de grande destaque, devido ao fato de que, a partir das suas folhas, é obtida a pilocarpina, utilizada para o tratamento de glaucoma e xerostomia (LIMA et al., 2017). Com o beneficiamento dessas folhas é gerado um resíduo industrial que apresenta um alcaloide imidazólico majoritário denominado epiisopiloturina (EPI) que mostrou atividade contra *Schistosoma mansoni* *in vitro* (VERAS et al., 2012) e *in vivo* (GUIMARÃES et al., 2015) e promissores efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo (SILVA et al., 2013). Ainda em uma investigação do mesmo grupo, Guimarães e colaboradores (2013) formularam lipossomas com EPI e observaram efetividade contra esquistossomos adultos, *in vitro*.

Considerando-se a toxicidade e o custo das terapias atuais utilizadas no tratamento de leishmaniose, destaca-se a investigação da atividade de metabólitos secundários como crucial para o desenvolvimento de novos antiparasitários e os sistemas de entrega de bioativos nanoparticulados como uma estratégia viável e promissora para a distribuição de agentes terapêuticos. Dessa forma, surgiu o interesse em incorporar a EPI em nanopartículas como uma plataforma de entrega de bioativo, utilizando uma rota de síntese com a goma do cajueiro, um polissacarídeo natural, cuja planta é amplamente distribuída na região Nordeste. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania do alcaloide epiisopiloturina nanoestruturado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmanioses

2.1.1. Epidemiologia

Consideradas entre as mais importantes doenças negligenciadas no mundo, as leishmanioses são classificadas pela OMS como doenças não controladas e emergentes (REZVAN; MOAFI, 2015). Entre as doenças parasitárias endêmicas são, após a malária, as de maior prevalência em termos de fatalidade e número total de pacientes infectados (ASHOK; LATHIYA; MURUGESAN, 2015; ABAMOR, 2017). As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que se caracterizam por ser amplamente distribuídas, visto que 97 países em cinco continentes relataram a transmissão endêmica (WHO, 2016). Segundo dados do relatório epidemiológico mais recente publicado pela OMS, estima-se que 90% dos casos globais de leishmaniose visceral relatados em 2015 ocorreram em sete países: Brasil, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia, Quênia e Somália; enquanto que a maioria dos casos de leishmaniose tegumentar concentrou-se em duas regiões epidemiológicas: a do Mediterrâneo Oriental e a das Américas. Os cinco países (Afeganistão, Brasil, República Islâmica do Irã, Iraque e República Árabe da Síria) com maior contagem de casos respondem por cerca de 75% da incidência global estimada de leishmaniose tegumentar. Com a adição da Argélia, Colômbia, Marrocos, Peru, Sudão, Tunísia e Iémen, estes 12 países representam 90% dos casos de leishmaniose tegumentar relatados em todo o mundo. Em 2015, 197 552 novos casos de leishmaniose tegumentar e 23 804 de leishmaniose visceral foram reportados a OMS, sendo que no Brasil foram 3336 casos da forma visceral e mais de 5000 da tegumentar (WHO, 2017). Desse modo, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) a qual possui um espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas, sendo classificada nas formas: cutâneas (localizada, disseminada, difusa) e mucosas (LINDOSO et al., 2012; BRASIL, 2017); caracteriza-se como um problema de saúde pública e social negligenciado em muitos países (BORGHI et al., 2017).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção devido à sua magnitude, com risco de produzir deformidades no ser humano e conseqüentemente pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico. Apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras. No Brasil, já foram

identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies envolvidas no desenvolvimento da doença são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. O ciclo de *L.(L.) amazonensis*, espécie foco do nosso estudo, ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e também nos estados das regiões nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (BRASIL, 2017).

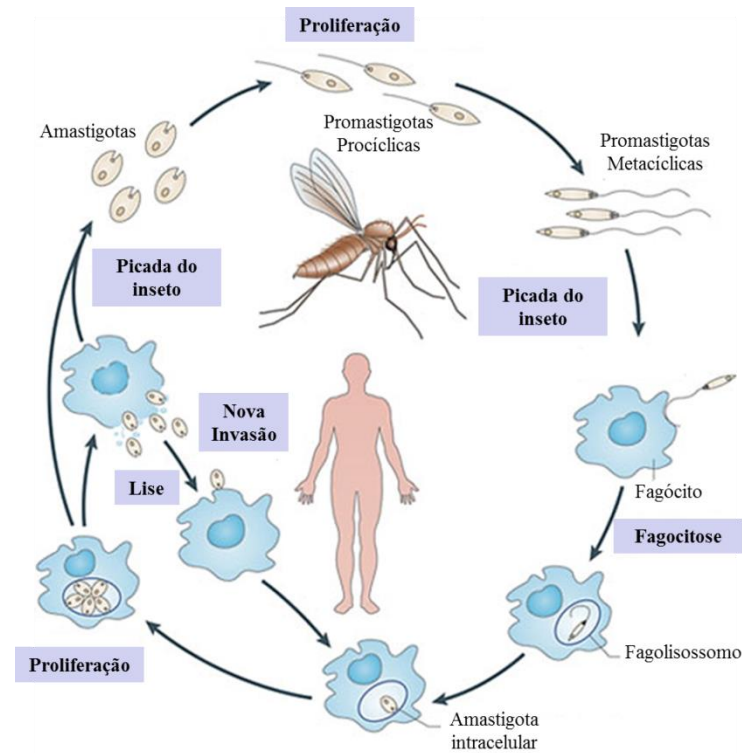
2.1.2. Etiologia e ciclo biológico

As leishmanioses compreendem infecções parasitárias, com grande diversidade epidemiológica e clínica, causadas por mais de 20 espécies de protozoários (pertencentes ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*) que mantêm seu ciclo de vida através da transmissão entre um inseto vetor flebotomíneo (ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*) e um hospedeiro mamífero (DESJEUX, 2004; CUNHA et al., 2012). O ciclo digenético do parasita compreende formas flageladas e móveis, denominadas de promastigotas, que são encontradas no inseto vetor; e formas intracelulares denominadas amastigotas, presentes no sistema fagocítico mononuclear de mamíferos hospedeiros (KAYE; SCOTT, 2011).

A infecção começa após a fêmea do flebotomíneo realizar hematofagia em um hospedeiro infectado (por exemplo, caninos, marsupiais, edentados e roedores), quando pequenas quantidades de sangue, linfa e macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania* são ingeridas. Uma vez ingeridas, as formas amastigotas migram para o intestino médio do vetor, onde se transformam em promastigotas (procíclicas), passam por diferentes de estágios de diferenciação morfológica (metaciclogênese) em que ocorrem alterações na expressão gênica que as tornam formas infectivas (metacíclicas), as quais avançam para o trato digestivo anterior do inseto. Ao realizar o próximo repasto sanguíneo, o inseto regurgita as formas metacíclicas na corrente sanguínea dos vertebrados hospedeiros. Uma vez na corrente sanguínea, ocorre a fagocitose pelas células fagocíticas mononucleares (macrófagos). Como o protozoário (*Leishmania*) é resistente à ação microbicida das enzimas (hidrolases ácidas), consegue sobreviver e se multiplicar de forma eficaz, por divisão binária, dentro dos macrófagos. Eventualmente, essas células podem sofrer lise, liberando os parasitas que podem se disseminar para novas células e tecidos de diferentes órgãos, tais como baço, fígado e

medula óssea, causando lesões e destruição de tecidos (Figura 1) (KAYE; SCOTT, 2011; SINGH et al., 2014).

Figura 1. Ciclo de vida de parasitas do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de Kaye, Scott, 2011.

As leishmanioses manifestam-se em diversas formas clínicas, dentre as quais as principais são: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (WHO, 2016); estas formas estão relacionadas a uma diversidade de espécies como agentes etiológicos da infecção (Tabela 1).

A leishmaniose cutânea é a forma mais prevalente de infecção, caracterizada por lesões cutâneas nas partes expostas do corpo, como face, braços e pernas; enquanto que, a leishmaniose mucocutânea invade as mucosas das vias respiratórias superiores, com lesões nas membranas mucosas do nariz, boca, cavidades da garganta e tecidos circundantes (ASHOK; LATHIYA; MURUGESAN, 2015; WHO, 2015). Barbosa e colaboradores (2011) destacam que ambas as formas, podem causar desfiguração grave dos pacientes, incluindo desde lesões de pele até a destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Isso leva à desfiguração permanente (forma cutânea difusa da doença) e conseqüentemente a um isolamento social do indivíduo. A espécie utilizada neste estudo, *L.(L.) amazonensis*, pode

causar lesões cutâneas difusas em seus hospedeiros; destacando-se que no Brasil, a forma difusa está associada exclusivamente a infecção causada por esta espécie (BRASIL, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1. Formas de manifestação da doença e espécies de protozoários relacionadas

Forma de manifestação da doença	Espécies
Leishmaniose Visceral	<i>L.(L.) donovani</i> , <i>L.(L.) infantum chagasi</i>
Leishmaniose Cutânea	<i>L.(L.) major</i> , <i>L. (L.) tropica</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L.(L.) pifanol</i> , <i>L.(L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (V.) panamensis</i> e <i>L. (V.) peruviana</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L.(L.) aethiopica</i> , <i>L.(L.) mexicana</i> e <i>L.(L.) amazonensis</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. (V.) braziliensis</i> e <i>L.(V.) panamensis</i>

Fonte: Adaptado de Kaye, Scott, 2011.

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais grave de leishmaniose, cujos sintomas são: febre irregular, perda de peso, úlceras mucosas, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia (ASHOK; LATHIYA; MURUGESAN, 2015). Diferentemente das formas cutâneas, a leishmaniose visceral afeta os órgãos internos, como fígado, baço, medula óssea (BRASIL, 2014). Desse modo, embora a leishmaniose cutânea seja a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a mais grave e geralmente fatal se não tratada (WHO, 2017).

2.1.3 Tratamento das Leishmanioses

O tratamento das leishmanioses inclui principalmente antimoniais pentavalentes, tais como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, embora estes fármacos apresentem várias desvantagens, tais como toxicidade, custos elevados, tratamento prolongado e vias de administração parenteral ou intralesional (STEFANELLO et al., 2014). Além disso, estes tratamentos nem sempre são eficazes, a resistência e a alta frequência de efeitos secundários graves (como cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade) são ainda problemas relevantes associados a essa terapia (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010; CALDEIRA et al., 2015). Uma vez que não existe uma vacina

eficaz e segura contra a leishmaniose, as opções de tratamento são a única forma de combater a doença (ABAMOR, 2017).

Como fármacos de segunda linha, utiliza-se a pentamidina, anfotericina B e a miltefosina, apesar da elevada toxicidade. Segundo Oliveira e colaboradores (2011), os efeitos adversos mais frequentemente relatados para pentamidina são: dor musculoesquelética, anorexia, dor abdominal, náuseas, vômitos, dor de cabeça, astenia e fadiga; enquanto para miltefosina são: vômitos, náuseas, cinetose, dor de cabeça e diarreia. Além das limitações relacionadas à toxicidade gastrointestinal, renal e hepática; a miltefosina apresenta ação teratogênica (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006).

A anfotericina B (Anf B) é um fármaco altamente hidrofóbico que apresenta uso clínico limitado pela sua frequente toxicidade, principalmente relacionada com a administração parenteral da formulação convencional composta de micelas de Anf B e desoxicolato de sódio (Anf B-desoxi) (CALDEIRA et al., 2015). Essa formulação está associada a efeitos adversos graves, como náuseas, vômitos, febre, hipocalcemia, insuficiência renal, anemia e problemas cardíacos. No intuito de reduzir a toxicidade, formulações lipídicas, tais como AnfB lipossomal (AmBisome[®]) foram desenvolvidas. Estas são absorvidas seletivamente por macrófagos, apresentam meia-vida circulante mais curta e atingem concentrações mais elevadas no fígado e no baço, com menos toxicidade que a formulação convencional; reduzindo, portanto, os efeitos adversos (LINDOSO et al., 2012; FALCI, 2015; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Estes sistemas nanoestruturados contendo AnfB têm demonstrado eficácia no tratamento de leishmaniose; entretanto, seus altos custos limitam sua utilidade (SUNDAR; CHATTERJEE, 2006; PHAM; LOISEAU; BARRATT, 2013; CALDEIRA et al., 2015).

Considerando-se que não existe uma vacina eficaz e os fármacos disponíveis apresentam alto custo, efeitos tóxicos graves, tempo prolongado de tratamento e desenvolvimento de resistência no parasita; torna-se evidente a necessidade imediata de procurar novos compostos antileishmania e desenvolver novas estratégias para o tratamento dessa doença (MISHRA et al., 2009; ALLAHVERDIYEV et al., 2013; JEBALI; KAZEMI, 2013; SHAH; KHAN; NADHMAN, 2014).

2.1.3.1 Plantas medicinais e produtos naturais

A investigação farmacêutica sobre os produtos naturais é a principal estratégia para descobrir e desenvolver novos fármacos, que podem ser mais baratos e menos tóxicos que os

medicamentos já existentes. Esta é uma área rica em possibilidades e a flora mundial consiste em uma enorme fonte de material para teste (TIUMAN et al., 2011). Os produtos naturais representam, portanto, uma fonte inestimável de bioativos para tratar várias doenças e, em muitas áreas do mundo onde a doença é endêmica, as populações locais dependem de plantas medicinais para tratar diferentes formas de leishmaniose (LEZAMA-DÁVILA et al., 2016).

Singh e colaboradores (2014) destacam que os produtos naturais são fonte potencial de agentes novos e seletivos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, especialmente as causadas por protozoários. A utilização de produtos vegetais na descoberta e no desenvolvimento de fármacos não é surpreendente, visto que há séculos os seres humanos utilizam muitos materiais derivados de plantas, tais como os metabólitos secundários, para esta finalidade.

Diversos metabólitos secundários de plantas como quinonas, alcaloides, terpenos, saponinas, compostos fenólicos e seus derivados são benéficos para o ser humano devido às suas propriedades antiparasitárias. Desse modo, as plantas e seus produtos naturais são importantes como fontes potenciais para o isolamento de novos metabólitos com atividades leishmanicidas ou imunoestimulantes (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001). Nesse sentido, diversos estudos (FERREIRA et al., 2004; DOS SANTOS et al., 2011; CARNEIRO et al., 2012; CHOWDHURY et al., 2017; FERREIRA et al., 2017; SALAMA; ARRAIS-SILVA; ARRAIS-LIMA, 2017) e revisões de literatura (MISHRA et al., 2009; PASSERO et al., 2014; SINGH et al., 2014; ODONNE et al., 2017; GUTIÉRRES-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; TIWARI et al., 2018) tem abordado a investigação e avaliação do potencial antiparasitário de compostos derivados de produtos naturais para descoberta de novos agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose.

Além dos produtos naturais como fonte potencial para a terapêutica, os sistemas de administração de medicamentos, tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas, chamaram a atenção dos pesquisadores a fim de desenvolver novas formulações contra doenças infecciosas. Estes sistemas proporcionam o transporte de substâncias para células, tecidos ou órgãos alvo com alta eficiência (TIUMAN et al., 2011).

Quanto à elaboração de nanoestruturados para incorporação de produtos naturais, em estudo realizado por Nascimento e colaboradores (2016), nanopartículas poliméricas carregadas com extrato de própolis vermelho apresentaram atividade citotóxica sobre *L. brasiliensis*. Foi demonstrado neste estudo potencial para a preparação de formulações farmacêuticas envolvendo bioativos nanoparticulados na terapia de doenças negligenciadas, como as leishmanioses. Lala e colaboradores (2004) também investigaram o potencial de

formulações nanoestruturadas da harmina, um alcaloide isolado da planta *Peganum harmala* L. A atividade antileishmania em *L. donovani*, foi avaliada *in vitro* e *in vivo*, utilizando formas livre e lipossômicas do composto. As formulações lipossômicas foram relatadas como mais efetivas na destruição de parasitas intracelulares, menos hepatotóxicas e nefrotóxicas que as formas não encapsuladas (LALA et al., 2004). Abamor (2017), por sua vez, investigou a atividade antileishmania *in vitro* do éster fenilico de ácido caféico (componente de extratos de própolis de abelhas), encapsulado em NPs (Nanopartículas) de PLGA (Poli (ácido láctico-co-glicólico)), em formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Foi verificado que estas NPs foram citotóxicas para ambas as formas do parasita. Dessa maneira, o estudo da atividade antileishmania de produtos naturais nanoestruturados é um campo promissor no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de bioativos.

2.2 Alcaloides oriundos do jaborandi

Entre as espécies de plantas medicinais nativas e cultivadas no Brasil, produtoras de compostos bioativos de interesse mundial destacam-se aquelas que são popularmente conhecidas pelo nome de “jaborandi” (gênero *Pilocarpus*, família Rutaceae). Essas espécies são fonte de uma variedade de metabólitos secundários com potencial atividade farmacológica, tais como alcaloides, cumarinas, flavonoides e terpenos (SANTOS; MORENO, 2004). Apresentam uma ampla distribuição pelo continente americano, estendendo-se da América Central até a América do Sul, sendo que já foram descritas para este gênero 16 espécies, das quais 13 são encontradas no Brasil, sendo 11 exclusivas desse território (SKORUPA, 2000).

O gênero *Pilocarpus* compreende espécies nativas encontradas no Norte e Nordeste do Brasil. Dentre estas espécies, *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew (Figura 2) é encontrada na região Norte, no Estado do Pará, e na região Nordeste, nos Estados do Maranhão e Piauí. *P. microphyllus* é uma das mais importantes espécies de plantas medicinais do Brasil, devido ao fato de suas folhas serem fonte da pilocarpina, um alcaloide usado no tratamento de glaucoma e xerostomia (SANTOS; MORENO, 2004; LIMA et al., 2017).

Figura 2. *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi) e sua distribuição no Brasil



Fonte: GUIMARÃES, 2018

Os vegetais produzem grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Esses compostos são conhecidos como metabólitos secundários e constituem a maior fonte de substâncias bioativas. Dentre esses produtos secundários, os alcaloides são compostos básicos derivados de aminoácidos que contêm um ou mais átomos de nitrogênio pertencentes a anel heterocíclico (estrutura que possui átomos de hidrogênio e carbono), classicamente conhecidos pelos seus importantes efeitos farmacológicos em animais vertebrados (SHAO; ZHOU; TSAO, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2013). Sabe-se que os alcaloides são utilizados como agentes terapêuticos anestésicos, analgésicos e psicoestimulantes, dentre outras atividades farmacológicas (VERAS et al., 2013). Tiwari e colaboradores (2018) abordam ainda que estes metabólitos secundários tem papel significativo para os seres humanos devido à sua potencial gama de atividades antiparasitárias e antimicrobianas, que embora já reportadas, ainda precisam de mais investigações.

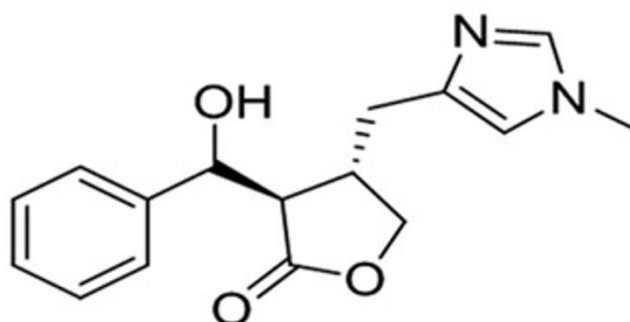
Vários alcaloides já foram isolados das plantas do gênero *Pilocarpus*, tais como: pilocarpina, isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina, N,N-dimetiltriptamina, plastidesmina, (1H)-4-metoxi-2-quinolone e dictamina.

Muitos deles ainda estão em análise para avaliar os seus efeitos terapêuticos (SANTOS; MORENO, 2004).

2.2.1 Epiisopiloturina

O alcaloide imidazólico EPI (Figura 3) é obtido a partir da biomassa oriunda do processamento de folhas de jaborandi para extração de pilocarpina (MIURA, 2009). O alcaloide EPI, em particular, foi identificado por Voightlander e colaboradores em 1973. Em estudo desenvolvido por Veras e colaboradores (2013), os parâmetros químicos foram melhorados e desenvolvidos em um processo de escala industrial para extração, purificação e isolamento de EPI, assim como foi realizada a caracterização estrutural e espectroscópica deste alcaloide.

Figura 3. Estrutura química da epiisopiloturina



Fonte: SILVA et al., 2013.

Entre os estudos que investigam a atividade antiparasitária da EPI, Veras e colaboradores (2012) avaliaram a atividade *in vitro* contra *Schistosoma mansoni*, tendo demonstrado que o composto não só mata o parasita, mas também inibe a postura de ovos; além disso, a atividade anti-esquistossômica foi seletiva e não afetou as células de mamíferos. Em estudo de efeito *in vivo* contra adultos e vermes juvenis de *Schistosoma mansoni*, houve redução significativa da carga parasitária, da hepatoesplenomegalia e no número de ovos nas fezes dos animais (GUIMARÃES et al., 2015). A EPI, portanto, demonstrou potencial para ser usada no tratamento da esquistossomose.

Silva e colaboradores (2013) investigaram a atividade de EPI em modelos farmacológicos clássicos de inflamação (edema de pata e migração de neutrófilos) e dor

(contorção induzida por ácido, teste de placa quente e indução de dor usando formalina), tendo obtido potenciais efeitos anti-inflamatório e antinocepcivo. Em estudo da atividade antibacteriana e citotóxica de cinco alcaloides de *P. microphyllus* (pilosina, epiisopilosina, isopilosina, epiisopiloturina e macaubine), nenhum dos alcaloides mostrou atividade antibacteriana e adicionalmente, esses compostos não exibiram efeito citotóxico sobre células VERO (ROCHA et al., 2017).

Partindo dos pressupostos de que as propriedades farmacológicas de fármacos convencionais não encapsulados podem ser melhoradas com sistemas nanoestruturados (tais como nanopartículas poliméricas, micelas e lipossomas), aumentando a solubilidade dos compostos; e de que o alcaloide EPI é uma molécula apolar; Guimarães e colaboradores (2013) estudaram, *in vitro*, o efeito de lipossomas carregados com EPI. Essa investigação mostrou que a nova formulação apresenta efetividade contra esquistossomos adultos, além de ser mais estável que a forma livre. Nessa mesma linha, Lima (2016) visando o desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante que melhorasse a biodisponibilidade plasmática do alcaloide EPI após administração via oral, incorporou o mesmo em uma formulação lipídica. O teste de biodisponibilidade *in vivo* demonstrou que esta nanoformulação promoveu uma maior concentração de EPI no plasma, comparado com a administração da molécula livre, sendo então eficaz para carrear e aumentar a disponibilidade plasmática do composto EPI pela via de administração oral. Segundo a autora, o desenvolvimento dessa nanoformulação enquanto plataforma de experimentação visa à aplicação futura na otimização do tratamento da esquistossomose em modelos animais. Assim, esses estudos evidenciam que sistemas de encapsulação de fármacos, desenvolvidos por meio da aplicação de nanotecnologia, são candidatos potenciais para administração de compostos com propriedades antiparasitárias.

Em estudo realizado por Rodrigues (2016) foram formuladas nanopartículas a base de uma matriz polimérica de goma do cajueiro acetilada para incorporação de EPI. Essas nanopartículas apresentaram tamanho em escala manométrica, boa estabilidade coloidal e perfil de liberação lento e gradual, seguindo modelo de difusão fickiana; caracterizando-se, portanto, como fontes viáveis para o carreamento de moléculas.

2.3 Nanotecnologia, nanomedicina e plataforma de entrega de bioativos

Grande parte do avanço científico e tecnológico está relacionada à nanociência e à nanotecnologia. A nanociência pode ser conceituada como o estudo dos princípios

fundamentais de átomos, moléculas e estruturas em escala nanométrica, enquanto que o ramo desta ciência responsável pelo estudo, mensuração, manipulação e desenvolvimento destes materiais com diâmetro na faixa de dezenas a centenas de nanômetros refere-se à nanotecnologia (PANDEY et al., 2008; SIMÕES; TAKEDA, 2015; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2017).

Um nanomaterial apresenta características diferenciadas, uma vez que as propriedades fundamentais físicas, químicas e/ou biológicas estão intimamente relacionadas à nanoescala; o que interfere nas suas aplicações, sendo determinante para o uso desses nanomateriais em diversas áreas (FARAJI; WIPF, 2009; ABDI, 2010). Dentre estas áreas podem ser citadas: engenharia (RAKI et al., 2010; ASHANI; PARIKH; MARKNA, 2015), agricultura (ROCHMAN, 2011; FRACETO et al., 2016), indústria de alimentos (SILVA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2015), medicina e saúde (WICKI et al., 2015; AGUIRRE-CHAGALA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017).

Aplicações da nanotecnologia para tratamento, diagnóstico, monitorização e controle de sistemas biológicos constituem a subárea denominada nanomedicina, destacando-se o desenvolvimento de nanomateriais direcionados ao diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005; KUMAR, B. et al., 2012). Estes nanomateriais têm tamanhos que variam de alguns nanômetros até várias centenas de nanômetros e podem replicar algumas funções de macromoléculas globulares biológicas, exibindo propriedades físicas interessantes que representam novas oportunidades para pesquisas e aplicações biomédicas (WANG et al., 2013; PELAZ et al., 2017).

Os sistemas nanoestruturados como veículos de distribuição de agentes terapêuticos têm sido objeto de um interesse crescente nos campos científico (biofarmacêutica) e comercial devido ao seu potencial para distribuição específica de fármacos e, assim, promovendo a otimização do tratamento (HORNIG; BUNJES; HEINZE, 2009).

No que se refere às doenças negligenciadas, como malária, leishmaniose e esquistossomose, a nanotecnologia já foi empregada na pesquisa e desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos (tais como, lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões) que permitam o transporte eficiente das moléculas para as células alvo, melhorem a absorção celular e minimizem a toxicidade para células normais; buscando, deste modo, obter maior segurança, qualidade e eficácia no tratamento destas parasitoses (DATE; JOSHI; PATRAVELE, 2007; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2017; AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

No campo da entrega racional e segmentada de produtos terapêuticos, os nanoparticulados oferecem ainda várias vantagens, tais como: proteção do fármaco contra degradação química ou enzimática, capacidade de liberação controlada, melhora da solubilidade e biodisponibilidade do fármaco (GALINDO; RODRIGUEZ, 2004; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; NAMAZI; FATHI; HEYDARI, 2012).

A biodistribuição de um composto ativo depende das propriedades físico-químicas das partículas, especialmente do tamanho. Partículas pequenas, portanto, têm uma habilidade aumentada de alcançar seu alvo, produzindo um efeito terapêutico otimizado e minimizando os efeitos indesejáveis dos medicamentos em outros tecidos (SAFARI; ZARNEGAR, 2014; GAUMET et al., 2008). A miniaturização, além de proporcionar a facilidade em atingir alvos específicos, confere ainda com a modificação do tamanho novas propriedades térmicas, ópticas, eletrônicas e magnéticas aos materiais, o que pode influenciar na interação com os tecidos biológicos (PICKUP et al., 2008).

Outro importante fator a ser considerado para a efetividade dos sistemas de liberação de fármacos é o nível de distribuição espacial, já que qualquer fármaco necessita ser absorvido, distribuído, atingir o alvo específico e interagir com os tecidos; ocorrendo neste percurso a interação com várias barreiras anatômicas. Nesse contexto, os sistemas poliméricos nanoestruturados são largamente utilizados. Sejam sintéticos ou naturais, os polímeros podem ser hidrolisados, resultando em compostos biocompatíveis (AZEVEDO et al., 2005).

2.4 Nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos

As nanopartículas vêm sendo utilizadas como uma alternativa para alterar e melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de vários tipos de moléculas (MOHANRAJ; CHEN, 2006; KUMAR, B. et al., 2012). Considerando-se o interesse científico crescente no desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo sistemas nanoparticulados para a distribuição de bioativos, os polímeros desempenham um papel significativo, tendo sido frequentemente adotados no desenvolvimento de nanomateriais devido à sua versatilidade e uma vasta gama de propriedades (HANS; LOWMAN, 2002).

As nanopartículas poliméricas biodegradáveis são promissoras como sistema de administração de agentes terapêuticos por fornecerem um excelente controle farmacocinético, proporcionando uma liberação controlada e uma matriz de proteção que impede a degradação do fármaco (FARAJI; WIPF, 2009; NAMAZI; FATHI; HEYDARI, 2012). Além disso, esses veículos poliméricos permitem uma estabilização e aumento da solubilidade do fármaco,

melhora do tempo de circulação e do índice terapêutico, com redução dos efeitos adversos devido ao seu potencial para distribuição específica do ativo ao local, otimizando a terapia medicamentosa (PANYAM; LABHASETWAR, 2003; HORNIG; BUNJES; HEINZE, 2009). Estes sistemas poliméricos nanoparticulados caracterizam-se por apresentarem diâmetro inferior a 1µm (1000 nm) (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Kumari, Yadav e Yadav (2010) ao estudarem o impacto da nanoencapsulação de moléculas em nanopartículas biodegradáveis, elaboradas com poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), quitosana, gelatina, policaprolactona e poli-alquilcianoacrilatos, verificaram que os sistemas poliméricos para a encapsulação de agentes terapêuticos além de proporcionarem tamanho subcelular, propriedade de liberação controlada/ sustentada e biocompatibilidade com tecidos e células, caracterizam-se por serem estáveis no sangue, não tóxicos, não trombogênicos, não-imunogênicos, não-inflamatórios e aumentarem a biodisponibilidade, solubilidade e permeabilidade de muitos fármacos potentes que são difíceis de administrar por via oral; possibilitando uma maior exploração de bioativos.

Nesse sentido, no que tange às investigações envolvendo a nanoestruturação de compostos antileishmania em matriz polimérica, Want e colaboradores (2014) buscando a melhora da eficácia e redução da toxicidade de artemisinina, produto que apresenta baixa disponibilidade e estabilidade, realizaram a encapsulação deste bioativo em NPs poliméricas de PLGA e polietilenoglicol (PEG), as quais se mostraram mais eficazes e menos tóxicas que a forma não encapsulada do ativo. De Carvalho e colaboradores (2013), por sua vez, com objetivo de projetar um novo sistema de entrega de fármacos, nanoencapsularam Anf B-desoxi em NPs de PLGA e ácido dimercaptosuccínico e avaliaram a sua eficácia no tratamento *in vivo* de leishmaniose cutânea (*L. amazonensis*). Esta nova formulação foi significativamente mais eficaz na redução do número de parasitas e da viabilidade celular, além de favorecer a diminuição da frequência de dose requerida para atingir a mesma concentração plasmática quando comparada com a Anf B-desoxi.

Para a preparação dos sistemas poliméricos, podem ser utilizados polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos; sendo que a seleção do polímero a ser empregado ocorre, em grande parte, pela natureza do princípio ativo que se pretende incorporar ao sistema. Uma grande variedade de polímeros naturais pode ser utilizada para a preparação de sistemas de transporte, dos quais se destacam os peptídeos, as proteínas e os polissacarídeos (SEVERINO et al., 2011). Entre os principais polímeros quimicamente produzidos que são bem conhecidos como veículos de fármacos biodegradáveis estão: ácido 2-fosfoglicólico (PGA), PLA e PLGA (SIONKOWSKA, 2011).

Nanopartículas de polímeros naturais têm sido amplamente utilizadas para a liberação controlada de fármacos, pois além das suas propriedades físico-químicas, biodegradabilidade e biocompatibilidade, esses polímeros são geralmente abundantes, menos dispendiosos do que outros materiais e podem ser modificados (ERRICO et al., 2009; PAULA et al., 2012).

Pertencendo à classe de polímeros naturais, os polissacarídeos parecem ser os materiais mais promissores na preparação de veículos nanométricos como sistemas de administração de fármacos (LIU et al., 2008). Nesse contexto, Bittencourt e colaboradores (2016) destacam que uma nova abordagem para a formação de nanoestruturas envolve o uso de gomas naturais, que são polissacarídeos obtidos a partir de resinas de árvores, sementes ou algas, ou por fermentação microbiana. Em particular, as gomas brasileiras, tais como a goma do cajueiro, são polímeros naturais ramificados e hidrofílicos, com massas molares elevadas, cujas propriedades oferecem vantagens no desenvolvimento de sistemas de distribuição de ativos, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade e rentabilidade (PAULA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016).

2.5 Polissacarídeos

Quimicamente, os polissacarídeos são polímeros formados pela condensação de unidades denominadas monossacarídeos, via ligação glicosídica. Na natureza, podem ser de origem vegetal (goma guar e pectina), animal (quitosana, sulfato de condroitina), microbiana (dextrano, goma xantana) e obtidos a partir de algas (alginato) (SINHA; KUMRIA, 2001).

Particularmente, na maior parte dos polissacarídeos naturais as cadeias hidrofílicas contêm vários grupos de diferentes pesos moleculares e composições químicas. A natureza desses grupos pode diferenciar os polissacarídeos de um ponto de vista estrutural e levar a diversas propriedades físico-químicas e biológicas (HASSANI et al., 2012). Por exemplo, os grupos hidrofílicos (tais como grupos hidroxila, carboxila e amino) podem formar ligações não covalentes com tecidos biológicos (principalmente epitélios e membranas mucosas), favorecendo a bioadesão (LEE; PARK; ROBINSON, 2000; VASIR; TAMBWEKAR; GARG, 2003).

Devido à presença de numerosos grupos reativos em suas cadeias moleculares e uma composição química variável, os polissacarídeos podem ser facilmente modificados quimicamente, resultando em diversos tipos de derivados (LIU et al., 2008). Essas modificações podem melhorar as propriedades físico-químicas, mecânicas ou químico-biológicas, ampliando as possibilidades de utilização desses derivados de polissacarídeos

como novos materiais (CUNHA, 2006). Dentre as alterações químicas podem ser citadas a introdução de grupos iônicos (como é o caso das reações de carboximetilação), a remoção de ramificações ou sítios de hidratação e a introdução de substituintes hidrofóbicos (MOURA, 2009). As cadeias hidrofílicas dos polissacarídeos podem ainda ser modificadas com moléculas ou oligômeros hidrofóbicos, resultando em biopolímeros anfifílicos, o que favorece a automontagem em água formando nanopartículas ou nanogéis, que são úteis para a administração de fármacos (PITOMBEIRA et al., 2015).

Os polissacarídeos e os seus derivados representam uma classe de materiais poliméricos largamente utilizados em sistemas para administração controlada de fármacos, bem como em formulações farmacêuticas, devido principalmente à sua excelente biocompatibilidade e propriedades biodegradáveis (MACIEL et al., 2006). Os polissacarídeos, portanto, podem ser apropriados para a preparação de biomateriais devido às suas propriedades físico-químicas, pela abundância na natureza, baixo custo de processamento, biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Uma das principais vantagens da utilização de polissacarídeos como componentes para a síntese de nanopartículas, com a função de sistema polimérico de transporte de princípios ativos, é o seu reconhecimento molecular natural, uma vez que eles têm receptores específicos em certas células (LIU et al., 2008). Dessa maneira, polissacarídeos naturais e seus derivados têm sido objeto de intensa investigação para aplicação potencial como sistemas de entrega de fármacos (LIU et al., 2008; RANA et al., 2011; SEVERINO et al., 2011; ABREU et al., 2012).

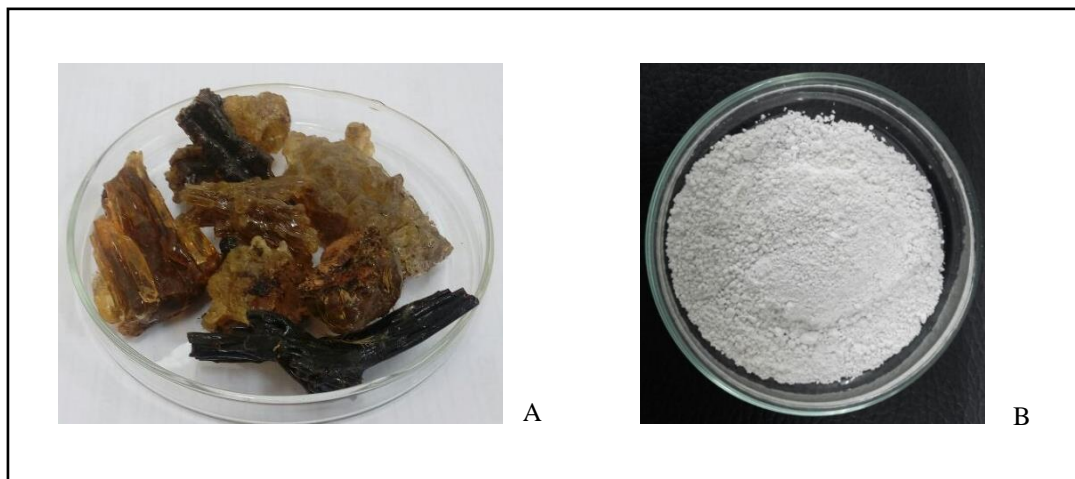
2.5.1 Goma do cajueiro

A goma do cajueiro (GC) (Figura 4) é um polissacarídeo obtido através dos exsudados da planta *Anacardium occidentale* Linn (família Anacardiaceae), facilmente encontrada em países tropicais como o Brasil, principalmente nas regiões norte e nordeste, em Estados como Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (BITTENCOURT et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016). No entanto, também pode ser encontrada na Índia, Moçambique, Tanzânia e Quênia, entre outros países. A composição dos polissacarídeos extraídos de fontes vegetais pode sofrer pequenas variações em função de fatores naturais, tais como: origem da planta, tipo de solo, clima, época do ano (DE PAULA; RODRIGUES, 1995; MOURA, 2009). Na análise da GC do Nordeste do Brasil, em estudo realizado por De Paula, Heatley, Budd (1998) a goma extraída de árvores dessa região foi caracterizada como um heteropolissacarídeo ácido, solúvel em água, contendo em sua composição: β -D-galactose (72-73%), α -D-glucose (11-14%),

arabinose (4-6,5%), ramnose (3,2-4%) e ácido glicurônico (4,7-6,3%) em porcentagem de massa. Assim, a GC do nordeste do Brasil é basicamente constituída de uma cadeia principal de galactose, com ramificação de galactose, tendo unidades de ramnose, ácido glicurônico e arabinose como grupos terminais (MOURA, 2009).

As gomas exsudadas, tais como a GC, são polissacarídeos produzidos pelas células epiteliais da planta (do tronco ou ramos da árvore) como resultado de mecanismos de proteção após lesão, quando o córtex é agredido por injúrias físicas ou ataque de patógenos (ANDRADE et al., 2013; CARVALHO et al., 2015).

Figura 4. Goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn)



(A) Goma do cajueiro bruta. (B) Goma do cajueiro isolada e purificada.

Fonte: Autoria própria.

As gomas polissacarídicas representam uma das matérias-primas industriais mais abundantes e têm sido objeto de intensa investigação devido à sua sustentabilidade, biodegradabilidade e biossegurança. Além disso, são preferidas em relação aos materiais sintéticos comparáveis devido à sua baixa toxicidade, custo reduzido e disponibilidade (RANA et al., 2011). Essas gomas encontram ampla aplicação em campos industriais como alimentação, cosmética e farmacêutica devido às suas propriedades reológicas, sendo utilizadas como agentes de ligação e de suspensão, materiais formadores de película, inibidores de cristalização, agentes espessantes, estabilizadores de emulsão e substâncias gelatinosas fracas (DE PAULA; RODRIGUES, 1995; SILVA et al., 2010).

A GC tem sido mencionada como uma possível alternativa para substituir a goma arábica na produção de cola líquida para papel, nas indústrias farmacêutica e cosmética, como

aglutinante para cápsulas e pílulas; na indústria alimentar, como estabilizador de sucos, cerveja e sorvetes, bem como para a clarificação de sucos (LIMA et al., 2002). Porto e Cristianini (2014) investigaram comparativamente as propriedades emulsionantes dessas gomas, tendo observado que a GC tem boas propriedades emulsionantes, quando comparada às emulsões de goma arábica, apresentando boa estabilidade, o que indica a GC como um ingrediente promissor a ser utilizado em emulsões de bebida.

Kumar, A. e colaboradores (2012) destacam que gomas naturais apresentam uma ampla variedade de composição e propriedades reológicas que não podem ser facilmente mimetizados por polímeros sintéticos, o que possibilita diversas aplicações biomédicas. Nesse contexto, a GC, enquanto polímero de ocorrência natural tem sido amplamente estudada para várias aplicações farmacêuticas, devido ao baixo custo, por não apresentar toxicidade, ser biodegradável, possuir características físico-químicas desejáveis, além de sua capacidade de produzir uma ampla gama de materiais que podem ser utilizados em sistemas de administração de fármacos (MONTEIRO et al., 2007; KUMAR et al., 2009).

Na área biomédica, a GC se destaca pelas suas atividades: antitumoral (MOTHÉ; DE SOUZA; CALAZANS, 2008), antimicrobiana (TORQUATO et al., 2004; CAMPOS et al., 2012), anti-inflamatória (YAMASSAKI et al., 2015), no tratamento tópico de feridas (SCHIRATO et al., 2006), efeito gastroprotetor (CARVALHO et al., 2015), entre outras. Na pesquisa de moléculas bioativas a serem empregadas como elementos de reconhecimento, a GC demonstrou excelente potencial de aplicação em dispositivos como sensores eletroquímicos formados por GC em conjunto com ftalocianinas para detecção de dopamina (ARAÚJO et al., 2012). Além disso, foi utilizada na produção de filmes em nanoescala compostos de GC e peptídeo antimicrobiano (dermaseptina 01), os quais demonstraram atividade antileishmania (BITTENCOURT et al., 2016).

Na área farmacêutica, a GC pode ser utilizada como agente gelificante na formulação tópica de acecofenaco (KUMAR et al., 2009), na concepção de comprimidos de liberação prolongada de fármacos solúveis e fracamente solúveis em água (OFORI-KWAKYE et al., 2016) e como aglutinante na formulação de comprimidos (GOWTHAMARAJAN et al., 2012).

Entretanto, existem algumas dificuldades associadas ao uso de gomas, tais como uma queda na viscosidade durante o armazenamento, descontrole de hidratação, solubilidade dependente de pH e a possibilidade de contaminação microbiana. A modificação química não só minimiza estas desvantagens, alterando as propriedades físico-químicas, como pode

ampliar o uso na veiculação de fármacos ao modificar as propriedades funcionais, tornando um biopolímero melhorado (RANA et al., 2011; RIMPY; ABHISHEK; AHUJA, 2017).

A carboximetilação de gomas naturais é uma das estratégias de modificação química mais aplicada devido à facilidade de processamento, demanda reduzida de equipamentos, baixo custo dos reagentes químicos empregados, alto rendimento e versatilidade do produto (KUMAR; AHUJA, 2012; SHARMA; RANA, 2017). Os derivados resultantes desse processo são geralmente polieletrólitos com melhor solubilidade aquosa, visto que a carboximetilação de polissacarídeos aumenta a hidrofiliabilidade (SILVA et al., 2004; RANA et al., 2011; KUMAR; AHUJA, 2012).

Dentre as modificações descritas na literatura para a GC, podem ser citadas além da carboximetilação (SILVA et al., 2004), a oxidação (CUNHA et al., 2007), a sulfatação (MOURA NETO et al., 2011) e a acetilação (PITOMBEIRA et al., 2015). Estratégias de modificação diversas de GC são úteis para melhorar suas propriedades tecnológicas e funcionais de modo a produzir complexos adequados para cada aplicação potencial, possibilitando, assim, ampliar a sua reatividade para formular mais facilmente micro e nanopartículas como sistemas de entrega de moléculas bioativas (RIBEIRO et al., 2016).

Tratando-se da utilização de GC modificada para formulação de nanopartículas com potencial para administração de fármacos, Silva e colaboradores (2010) sintetizaram nanopartículas à base de goma de cajueiro carboximetilada e quitosana, por complexação de polieletrólitos, enquanto que Pitombeira e colaboradores (2015), assim como, Dias e colaboradores (2016) sintetizaram nanopartículas à base de goma de cajueiro acetilada pelo método de diálise, para incorporação de anti-inflamatórios, indometacina e diclofenaco dietilamônio, respectivamente. No estudo desenvolvido por Moura (2009), a GC foi modificada pela reação do polissacarídeo com anidrido propiônico para a síntese de nanopartículas por diálise para incorporação de cloroquina, um fármaco utilizado no tratamento de malária, e comprovou que essa formulação apresenta potencial para ser utilizada como matriz na liberação de fármacos hidrofóbicos.

No presente trabalho, a carboximetilação foi a estratégia de modificação química aplicada na utilização da GC como matriz polimérica para síntese de nanopartículas, visando a incorporação do alcaloide EPI e a avaliação dessas nanoestruturas enquanto plataforma de entrega de bioativo com potencial atividade antileishmania.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antileishmania do alcaloide epiisopiloturina nas formas livre e nanoestruturada

3.2. Objetivos Específicos

- Formular nanopartículas a base de goma do cajueiro modificada para incorporação de epiisopiloturina;
- Caracterizar os sistemas nanoestruturados obtidos quanto ao diâmetro hidrodinâmico, polidispersibilidade e potencial zeta;
- Avaliar se a epiisopiloturina livre e nanoestruturada possuem atividade *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar a toxicidade do alcaloide livre e nanoestruturado em eritrócitos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do material

As amostras da espécie de *P. microphyllus* de origem nativa foram coletadas nos Territórios dos Cocais Piauienses com foco no município de Matias Olímpio no Estado do Piauí/ Brasil, por coletores cadastrados e capacitados para coleta sustentável do Jaborandi (Anidro do Brasil Extrações S.A – Vegeflora).

A exsicata foi identificada pela Dra. Ivanilza Moreira de Andrade do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Piauí e depositada no Herbário Graziella Barroso (Teresina, Piauí, Brasil), sob o registro de número 27.152.

4.2 Obtenção de farmoquímicos

A extração e obtenção industrial dos alcaloides a partir de resíduos produzidos pela extração de pilocarpina de folhas de *P. microphyllus* foram realizadas conforme descrito na patente do grupo depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual- INPI, sob número de registro - PI0904110-9 A2, número de protocolo- 121.

Para análise de controle de qualidade do processo foram utilizadas técnicas analíticas de alta precisão como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

4.3 Isolamento da goma do cajueiro

O exsudato do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn) foi coletado de árvores nativas de Ilha Grande, Piauí, Brasil. A GC foi purificada utilizando método descrito previamente (DE PAULA; HEATLEY; BUDD, 1998). O exsudato foi dissolvido em água (10% m/v), a solução obtida foi filtrada e o pH ajustado para 7,0 por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH). O polissacarídeo foi obtido por meio de precipitação em álcool etílico (proporção em volume 1:4). O precipitado foi lavado com acetona e seco sob fluxo de ar quente.

4.4 Carboximetilação da goma do cajueiro

O procedimento foi realizado seguindo o protocolo proposto por Silva e colaboradores (2004), com modificações. Dez gramas de goma do cajueiro foram suspensa em água (10 mL)

sob agitação vigorosa. Depois foram adicionados 5,4 mL de NaOH (10 M) e 5,4 g de ácido monocloracético, a mistura foi agitada por 3 horas a 55°C. O pH foi ajustado para 7 e realizada precipitação em etanol e acetona. Em seguida, o produto obtido foi seco sob fluxo de ar quente.

4.5 Preparação das nanopartículas a base de goma do cajueiro carboximetilada

As nanopartículas a base de goma do cajueiro carboximetilada (GCC) foram sintetizadas pela técnica de nanoprecipitação. Sob agitação magnética, o polímero foi dissolvido em água na concentração de 0,1% e a EPI foi dissolvida em acetona, com proporção massa:massa GCC: EPI (10:5). A solução de EPI e acetona foi transferida, por gotejamento, para a fase composta por GCC e água, sob agitação magnética. O solvente acetona foi removido utilizando evaporador (Concentrator plus– Eppendorf®). Em seguida, a solução resultante foi caracterizada. Procedimentos semelhantes foram realizados para a síntese de nanopartículas sem EPI.

Para avaliação da atividade biológica, nanopartículas a base de goma do cajueiro carboximetilada com e sem EPI foram sintetizadas por nanoprecipitação e concentradas por redução do volume da solução resultante, utilizando evaporador. A partir desses processos, foi obtida uma solução-mãe de NPs com EPI incorporada (2mg/mL de EPI) e outra solução-mãe de NPs sem EPI. Esses materiais foram, então, filtrados com um filtro de seringa de 0,45 µm.

4.6 Determinação de tamanho e potencial zeta

O tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão (*Polydispersity Index*-PDI) foram determinados pela técnica de análise de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS), com laser de comprimento de onda de 633 nm em um ângulo de dispersão fixo de 90° e o potencial zeta foi determinado pela mobilidade eletroforética das amostras utilizando equipamento Malvern Zetasizer Nano®, Modelo ZS 3600. As amostras foram medidas em triplicatas e descritas em média ± desvio padrão.

4.7 Quantificação da epiisopiloturina

A análise elementar foi realizada para quantificação da EPI, a partir do percentual elementar. Para determinação do percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio, utilizou-se o equipamento analisador elementar - Perkin Elmer[®] 2400. Seu funcionamento é baseado no método de Pregl-Dumas, em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector de condutividade térmica.

4.8 Avaliação da atividade antileishmania

4.8.1 Substâncias utilizadas

Dimetilsulfóxido (DMSO) 99% foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, meio RPMI, Soro Fetal Bovino (SFB), Resazurina (Azul Alamar[®]) e os antibióticos penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldriche Brasil). O fármaco Anfotericina B (Anf B 90%) foi adquirido da Cristália (São Paulo, SP).

A substância isolada (EPI) foi diluída em DMSO a uma concentração de 80 mg/mL (solução-mãe) para cada um dos experimentos. As soluções de nanopartículas (com e sem EPI incorporada) não passaram por este procedimento de diluição.

4.8.2 Parasitas

Foi utilizada cepa da espécie *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8) mantida no Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais (NPPM/UFPI). As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider's suplementado (10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e incubadas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 26°C (CARNEIRO et al, 2012).

4.8.3 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania sobre formas promastigotas

Para investigação da atividade antileishmania, utilizaram-se formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1 x

10^6 leishmanias por 100 μL de meio. Em seguida, as soluções de EPI e das nanopartículas foram adicionadas aos poços em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo as oito concentrações finais desejadas (100 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$).

As placas foram então incubadas em estufa B.O.D. a 26°C por 48 h e, 6 h antes do término deste período, foram adicionados 20 μL de resazurina 1×10^{-3} mol/L aos poços, quando se incubou novamente as placas. A leitura das mesmas foi realizada num leitor de placas de absorvância Biotek[®] (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, sendo os resultados expressos em termos de inibição do crescimento(%).

O controle positivo foi realizado com 2 $\mu\text{g/mL}$ de Anf B diluído em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço, enquanto que o controle de crescimento correspondeu ao meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço e, neste caso, a viabilidade considerada foi de 100% para o parasita. A leitura do branco, para cada concentração e para os controles foi realizada para descartar a absorvância resultante do próprio meio com interferência ou não dos compostos estudados (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

4.9 Toxicidade sobre eritrócitos

Eritrócitos humanos foram utilizados para análise da toxicidade das nanopartículas, assim como da EPI na sua forma livre. Este ensaio foi baseado em protocolo proposto por Marani e colaboradores (2015), com modificações. A amostra de sangue foi coletada de um voluntário sadio em tubo contendo o anticoagulante EDTA (1,8 mg/mL), centrifugada a 3000 rpm/min por 15 minutos para retirada do plasma, lavada três vezes e ressuspensa em solução salina estéril (0,85%), para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2,5% (v/v).

Para o preparo das amostras, 2 mg de EPI foram solubilizadas em 1 mL de solução salina com 1% DMSO. As soluções de nanopartículas, por sua vez, não passaram por este procedimento de diluição. A avaliação da atividade hemolítica foi realizada em triplicata em microtubos (tipo Eppendorf[®]). Foram adicionados 150 μL de solução salina em todos os microtubos, a partir da segunda fileira. Em seguida, 150 μL das soluções testes (NPs e EPI) foram transferidos para cada triplicata da primeira fileira, homogeneizados e realizadas diluições seriadas para os microtubos das fileiras subsequentes.

Após esse processo, 150 μL da suspensão de eritrócitos foram adicionados em todos os microtubos, atingindo as sete concentrações finais desejadas das amostras (1000 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$). Estes foram levemente homogeneizados e incubados na estufa a 37°C , por 30

minutos. Em seguida, centrifugados por um minuto a 5000 rpm. Posteriormente, retirou-se 150 µL do sobrenadante de cada microtubo para adição dessas alíquotas em placa de 96 poços. Como controle positivo foi utilizado o Triton X (0,01% v/v) e como controle negativo a salina (0,85%). A toxicidade dos sistemas nanoestruturados e da EPI livre foi então avaliada a partir dos dados de absorbância a 492 nm, utilizando leitor de placas (Bioeasy[®]). A análise foi realizada em triplicata e os dados expressos em percentual de hemólise, que foi calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ Hemólise} = [(Abs_A - Abs_{CN}) / (Abs_{CP} - Abs_{CN})] \times 100$$

Onde, Abs_A corresponde a absorbância da amostra; Abs_{CN} é absorbância do controle negativo, ou seja, as hemácias incubadas somente com solução salina e Abs_{CP} é a absorbância do controle positivo (hemácias incubadas com o TritonX).

4.10 Análise estatística

Os dados referentes à caracterização das nanopartículas foram expressos como média ± desvio padrão. As representações gráficas foram obtidas com o software OriginPro8[®].

Nos ensaios antileishmania, a concentração inibitória média (CI₅₀) com limite de confiança de 95% foi calculada utilizando regressão de probitos do programa SPSS[®] 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni, utilizando-se o programa *GraphPad Prism*[®] versão 5.0, tomando-se o valor de p<0,05 como nível de significância estatística.

Os resultados dos ensaios de atividade hemolítica foram exibidos como média ± erro padrão. A concentração hemolítica média (CH₅₀) com limite de confiança de 95% foi calculada utilizando regressão não linear do programa *GraphPad Prism*[®] versão 5.0. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo Teste de Tukey, por meio do programa *GraphPad Prism*[®] versão 5.0. A significância estatística aceita foi de um valor de p<0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

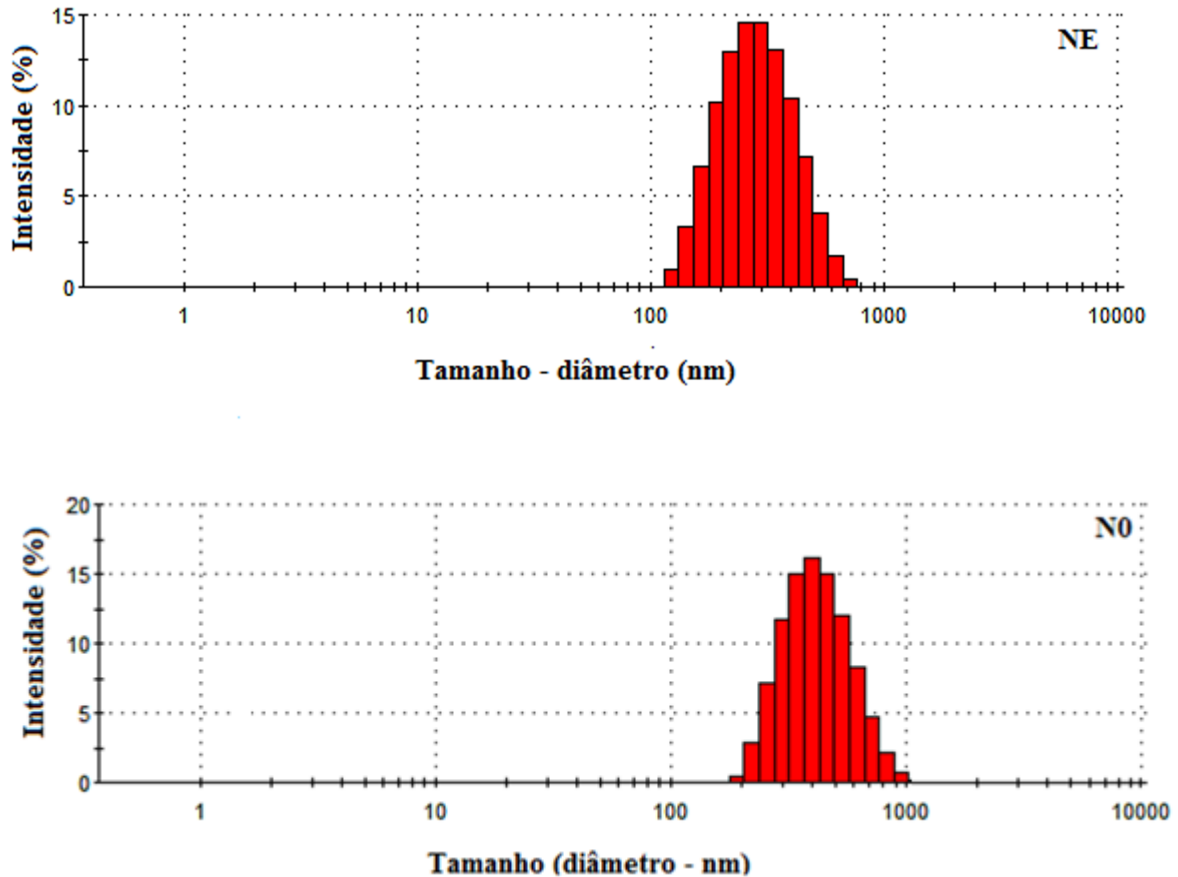
Com base em estudos anteriores realizados por nosso grupo e relatos da literatura, no presente trabalho realizamos a síntese de nanopartículas poliméricas e promovemos a encapsulação de EPI, utilizando o método de nanoprecipitação, para avaliação desta nanoestrutura como plataforma de entrega de bioativos para o tratamento de leishmaniose.

5.1 Caracterização das nanopartículas

A capacidade de nanopartículas atuarem de forma eficaz como um sistema de distribuição de ativos é influenciada pelo tamanho das partículas, carga superficial, modificação da superfície e hidrofobicidade. Entre estas características, o tamanho e sua distribuição são importantes para determinar sua interação com a membrana celular e a penetração do fármaco através das barreiras fisiológicas (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010). Por exemplo, partículas com tamanhos maiores que 1 μm são muito grandes para difundir passivamente através das membranas epiteliais; assim, normalmente, elas permanecem no local da administração, enquanto nanopartículas menores podem se difundir de modo mais eficiente (EL-NAGGAR et al., 2015).

A biodistribuição depende das propriedades físico-químicas das partículas, em especial o tamanho. Este fator determina o destino biológico, a toxicidade e a capacidade de direcionamento dos sistemas de entrega, além de poder influenciar o carregamento e a liberação de moléculas (SINGH; LILLARD, 2009). Desse modo, é importante conhecer o diâmetro das partículas e a sua distribuição. A análise do tamanho das nanopartículas sintetizadas no presente trabalho mostra que as mesmas apresentaram dimensões nanométricas e distribuição monodispersa (Figura 5). As nanopartículas com EPI incorporada (NE) apresentaram um tamanho médio de 265,2 nm; enquanto que aquelas sem incorporação do ativo (NO) apresentaram um tamanho médio de 423,3 nm (Tabela 2).

Figura 5. Distribuição de tamanho das nanopartículas poliméricas obtida por espalhamento dinâmico de luz: nanopartículas com epiisopiloturina incorporada (NE) e nanopartículas sem epiisopiloturina incorporada (N0).



Fonte: Autoria própria.

O índice de polidispersão (*Polydispersity Index* - PDI) é um parâmetro utilizado para avaliar a distribuição do tamanho, fornecendo informações sobre o grau de homogeneidade. As amostras com uma maior variedade de tamanho de partículas apresentam maiores valores de PDI, enquanto as amostras de tamanho uniforme apresentam um valor de PDI menor, que está relacionado com monodispersão e maior estabilidade (MASARUDIN et al., 2015). Todas as nanopartículas sintetizadas tiveram valores de PDI inferiores a 0,3 (Tabela 2), o que indica uniformidade de tamanho das partículas no sistema. Estes resultados são corroborados por estudos realizados por Pitombeira e colaboradores (2015) e Rodrigues (2016) que sintetizaram NPs poliméricas para incorporação de ativos com PDI equivalente ao do nosso estudo. Segundo Rao e Geckeler (2011), no método de síntese por nanoprecipitação, as nanopartículas geradas têm um tamanho bem definido, caracterizadas por uma estreita distribuição, são formadas mais rapidamente, favorecendo a uniformidade no tamanho das mesmas.

Tabela 2. Distribuição de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas poliméricas sintetizadas. Dados obtidos por espalhamento dinâmico de luz e análise de mobilidade eletroforética.

AMOSTRAS	Tamanho (nm)		^a PDI		^b ζ (mV)	
	Média	^c DP	Média	^c DP	Média	^c DP
NE	265,2 ^{**}	4,88	0,139	0,012	-23,8 [*]	6,57
N0	423,3	11,81	0,218	0,066	-18,4	4,83

^a PDI: índice de polidispersão

^b ζ: Potencial zeta

^c Desvio padrão

^{*} p<0,05 comparado com N0

^{**} p<0,01 comparado com N0

Fonte: Autoria própria

A partir dos resultados obtidos, pode ser verificado que o tamanho das nanopartículas foi afetado pela incorporação do alcaloide, onde as NPs carregadas com EPI (NE) apresentaram redução significativa ($p < 0,01$) de tamanho quando comparadas às NPs sem EPI (N0). Rodrigues (2016) também relata o fenômeno de redução do tamanho com incorporação do ativo quando nanoformulou EPI em um sistema utilizando matriz polimérica e sugere que essa redução ocorre devido à afinidade e interação entre as duas moléculas utilizadas na formulação.

O potencial zeta (PZ) pode ser determinado a partir da mobilidade das partículas carregadas sob um potencial elétrico. Esta mobilidade depende da carga superficial, de modo que os valores do PZ podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero ou do material utilizado para a modificação da superfície (SOPPIMATH et al., 2001; WANG et al., 2013). A análise de mobilidade eletroforética mostrou que as NPs apresentaram um PZ negativo e que as nanopartículas com EPI incorporada apresentaram mobilidade eletroforética, em módulo, significativamente superior ($p < 0,05$) às aquelas sem EPI, com potenciais zeta de -23,8 mV e -18,4 mV, respectivamente (Tabela 2). Partindo-se do pressuposto de que a mobilidade eletroforética das NPs é influenciada pela natureza química dos seus constituintes e do meio no qual estão dispersas, os grupos carboxila do polímero podem gerar cargas negativas na superfície das nanopartículas (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Os dados observados sugerem, portanto, que a presença da EPI (componente básico) favoreça a exposição de grupos ácidos oriundos da GCC na superfície das NPs sintetizadas.

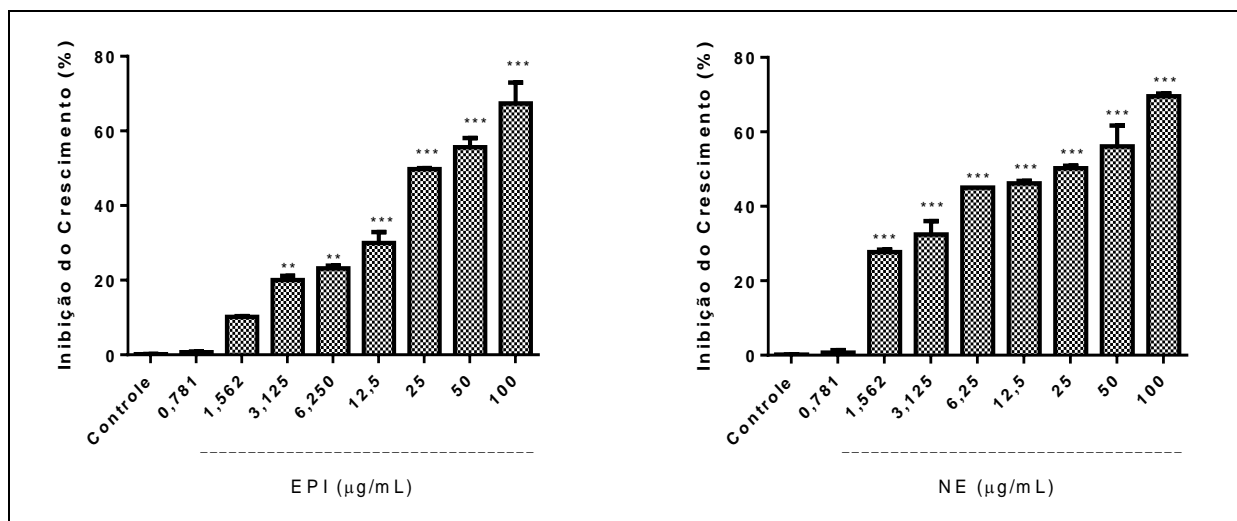
5.2 Ensaio da atividade antileishmania em formas promastigotas

Considerando-se que as possibilidades de compostos naturais como candidatos a fármacos são praticamente ilimitadas, torna-se necessário uma triagem inicial desses agentes, sendo os ensaios *in vitro* os primeiros passos para provar a eficácia e segurança das plantas medicinais para aplicação no tratamento da leishmaniose (SILVA, 2008; TIUMAN et al, 2011). Como o patógeno apresenta localização intracelular, alguns desafios são enfrentados no desenvolvimento de fármacos antileishmania, tais como: a sua capacidade de ser internalizado pelas células hospedeiras, a taxa de absorção, capacidade de resistência à degradação celular e a possibilidade de citotoxicidade para o hospedeiro. Dessa maneira, quando se realiza o rastreamento dessas moléculas, inicialmente, o teste é realizado em promastigotas extracelulares, o que é tecnicamente mais fácil, para posteriormente utilizar estas substâncias vegetais identificadas como biologicamente ativas contra formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*, tecnicamente mais dispendiosas (SEN; CHATTERJEE, 2011).

Neste sentido, para avaliação da atividade antileishmania de compostos naturais em formas promastigotas, os parasitas são expostos *in vitro* a diferentes concentrações dos compostos a serem testados e a taxa de inibição do crescimento após 48 ou 72 h é utilizada para avaliar a viabilidade da população de células, através de um método colorimétrico (SILVA, 2008; TIUMAN et al., 2011).

No presente estudo, o alcaloide EPI nanoestruturado, assim como sua forma livre demonstraram inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 6). Além destes, as NPs elaboradas com a GCC (polímero modificado utilizado na síntese da nanopartícula com ativo), também foram avaliadas quanto à atividade antileishmania. No entanto, NPs sintetizadas somente com GCC não apresentaram atividade contra o parasita. A AnfB levou à inibição do crescimento em cerca de 90% na concentração de 2 µg/mL.

Figura 6. Atividade antileishmaniana de epiisopiloturina na forma livre (EPI), epiisopiloturina nanoestruturada (NE) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8).



* $p < 0.05$ vs. controle, ** $p < 0.01$ vs. controle, *** $p < 0,001$ vs. controle.

Fonte: Autoria própria

A capacidade de inibição do crescimento do parasita foi dependente da concentração. Quando se compara a atividade da EPI nas formas livre e nanoestruturada nas concentrações de 1,562 µg/mL, 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL e 12,5 µg/mL, por exemplo, pode-se observar que o alcaloide nanoestruturado apresentou uma maior taxa de inibição do crescimento do parasita (Figura 6). As concentrações inibitórias médias (CI_{50}) obtidas foram: 32,8 µg/mL para EPI na forma livre e 20,3 µg/mL para nanopartículas de GCC com EPI incorporada. De acordo com estes resultados, portanto, a atividade inibitória da EPI nanoestruturada é mais acentuada que na forma livre, evidenciando que um sistema nanoparticulado como plataforma de entrega de bioativo pode favorecer a atividade do composto carregado.

Nessa mesma linha, Torres-Santos e colaboradores (1999), ao investigarem a inibição do crescimento intracelular de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* por 2', 6'-dihidroxi-4'-metoxialcona (isolada de *Piper aduncum*) notaram uma potencialização da citotoxicidade após o encapsulamento em nanopartículas poliméricas. Estas formulações quando administradas em camundongos Balb/C infectados também mostraram aumento da atividade antileishmaniana evidenciada por úlceras na pele significativamente menores e diminuição do número de parasitas nas lesões, em comparação ao composto isolado.

As micropartículas e os sistemas coloidais, como lipossomas e nanopartículas tem sido intensamente pesquisados por seu papel no controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, permitindo a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem

das substâncias (SCHAFFAZICK et al., 2003). Conseqüentemente, um sistema que tenha melhor biodisponibilidade e utilize um menor número de doses, pode favorecer a adesão do paciente ao tratamento e a eficácia do mesmo.

Investigações com a espécie *Leishmania donovani* (parasita relacionado à forma visceral de leishmaniose) também abordam o papel da nanoencapsulação de ativos para potencialização da atividade antiparasitária, tais como Want e colaboradores (2014) que observaram que o tratamento com NPs de artemisinina (princípio ativo de *Artemisia annua*) e PLGA, sintetizadas por nanoprecipitação, reduziu significativamente o número de amastigotas em modelo *in vitro* (macrófagos peritoneais de murinos), em comparação com artemisina isolada; além desses autores, Kumara e colaboradores (2014) verificaram melhora da eficácia e biodisponibilidade do fármaco sitamaquina em NPs poliméricas (PLGA-PEG), quando comparada à sua forma livre, pois além de inibição significativamente maior das formas amastigotas, a sitamaquina nanoencapsulada reduziu em três vezes mais o número de macrófagos infectados em modelo *in vivo*.

Em um estudo de revisão, Singh e colaboradores (2014) discutem amplamente sobre produtos naturais antileishmania, tendo listado mais de 200 produtos vegetais que mostraram atividade potencial e, dentre esses compostos relatados cerca de 100 são alcaloides, incluindo uma variedade química dos mesmos, tais como: indólicos, esteroidais, alcaloides de quinolina, isoquinólicos, benzilisoquinolinas, entre outros. No entanto, nessa revisão não foram relatados alcaloides imidazólicos.

Quanto aos estudos envolvendo alcaloides com ação antileishmania, Moraes e colaboradores (2015) estudaram a atividade do alcaloide filantidina (grupo Securinega) da planta *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae) em formas promastigotas de *L. amazonensis* e também observaram uma redução dose-dependente no crescimento. No entanto, a CI_{50} obtida de 82,37 µg/mL foi cerca de quatro vezes superior à formulação obtida no nosso estudo.

No que se refere aos possíveis mecanismos de ação de alcaloides com atividade relatada em formas promastigotas, Guimarães e colaboradores (2010) estudaram a atividade da julocrotina, um alcaloide de glutarimida isolado de *Croton pullei* (Euphorbiaceae) em *L. amazonensis* verificando que o mesmo causou alterações morfológicas no parasita, como inchaço da mitocôndria, condensação de cromatina, presença de estruturas membranosas perto do Complexo de Golgi e corpos vesiculares no flagelo. Medina e colaboradores (2012) investigaram os efeitos do glicoalcaloide tomatidina (*Lycopersicon esculentum*) nas mitocôndrias, metabolismo de esterol, no crescimento e estrutura de promastigotas de *L. amazonensis* e verificaram uma inibição dose-dependente do crescimento do parasita

($CI_{50}=124 \pm 59$ nM), mudanças estruturais nas mitocôndrias acompanhadas por uma perda efetiva de potencial de membrana mitocondrial e uma diminuição dos níveis de ATP, além da presença de vacúolos grandes e inibição de enzimas responsáveis pela produção de esteróis. Chowdhury e colaboradores (2017) ao avaliarem as alterações morfológicas provocadas pelo alcaloide indólico Voacamine (isolado de *Tabernaemontana coronaria*) em cepas de *Leishmania amazonensis* relatam que: ocorreram alterações nucleares com ruptura da membrana nuclear e modificações na organização da cromatina, a formação de autofagossomas bastante evidente começou em torno da região mitocondrial do citoplasma e destacam que houve inchaço mitocondrial seguido de ruptura da membrana. Com bases nesses estudos, sugere-se, portanto, que o possível mecanismo de ação envolvido na inibição do crescimento causada por alcaloides em formas promastigotas de *L. amazonensis* está relacionado às alterações mitocondriais.

O potencial dos sistemas de entrega com base na liberação controlada de moléculas, especialmente NPs podem ser úteis no tratamento de algumas doenças que envolvem a atividade de macrófagos, pois além de fagocitarem o parasita podem remover substâncias da circulação, reconhecendo ligantes específicos na superfície das mesmas. Os lipossomas e as nanopartículas têm mostrado um grande potencial para melhorar a eficácia e tolerabilidade de compostos antileishmaniais, tais como Anf B veiculada em lipossomas (TIUMAN et al., 2011). No relato de novas estratégias para tratamento de leishmaniose Jain e Jain (2013) abordam que transportadores como nanopartículas e lipossomas são naturalmente internalizados pelos macrófagos por fagocitose e, portanto, podem entregar o fármaco passivamente para o local alvo. Segundo Date, Josh e Patavele (2017), partindo do pressuposto de que a resposta farmacodinâmica dos fármacos é influenciada pela concentração alcançada no microambiente do parasita intracelular e não na circulação do hospedeiro, o principal objetivo dos sistemas de administração de fármacos deve ser modular as suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, a fim de melhorar a sua especificidade, levando assim à redução dos efeitos adversos associados.

No que tange a pesquisas sobre o desenvolvimento de nanoestruturas para avaliação da atividade antileishmania, Bhattacharya e colaboradores (2016) investigaram a susceptibilidade *in vitro* de formas amastigotas de *L. donovani* a nanopartículas de hidroxipropil- β -ciclodextrina carregada com piperolactama, uma molécula isolada do alcaloide aristolactama (*Piper betle*), em amastigotas axênicas e amastigotas internalizadas em macrófagos. No entanto, não foram encontrados na literatura relatos de estudos de atividade em formas promastigotas e amastigotas que envolvam nanopartículas sintetizadas para a incorporação de

alcaloides imidazólicos, o que reforça a importância e o pioneirismo do nosso trabalho e evidencia a necessidade de investigações futuras acerca da atividade antileishmania sobre formas amastigotas e da citotoxicidade sobre macrófagos.

Considerando-se que a GCC foi utilizada como matriz polimérica na síntese das NPs com EPI incorporada, investigou-se a atividade desse polissacarídeo na forma nanoestruturada, sendo observado que as NPs sem incorporação do ativo (N0) não apresentaram potencial sobre as formas promastigotas. Levando-se ainda em conta o fato de que a concentração do polímero é a mesma nas NPs sintetizadas com EPI e nas NPs sintetizadas sem EPI, e estas não apresentaram potencial antileishmania, isso sugere que a atividade biológica está relacionada ao alcaloide e não ao polímero utilizado.

Desse modo, a epiisopiloturina nas formas livre e nanoestruturada apresentou potencial citotóxico sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* avaliadas, ressaltando-se que a nanoestruturação do alcaloide em uma matriz polimérica de goma do cajueiro modificada potencializou a atividade antileishmania.

5.3 Toxicidade sobre eritrócitos

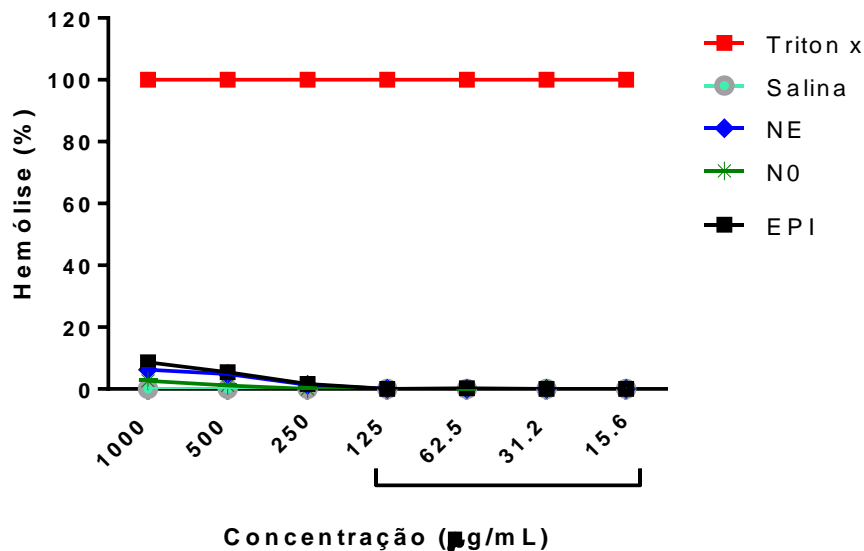
A atividade hemolítica pode ser utilizada como *screening* de citotoxicidade *in vitro*, como medida simples e de confiança para a estimativa do efeito na membrana das hemácias, causado pelas formulações testadas (SHARMA; SHARMA, 2001; JOSHI et al., 2008). A biocompatibilidade, portanto, pode ser determinada pelo estudo de hemocompatibilidade baseado na determinação da lise de eritrócitos, a qual resulta na liberação de hemoglobina que fica dissolvida nos fluídos externos, possibilitando a avaliação deste dano celular (SHAW et al., 2015).

Mattiazi (2014) destaca que os sistemas baseados em nanotecnologia e biomateriais devem ser submetidos à avaliação da atividade hemolítica com a finalidade de estimar a compatibilidade com o sangue, visto que este teste pode refletir adequadamente alguns efeitos biológicos das nanopartículas. Neste sentido, procedeu-se à investigação dos nanoestruturados (N0 e NE) e da EPI na sua forma livre.

A investigação da citotoxicidade da EPI e das NE nas concentrações ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7) revelou excelente biocompatibilidade com eritrócitos, evidenciando que esses compostos não apresentam atividade hemolítica nas concentrações em que a atividade antileishmania foi observada, o que mostra que além de eficazes em sua ação antiparasitária,

são seguros. Nas concentrações $> 125 \mu\text{g/mL}$ foi observada uma atividade hemolítica reduzida, que se mostrou com valores inferiores a 20%.

Figura 7. Ensaio de biocompatibilidade em eritrócitos humanos: atividade hemolítica de nanopartículas poliméricas (NE, N0) e epiisopiloturina (EPI) em diferentes concentrações, incubadas com uma suspensão de eritrócitos a 2,5% por 30 min. Solução salina (0,85%) foi utilizada como controle positivo e TritonX (0,1%v/v) como controle negativo. Resultados representam média \pm erro padrão.



Fonte: Autoria própria

A hemólise, como expressão de citotoxicidade induzida pelas amostras avaliadas, revelou que as mesmas apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) em sua atividade, quando comparados ao controle positivo (TritonX). Além disso, não foi possível determinar, com as concentrações testadas, a concentração hemolítica média (CH_{50}) das amostras avaliadas, o que evidencia a baixa toxicidade das mesmas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As NPs com GCC, sintetizadas por nanoprecipitação, com e sem a incorporação do alcaloide EPI apresentaram dimensões nanométricas e distribuição monodispersa; sendo que as NPs carregadas com EPI apresentaram tamanho significativamente menor quando comparadas às NPs sem EPI;
- As NPs sintetizadas apresentaram um PZ negativo e a partir dos resultados obtidos sugere-se que a nanoestruturação da EPI em matriz polimérica favoreceu a exposição de grupos ácidos oriundos da GCC na superfície das NPs sintetizadas;
- EPI e NE apresentaram atividade *in vitro* contra formas promastigotas *Leishmania amazonensis*;
- A nanoestruturação do alcaloide em uma matriz polimérica de goma do cajueiro modificada potencializou a sua atividade antileishmania; evidenciando, portanto, que um sistema nanoparticulado como plataforma de entrega de bioativo pode favorecer a atividade do composto carregado;
- NO não apresentaram atividade contra o parasita, o que sugere que a atividade antileishmania observada para NPs com o ativo está relacionada ao alcaloide incorporado e não ao polímero modificado utilizado para a síntese das NPs;
- EPI e NE nas concentrações ≤ 125 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram excelente biocompatibilidade com eritrócitos humanos. A EPI nanoestruturada, portanto, mostrou-se biocompatível para eritrócitos humanos, nas concentrações em que a atividade antileishmania foi observada, evidenciando a formação de um biomaterial seguro em termos de citotoxicidade sobre células de mamíferos, com potencial aplicação em leishmaniose.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar a atividade antileishmania de EPI, livre e nanoestruturada em matriz polimérica (goma do cajueiro modificada), sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e o potencial citotóxico sobre macrófagos;
- Caracterizar os sistemas nanoestruturados obtidos por Microscopia de Força Atômica e Análise de Rastreamento de Partículas.

REFERÊNCIAS

- ABAMOR, E. S. Antileishmanial activities of caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles against *Leishmania infantum* promastigotes and amastigotes *in vitro*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 25-34, 2017.
- ABREU, F. O. M. S. et al. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1277–1282, 2012.
- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. **Cartilha sobre Nanotecnologia**. Brasília/DF, 58 p., 2010.
- AGUIRRE-CHAGALA, Y. E. et al. Physicochemical properties of polycaprolactone/collagen/elastin nanofibers fabricated by electrospinning. **Materials Science and Engineering**, v. 76, p. 897–907, 2017.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: a review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86-90, 2017.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Investigation of antileishmanial activities of Tio₂@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 55–63, 2013.
- ALMEIDA, A. C. S. et al. Aplicação de nanotecnologia em embalagens de alimentos. **Polímeros**, v. 25, p. 89-97, 2015.
- ANDRADE, K. C. S. et al. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*): avaliação das modificações químicas e físicas por extrusão termoplástica. **Polímeros**, vol.23, n.5, p.667-671, 2013.
- ARAUJO, I. M. S. et al. Contribution of the cashew gum (*Anacardium occidentale* L.) for development of layer-by-layer films with potential application in nanobiomedical devices. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 32, n. 6, p. 1588-1593, 2012.
- ASHANI, H. R.; PARIKH, S. P.; MARKNA, J. H. Role of nanotechnology in concrete a cement based material: a critical review on mechanical properties and environmental impact. **International Journal of Nanoscience and Nanoengineering**, v. 2, n. 5, p. 32, 2015.
- ASHOK, P.; LATHIYA, H.; MURUGESAN, S. Manzamine alkaloids as antileishmanial agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 928-936, 2015.
- AZEVEDO, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína**: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas. 2005.117f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Físico-química, Universidades Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BARBOSA, T. P. et al. Design, synthesis and antileishmanial *in vitro* activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4250–4256, 2011.

BHATTACHARYA, P. et al. *In vitro* susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes to piperolactam: a loaded hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles. **Acta Tropica**, v. 158, p. 97-106, 2016.

BITTENCOURT, C. R. et al. Immobilization of cationic antimicrobial peptides and natural cashew gum in nanosheet systems for the investigation of anti-leishmanial activity. **Materials Science and Engineering**, v. 59, p. 549-555, 2016.

BORGHI, S. M. et al. *Leishmania (L). amazonensis* induces hyperalgesia in balb/c mice: Contribution of endogenous spinal cord TNF α and NF κ B activation. **Chemico-biological interactions**, v. 268, p. 1-12, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 1ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.189 p. ISBN 978-85-334-2474-6. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.120 p. ISBN 978-85-334-0742-8. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_1edicao.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2018.

CALDEIRA, L. R. et al. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: a new approach for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 125–131, 2015.

CAMPOS, D. A. et al. Study of antimicrobial activity and atomic force microscopy imaging of the action mechanism of cashew tree gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 270–274, 2012.

CARNEIRO, S. M. P. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.

CARVALHO, N. S. et al. Gastroprotective properties of cashew gum, a complex heteropolysaccharide of *Anacardium occidentale*, in naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Drug development research**, v. 76, n. 3, p. 143-151, 2015.

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

CHOWDHURY, S. R. et al. Voacamine alters *Leishmania* ultrastructure and kills parasite by poisoning unusual bi-subunit topoisomerase IB. **Biochemical pharmacology**, v. 138, p. 19-30, 2017.

CUNHA, A. C. et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extracts obtained from different organs of *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v. 19, p. 413-417, 2012.

CUNHA, P. L. R. **Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em osteoartrite**. 2006.169f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

CUNHA, P. L. R. et al. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the brazilian chemical society**, v.18, n.1, p.85-92, 2007.

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

DE CARVALHO, R. F. et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, p. 217-222, 2013.

DE PAULA, R. C. M.; HEATLEY, F.; BUDD, P. M. Characterization of *Anacardium occidentale* exudate polysaccharide. **Polymer international**, v. 45, p. 27-35, 1998.

DE PAULA, R. C. M.; RODRIGUES, J.F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 177-181, 1995.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DIAS, S. F. L et al. Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, v. 143, p. 254-261, 2016.

DOS SANTOS, R. A. N. et al. Leishmanicidal effect of *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae) and its isolated alkaloid skimmianine occurs by a nitric oxide dependent mechanism. **Parasitology**, v. 138, n. 10, p. 1224-1233, 2011.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EL-NAGGAR, M. E. et al. Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 718-729, 2015.

ERRICO, C. et al. Poly(hydroxyalkanoates) based polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-10, 2009.

FALCI, D. R. **Toxicidade de Anfotericina B em diferentes formulações**. 2015. 95f. Tese (Doutorado em Patologia), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), 2015.

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

FERREIRA, C. et al. Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Guatteria latifolia*. **Experimental parasitology**, v. 172, p. 51-60, 2017.

FERREIRA, I. C. P. et al. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FRACETO, L. F. et al. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have?. **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, p. 20, 2016.

GALINDO-RODRIGUEZ, S. et al. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 8, p. 1428-1439, 2004.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GOWTHAMARAJAN, K. et al. Development of buccal tablets for curcumin using *Anacardium occidentale* gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1177-1183, fev. 2012.

GUIMARÃES, L. R. C. et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1075-1081, 2010.

GUIMARÃES, M. A. **Avaliação terapêutica *in vivo* dos alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina extraídos de *Pilocarpus microphyllus* para esquistossomose**. 2018. 123p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Piauí.

GUIMARÃES, M. A. et al. Anthelmintic activity *in vivo* of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.

GUIMARÃES, M. A. et al. Nanopharmaceutical approach of epiisopiloturine alkaloid carried in liposome system: preparation and *in vitro* schistosomicidal activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 13, p. 1–10, 2013.

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: an update. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, 2017.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 6, p. 319–327, 2002.

- HASSANI, L. N.; HENDRA, F.; BOUCHEMAL, K. Auto-associative amphiphilic polysaccharides as drug delivery systems. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 11, p. 608-614, 2012.
- HORNIG, S.; BUNJES, H.; HEINZE, T. Preparation and characterization of nanoparticles based on dextran–drug conjugates. **Journal of colloid and interface science**, v. 338, n. 1, p. 56-62, 2009.
- JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23/24, p. 1272-1281, 2013.
- JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896-1904, 2013.
- JOSHI, M. et al. Design and *in vivo* pharmacodynamic evaluation of nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of artemether: nanoject. **International journal of pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 119-126, 2008.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature reviews microbiology**, v. 9, p. 604-615, ago. 2011.
- KUMAR, A. et. al. Cashew gum a versatile hydrophilic polymer: a review. **Current Drug therapy**, v. 7, n. 1, p. 2-12, mar. 2012.
- KUMAR, A.; AHUJA, M. Carboxymethyl gum kondagogu: synthesis, characterization and evaluation as mucoadhesive polymer. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 1, p. 637-643, 2012.
- KUMAR, B. S. et al. Pullulan acetate nanoparticles based delivery system for hydrophobic drug. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 1, p. 24-32, 2012.
- KUMAR, R. et al. Evaluation of *Anacardium occidentale* gum as gelling agent in aceclofenac Gel. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 695-704, 2009.
- KUMARA, R. et al. PLGA-PEG Encapsulated sitamaquine nanoparticles drug delivery system against *Leishmania donovani*. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 1, p. 85-90, 2014.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1-18, 2010.
- LALA, S. et al. Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems. **Journal of Drug Targeting**, v. 12, n. 3, p. 165-175, 2004.
- LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J.R. Bioadhesive-based dosage forms: the next Generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.
- LEZAMA-DÁVILA, C. M. et al. A new antileishmanial preparation of combined solamargine and solasonine heals cutaneous leishmaniasis through different immunochemical pathways. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2732-2738, 2016.

LIMA, D. F. et al. Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

LIMA, L. I. de. Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral. 2016. 61f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)- Universidade de Brasília (UnB), Brasília.

LIMA, R. S. N. et al. Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 35, n. 1, p 45-53, 2002.

LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, v.3, p. 69-77, 2012.

LIU, Z. et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650-1662, 2008.

MACIEL, J. S. et al. Reacetylated chitosan/cashew gum gel: preliminary study for potential utilization as drug release matrix. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, p. 326 –334, 2006.

MARANI, M. M. et al. Characterization and biological activities of ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 7, p. 1495-1504, 2015.

MASARUDIN, M. J. et al. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [¹⁴C]-doxorubicin. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p.67-80, 2015.

MATTIAZZI, J. et al. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base de óleo de pracaxi contendo ubiquinona**. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

MEDINA, J. M. et al. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, v. 139, p. 1253-1265, 2012.

MENEZES, J. P. B. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MISHRA, B. B. et al. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90, 2009.

MIURA, L. M. C. V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Piauí.

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

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONTEIRO, F. M. F. et al. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 884–888, 2007.

MORA- HUERTAS, M. C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 385, n. 1, p. 113-142, 2010.

MORAES, L. S. et al. Leishmanicidal activity of (+)-Phyllanthidine and the phytochemical profile of *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae). **Molecules**, v. 20, p. 22157–22169, 2015.

MOTHÉ, C. G.; DE SOUZA, I. A.; CALAZANS, G. M. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 19, n. 6, p. 50-52, 2008.

MOURA NETO, E. D. et al. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.10, p.1953-1960, 2011.

MOURA, R. E. **Síntese de nanopartículas à base de goma do cajueiro para aplicação em sistemas de liberação de fármacos**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

NAMAZI, H.; FATHI, F.; HEYDARI, A. Nanoparticles based on modified polysaccharides. In: HASHIM, A. A. (Ed). **The Delivery of Nanoparticles**. China: INTECH, 2012, p. 149-184.

NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric nanoparticles of brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, 301, 2016.

ODONNE, G. et al. Treating leishmaniasis in Amazonia: a review of ethnomedicinal concepts and pharmaco-chemical analysis of traditional treatments to inspire modern phytotherapies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 199, p. 211-230, 2017.

OFORI-KWAKYE, K. et al. Development and evaluation of natural gum-based extended release matrix tablets of two model drugs of different water solubilities by direct compression. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, p. 82–91, 2016.

OLIVEIRA, F. F. A. et al. Defeating bacterial resistance and preventing mammalian cells toxicity through rational design of antibiotic-functionalized nanoparticles. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 7, n. 1, 2017.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

- PANDEY, A. et al. Nanoscience and their biological importance: human health and disease. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 3, n. 3, p. 141-146, 2008.
- PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 3, p. 329-347, 2003.
- PASSERO, L. F. D. et al. Plants used in traditional medicine: extracts and secondary metabolites exhibiting antileishmanial activity. **Current clinical pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 187-204, 2014.
- PAULA, H. C. B. et al. Protective effect of cashew gum nanoparticles on natural larvicide from *Moringa oleifera* Seeds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, p. 1778–1784, 2012.
- PELAZ, B. et al. Diverse applications of nanomedicine. **American Chemical Society**, v. 11, p. 2313-2381, 2017.
- PHAM, T. T. H.; LOISEAU, P. M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **International journal of pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 539-552, 2013.
- PICKUP, J. C. et al. Nanomedicine and its potential in diabetes research and practice. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 24, p. 604-610, 2008.
- PITOMBEIRA, N. A. O. et al. Self-assembled nanoparticles of acetylated cashew gum: Characterization and evaluation as potential drug carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 610-615, 2015.
- PORTO, B. C.; CRISTIANINI, M. Evaluation of cashew tree gum (*Anacardium occidentale* L.) emulsifying properties. **Food Science and Technology**, v. 59, p. 1325-1331, 2014.
- RAKI, R. et al. Cement and concret science and nanotechnology. **Materials**, v. 3, p. 918-942, 2010.
- RANA, V. et al. Modified gums: Approaches and applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1031–1047, 2011.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.
- REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: a narrative review article. **Veterinary Research Forum**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.
- RIBEIRO, A. J. et al. Gums' based delivery systems: review on cashew gum and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 188-200, 2016.
- RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 60–68, 2014.

RIMPY; ABHISHEK; AHUJA, M. Evaluation of carboxymethyl gum as nanometric carrier. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 896-903, 2017.

ROCHA, J. A. et al. Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 624–630, 2017.

ROCHMAN, N. T. Analysis of Indonesian agroindustry competitiveness in nanotechnology development perspective using SWOT-AHP method. **International Journal of Business and Management**, v. 6, n. 8, p. 235-244, 2011.

RODRIGUES, J. A. **Obtenção de nanopartículas poliméricas a base da goma do cajueiro acetilada para incorporação de epiisopiloturina**. 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Piauí.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design: a review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 85-99, 2014.

SALAMA, I.S; ARRAIS-SILVA, C.; ARRAIS-LIMA, W. W. Evaluation of boldine activity against intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **The Korean journal of parasitology**, v. 55, n. 3, p. 337, 2017.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIRATO, G. V. et al. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 1, p. 149-154, 2006.

SCHMIDT, T. J et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - Part II. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2176-2228, 2012.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 1056-1069, 2011.

SEVERINO, P. et al. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361-368, 2011.

SHAH, N. A.; KHAN, M. R.; NADHMAN, A. Antileishmanial, toxicity and phytochemical evaluation of medicinal plants collected from Pakistan. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

SHAO, S.; ZHOU, T.; TSAO, R. Antimicrobials from plants – Food preservation and shelf-life extension. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. Canadá: Elsevier, 2011, p. 645-658.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes—by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SHARMA, R.; RANA, V. Effect of carboxymethylation on rheological and drug release characteristics of *Terminalia catappa* gum. **Carbohydrate polymers**, v. 175, p. 728-738, 2017.

SHAW, G. S. et al. Development and characterization of gelatin-tamarind gum/carboxymethyl tamarind gum based phase-separated hydrogels: A comparative study. **Designed Monomers and Polymers**, v. 18, n. 5, p. 434-450, 2015.

SILVA, D. A. et al. Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 163–171, 2004.

SILVA, D.G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA, T.M. et al. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization - Structural characteristics, stability and recovery. **Materials Science and Engineerin**, v. 30, p. 526-530, 2010.

SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of episopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SILVA, V. P. A. et al. Biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite. **Eclética Química**, v. 36, n. 2, 2011.

SIMÕES, F. R.; TAKEDA, H. S. Conceitos e princípios básicos. In: DA RÓZ, A. L.; LEITE, F. L.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. (Org.). **Nanoestruturas: Princípios e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 3-37, 2015.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 18–45, 2014.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and molecular pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 19-38, 2001.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. **Progress in Polykmer Science**, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, 2011.

SKORUPA, L. A. Espécies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 59-70, 2000.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, n. 2. p. 135-139, 2007.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

STEFANELLO, T. F. et al. N-butyl-[1-(4-methoxy) phenyl-9H- β -carboline]-3-carboxamide prevents cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112–7120, dez. 2014.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 4267-4277, 2010.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis: current therapeutic modalities. **Indian J. Med. Res.** 123, p. 345–352, 2006.

TAIZ, Z.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, Z.; ZEIGER, E. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013, p. 369-398.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525–532, 2011.

TIWARI, N. et al. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 18, n. 1, p. 26-41, 2018.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. **Acta tropica**, v. 174, p. 64-71, 2017.

TORQUATO, D. S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 505-507, 2004.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly (d, l-lactide) nanoparticles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1776-1778, 1999.

VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4. p. 357-363, 2011.

VASIR, J. K.; TAMBWEKAR, K.; GARG, S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 225, n. 1-2, p. 13-32, abr. 2003.

VERAS, L. M. C. et al. Industrial scale isolation, structural and spectroscopic characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf leaves: A promising alkaloid against Schistosomiasis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

VERAS, L.M. et al. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2051-2058, 2012.

WANG, J. et al. Advances in nano-scaled biosensors for biomedical applications. **Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4427-4435, 2013.

WANT, M. Y. et al. A new approach for the delivery of artemisin: formulation, characterization, and *ex-vivo* antileishmanial studies. **Jornaul of colloid and interface science**, v.432, p. 258-269, 2014.

WICKI, A. et al. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138-157, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record/ Relevé épidémiologique hebdomadaire**. Genebra, n. 38, 2017, p. 557–572. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258973/1/WER9238.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases**: third WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, 2015. 211p.

YAMASSAKI, F. T. et al. Effect of the native polysaccharide of cashew-nut tree gum exudate on murine peritoneal macrophage modulatory activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, p. 241-248, 2015.