



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



LIA RAQUEL MOURA SILVA

**ÁCIDO ELÁGICO MODIFICADO POR NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE MAGNÉSIO: SÍNTESE DE MATERIAL
HÍBRIDO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTILEISHMANIA**

TERESINA

2016

LIA RAQUEL MOURA SILVA

**ÁCIDO ELÁGICO MODIFICADO POR NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE MAGNÉSIO: SÍNTESE DE MATERIAL
HÍBRIDO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTILEISHMANIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Inorgânica).

Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva

Orientador

TERESINA

2016

LIA RAQUEL MOURA SILVA

**ÁCIDO ELÁGICO MODIFICADO POR NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO
DE MAGNÉSIO: SÍNTESE DE MATERIAL HÍBRIDO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA
E ANTILEISHMANIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Química Inorgânica).

Aprovada em: 08/07/2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva
Universidade Federal do Piauí
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura
Universidade Federal do Piauí
(Membro Titular)

Profa. Dra. Marciela Scarpellini
Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Membro Externo)

Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e amigos (LAS), em especial, ao meu orientador Dr. Welter Cantanhêde por todos os incentivos e carinho, durante esta jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, base de tudo na minha vida, minha proteção, minha fortaleza, meu guia, graças a ele tive a força espiritual para chegar aonde cheguei. Sei que tudo posso com ele e continuarei perseguindo tudo que ele escolheu para mim;
- ❖ A Maria Santíssima, intercessora e protetora, sempre passando à frente de todos os desafios que me foram propostos pelo caminho;
- ❖ Meus Pais (Cruz e Raimundo), pelo apoio, compreensão e paciência. Obrigada pelo amor incondicional e por se esforçarem para fazer-me feliz a cada dia, e não medirem esforços para que eu sempre alcançasse meus objetivos. Vocês sempre serão meus exemplos de determinação, dedicação, carinho e amor. Por vocês tentarei fazer o meu melhor sempre;
- ❖ Meu irmão Danilo pelas chatices de sempre, mas principalmente pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões, e neste momento não foi diferente;
- ❖ Meus tios, primos, afilhadas e avô, pelas alegrias diárias, pelo carinho, cuidado, apoio e compreensão pelas muitas vezes que deixei de me fazer presente;
- ❖ Aos meus tios (Lucineide e David), que são como meus pais, sempre me incentivando para alcançar voos maiores e que fazem de tudo para me verem feliz;
- ❖ A minha querida tia Ivete, desde sempre auxiliando muito mais do podia para que seus sobrinhos crescessem. Graças a você tive um refúgio em Teresina e a oportunidade de construir laços familiares mais fortes com meus primos Lucas, Larissa, Suzane, João Filho e meu irmão Danilo, os eternos membros da “Casinha”;
- ❖ Aos jovens do EJC, que mesmo em tão pouco tempo de convivência me proporcionaram fazer coisas que antes achava ser incapaz, me deram força, coragem e incentivo para obter um crescimento pessoal sem igual. E a jornada está só começando!;
- ❖ Ao meu querido orientador professor Dr. Welter Cantanhêde por todo carinho, incentivo, apoio, confiança e por ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa me proporcionando à oportunidade de crescer profissionalmente;

- ❖ Aos integrantes do Laboratório de Automontagem Supramolecular – LAS (Aurileide, Tayna, Katharinne, Caio, Lizia, Thayllan, Samuel, Elízio, Stefanne, Angélica, Wallonilson, Nielson e Anderson) e aos ex-integrantes (Lourdes, Anna Thaise, Albert, Roberto e Luciano) e aos agregados do LAS (Mikael e Thomas) pela amizade, incentivo, força, carinho, parceria e pelas valiosas trocas de conhecimento durante esta jornada. Vocês são o que há de mais valioso no mundo, são amigos pra toda vida, fazemos parte de uma família. Família LAS;
- ❖ Ao meu amado IC Thayllan e ao meu querido doutorando Wallonilson que trabalharam diretamente comigo. Obrigada pela disposição, boa vontade, paciência e zelo. Vocês foram meu suporte para encarar todos os obstáculos. E que não foram poucos, hein? Pense em uma pesquisa que nos deu trabalho! No entanto, cada obstáculo vencido foi uma vitória sem igual e nos uniu mais e mais e o que nós conquistamos não será apagado tão fácil. Muito Obrigada!;
- ❖ Ao pessoal da minha turma 2014.1 por todo incentivo, apoio e pelas trocas de informações;
- ❖ Ao Laboratório de Produtos Naturais (LPN) – UFPI, por fornecer o ácido elágico, um dos precursores da pesquisa. Em especial a Profa. Dra. Mariana Helena Chaves por toda colaboração e dedicação que precisei durante todo período;
- ❖ Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho pela colaboração e por toda ajuda para que a pesquisa desse certo;
- ❖ Ao Laboratório de Atividade Antileishmania (LAA) – UFPI, em especial Michel pelo acolhimento, auxílio em todos os testes necessários e por toda troca de conhecimentos – Muito Obrigada pela paciência que tiveste para me explicar tudo várias e várias vezes até entender;
- ❖ Ao Laboratório de Materiais (LABMAT) – IFPI, pela colaboração para realização de análises, como: DRX, FTIR e TG; Em especial, Marcos Resende, Jairo Rufino, Wenner Sousa e Douglas Sousa por todo auxílio e disponibilidade para realização destas;
- ❖ Ao Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias (GERATEC) – UESPI, nas pessoas do Prof. Dr. José Luiz Silva Sá e do técnico Tomas Magno pela colaboração na realização das análises de TG;

- ❖ Ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) – UFPI, pela cooperação e assistência nas análises de MEV e TG;
- ❖ Ao Laboratório de Biodiesel e Materiais (LBM) – UFPI, pelo compartilhamento dos recursos na realização das sínteses;
- ❖ Ao Laboratório de Produtos e Tecnologias em Processos (LPT) - UFC, pela realização das análises de FTIR;
- ❖ Aos Professores Dr. Cleânio da Luz Lima e Dr. Edmilson Miranda de Moura pelos ensinamentos e contribuições dadas no meu exame de qualificação que foram essenciais para meu engrandecimento;
- ❖ A Profa. Dra. Marciela Scarpellini, pela disponibilidade em compor minha banca;
- ❖ À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química;
- ❖ Ao Leo e o seu José Wilson, da limpeza, pela amizade e por toda prestatividade durante todo esse tempo;
- ❖ À Capes, pelo apoio financeiro;
- ❖ A todos que contribuíram de alguma forma, torcendo e rezando para que tudo desse certo, muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Leishmanioses são doenças infecciosas, parasitárias, não contagiosas causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada da fêmea dos insetos flebotomíneos infectadas com a forma promastigota do parasita. O tratamento é realizado com medicamentos à base de antimônio, que além do alto custo, apresentam efeitos cardiotoxícos e intolerância gastrointestinal. O ácido elágico (AE) é um polifenol antibacteriano e antioxidante, com baixa biocompatibilidade causada principalmente pela baixa solubilidade em água. Em contrapartida, as nanopartículas de óxido de magnésio (MgO NPs) são biocompatíveis e estáveis sob condições adversas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi sintetizar um material híbrido (MgO-AE), modificando o AE com MgO NPs, e caracterizar por termogravimetria (TG), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) acoplado com espectroscopia por dispersão de luz (EDS) e pelas técnicas espectroscópicas UV-Vis e FTIR. As análises de DRX exibiram mudanças na cristalinidade do AE no material híbrido devido à presença das MgO NPs. As curvas de TG apontaram para a conversão térmica de $Mg(OH)_2$ a MgO NPs ocorrendo em 900 °C. As imagens de MEV revelaram formação de MgO NPs agregadas e uma modificação na estrutura cristalina do AE. O UV-Vis apresentou uma pequena banda em 444 nm atribuída aos centros F em MgO NPs. O FTIR exibiu mudanças significativas nos estiramentos de C=O, C-O e O-H, indicando os possíveis sítios de interações do AE com as espécies de MgO. Avaliou-se a atividade citotóxica em células de mamíferos e a atividade antileishmania sobre as formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonenses* *in vitro*. Os testes farmacológicos exibiram valores de CC_{50} para MgO NPs (425,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para AE (23,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para MgO-AE (38,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mostrando que o nanomaterial híbrido apresentou uma redução na citotoxicidade. Os valores de IC_{50} para MgO NPs (80,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para AE (3,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e para MgO-AE (637,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$) expôs que o material híbrido apresentou-se menos eficiente para a atividade antileishmania.

Palavras-chave: nanopartículas; óxido de magnésio; ácido elágico; Leishmaniose

ABSTRACT

Leishmaniasis are infectious, parasitic, non-contagious disease caused by *Leishmania* protozoa transmitted by the bite of female sandflies of insects infected with the promastigote form of the parasite. Treatment is performed with antimony-based drugs, which in addition to high cost have cardiotoxic effects and gastrointestinal intolerance. Ellagic acid (EA) is an antibacterial and antioxidant polyphenol with poor biocompatibility primarily caused by low solubility in water. In contrast, magnesium oxide nanoparticles (MgO NPs) are biocompatible and stable under adverse conditions. The aim of this study was to synthesize a hybrid nanomaterial (MgO-AE) modifying EA with MgO NPs, and characterize by thermogravimetry (TG), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) coupled with light scattering spectroscopy (EDS) and UV-Vis e FTIR spectroscopic techniques. XRD analysis showed changes in EA crystallinity of the hybrid material due to presence of MgO NPs. TG curves indicated that for the thermal *conversion* of Mg(OH)₂ to MgO NPs occurred at 900 °C. SEM images revealed formation of MgO NPs aggregates and changes in crystal structure of AE. UV-Vis presented a band at 444 nm attributed to the F centers in MgO NPs. FTIR showed significant changes in C = O, C-O and O-H stretches, indicating the possible EA interaction sites with MgO species. We evaluated cytotoxic activity on mammalian cells and antileishmania activity on *Leishmania amazonenses* promastigotes *in vitro*. Pharmacological tests exhibited CC₅₀ values for MgO NPs (425.85 mg L⁻¹), EA (23.81 mg L⁻¹), and MgO-EA (38.15 mg L⁻¹), thus hybrid nanomaterial conferred a reduction on cytotoxicity. IC₅₀ values for MgO NPs (80.32 mg L⁻¹), EA (3.64 ug mL⁻¹) and MgO-EA (637.56 mg L⁻¹) presented less antileishmania efficacy for the hybrid nanomaterial.

Keywords: nanoparticles; magnesium oxide; ellagic acid; leishmaniasis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fêmeas dos insetos vetores das leishmanioses, nos gêneros (a) *Phlebotomus* (b) *Lutzomyia*.....23
- Figura 2** – Protozoários do gênero *Leishmania* nas formas (a) promastigota e (b) amastigota.....24
- Figura 3** - Esquema representativo do ciclo biológico heteroxênico dos protozoários do gênero *Leishmania*.....25
- Figura 4** - Casos de leishmaniose nas formas (a) visceral, (b) cutânea localizada, (c) cutânea difusa e (d) mucocutânea26
- Figura 5** – Estruturas moleculares propostas para os antimoniais pentavalentes: (a) Antimoniato de N-metilglucamina (glucantime[®]) e (b) Estibogluconato de sódio (pentostan[®])27
- Figura 6** – Estrutura molecular (a) Pentamidina e (b) Anfotericina B.....28
- Figura 7** - Estrutura química do (a) ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico) e (b) 2,3,7,8-tetrahidroxobenzopirano[5,4,3-cde]benzopirano-5,10-diona (ácido elágico).30
- Figura 8** - Esquema ilustrativo da formação da camada de Mg(OH)₂ sobre as superfícies de MgO NPs34
- Figura 9** – Esquema ilustrativo do efeito da decomposição do Mg(OH)₂: (a) MgO parcialmente hidratado depois de exposto a água ou umidade, (b) depois de calcinado a temperaturas intermediárias (350 – 600 °C) e (c) depois de calcinado a temperaturas acima de 600 °C.....35

Figura 10 – Esquema ilustrativo da estrutura cúbica de face centrada (CFC) das MgO NPs: (a) MgO NPs CFC sem defeitos, (b) MgO NPs CFC com centro F, (c) MgO NPs CFC com centro F ⁺ e (d) MgO NPs CFC com centro F ²⁺	36
Figura 11 - Imagens de MEV das MgO NPs obtidas em temperatura de calcinação de 550 °C e 850 °C	37
Figura 12 - Esquema ilustrativo da síntese das MgO NPs	43
Figura 13 - Esquema ilustrativo da síntese do nanomaterial híbrido MgO-AE	44
Figura 14 – Esquema representativo da redução de resazurina em resofurina	49
Figura 15 – Curva de TG do Mg(OH) ₂ formando as MgO NPs, exibindo a variação da perda de massa em gramas e porcentagem, em temperatura de 30 a 1000 °C ..	52
Figura 16 - Difratogramas de Raios X para nanopartículas de óxido de magnésio MgO-500, MgO-900 e o JCPDS do Mg(OH) ₂ e MgO	53
Figura 17 – Curva de TG das MgO NPs, exibindo a variação da perda de massa em gramas e porcentagem, em temperatura de 30 a 1000 °C	54
Figura 18 - (a) MEV das MgO NPs; (b) Análise de EDS das MgO NPs e resultado qualitativo da análise química de EDS	55
Figura 19 - (a) MEV do AE; (b) Análise de EDS do AE e resultado qualitativo da análise química de EDS	56
Figura 20 – Curva de TG para o nanomaterial híbrido MgO-AE, exibindo a variação da perda de massa em gramas e porcentagem, em temperatura de 30 a 1000 °C ..	57
Figura 21 - (a) MEV do nanomaterial híbrido MgO-AE; (b) Análise de EDS do MgO-AE e resultado semi quantitativo da análise química de EDS	58

Figura 22 - Difractogramas de Raios X para MgO-900, AE e para o material híbrido MgO-AE.....	59
Figura 23 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis para as MgO NPs e Mg(OH) ₂ , na faixa de 200-600 nm.....	60
Figura 24 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis: AE (3,74 x 10 ⁻⁵ mol. L ⁻¹) e MgO-AE (1,75 x 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹) em água.....	61
Figura 25 - Estrutura química do ácido elágico com carbonos numerados.....	62
Figura 26 - Espectro vibracional na região do infravermelho para as MgO NPs em pastilha de KBr.....	64
Figura 27 - Espectro vibracional na região do infravermelho para o AE em pastilha de KBr.....	65
Figura 28 - Espectro vibracional na região do infravermelho para o MgO-AE em pastilha de KBr.....	66
Figura 29 - Efeito das MgO NPs sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. Valores em média ± desvio padrão da média, ***p < 0,0001.....	69
Figura 30 - Efeito do AE sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. Valores em média ± desvio padrão da média, ***p < 0,0001.....	70
Figura 31 - Efeito do material híbrido nanoestruturado MgO-AE sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. Valores em média ± desvio padrão da média, ***p < 0,0001.....	71
Figura 32 - Efeito inibitório das MgO NPs sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações. Valores em média ± desvio padrão da média, ***p < 0,0001.....	72

- Figura 33** - Efeito inibitório do AE sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações. Valores em média \pm desvio padrão da média, ***p < 0,000173
- Figura 34** - Efeito inibitório do material híbrido nanoestruturado MgO-AE sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações. Valores em média \pm desvio padrão da média, ***p < 0,000174
- Figura 35** - Micrografias da cultura de parasitos (a) no grupo controle, (b) exposta ao AE, (c) exposta a MgO NPs e (d) exposta ao MgO-AE. Aumento de 100x e corante hematológico panótico rápido.....77
- Figura 36** - Micrografias da cultura de parasitos (a) no grupo controle, (b) exposta a AgNPs-AT e (c) exposta a AgNPs. Aumento de 100x e corante hematológico panótico rápido.....78
- Figura 37** - Possíveis interações entre as MgO NPs e o AE79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados e suas respectivas procedências.....	41
Tabela 2 - Valores de ΔH_f correspondentes aos grupos OH do AE.....	62
Tabela 3 - Valores de carga atômica para o átomo de oxigênio do AE	63
Tabela 4 – Atribuições para estiramentos e deformações do MgO, AE e MgO-AE ..	67
Tabela 5 - Valores de CC50 para macrófagos e IC50 para formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e seus respectivos índices de seletividade (IS)	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Ácido elágico

AG – Ácido gálico

AgNPs – Nanopartículas de prata

ANOVA - (*Analysis of Variance*) Análise de Variância

AT – Ácido tânico

CaO – Óxido de cálcio

CC₅₀ – Concentração citotóxica média

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária

DFT – (*Density Functional Theory*) Teoria do funcional da densidade

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRX – Difractometria de Raios X

DTNs – Doenças Tropicais Negligenciadas

EAN – ácido elágico intercalado em camadas de hidróxido de zinco

EDS - espectroscopia por dispersão de energia

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FTIR – Infravermelho com Transformada de Fourier

FTO – (*Fluorine doped Tin Oxide*) óxido de estanho dopado com flúor

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IS – Índice de seletividade

JCPDS - (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) Comitê Misto de Padrões em Difração de Pó

L. amazonensis – *Leishmania amazonensis*

L. major – *Leishmania major*

LAS – Laboratório de Automontagem Supramolecular

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPN – Laboratório de Produtos Naturais

LV – Leishmaniose visceral

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Mg(NO₃)₂ 6H₂O – Nitrato de magnésio hexahidratado

Mg(OH)₂ – Hidróxido de magnésio

MgO NPs – Nanopartículas de óxido de magnésio

MgO-AE - Nanopartículas de óxido de magnésio revestidas por ácido elágico

MONPCG – nanopartículas de óxido de magnésio revestidas com glucose

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NaOH – Hidróxido de sódio

NPPM – Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - (*Phosphate Buffered Saline*) Tampão fosfato-salino

pH - Potencial Hidrogeniônico

RPM – Rotação por minuto

SBF - Soro Fetal Bovino

TG – Termogravimetria

TiO₂ – Dióxido de titânio

UV-Vis – Espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta e visível

ZLH – Camada de hidróxido de zinco

ZnO – Óxido de zinco

$\lambda_{\text{máx}}$ – comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas.....	21
1.2	Leishmanioses.....	21
1.3	Materiais híbridos nanoestruturados.....	28
1.4	Ácido elágico.....	30
1.5	Nanopartículas Óxido Metálicas.....	31
1.5.1	<i>Óxidos Metálicos Modificados</i>	31
1.5.2	<i>Nanopartículas de Óxido de Magnésio</i>	32
2	Objetivos.....	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	Parte Experimental.....	41
3.1	Materiais e Reagentes.....	41
3.2	Sínteses dos Nanomateriais.....	42
3.2.1	<i>Nanopartículas de óxido de magnésio</i>	42
3.2.2	<i>Nanopartículas de óxido de magnésio revestidas por ácido elágico (MgO-AE)</i>	43
3.3	Animais.....	44
3.4	Parasitas e Células.....	45
3.5	Técnicas de caracterização.....	45
3.5.1	<i>Análise Termogravimétrica (TG)</i>	45
3.5.2	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	46
3.5.3	<i>Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)</i>	46
3.5.4	<i>Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)</i>	46
3.5.5	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada com espectroscopia por dispersão de energia (EDS)</i>	47
3.6	<i>Avaliação da citotoxicidade de MgO-AE, MgO NPS e AE sobre macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT</i>	47
3.7	<i>Avaliação da atividade antileishmania de MgO-AE, MgO NPs e AE in vitro sobre as formas promastigotas de Leishmania amazonenses</i>	48

3.7.1 Método colorimétrico da resazurina (AlamarBlue®)	48
3.7.2 Micrografias	49
3.8 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Estrutura e cristalinidade	52
4.2 Investigação Espectroscópica	60
4.3 Avaliação das Atividades Citotóxica e Antileishmania	68
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
6 PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como doenças que causam infecções graves e, em alguns casos, incapacidade crônica e morte. As DTNs afetam mais de 1 bilhão de pessoas em regiões pobres do mundo, nas quais os serviços básicos de saúde são precários, sendo estes de fundamentais importância para prevenção e cuidados de muitas doenças tropicais negligenciadas (BOISSON *et al.*, 2016; HOTEZ, 2010. HOTEZ *et al.*, 2009; NORRIS *et al.*, 2012).

A OMS listou um grupo de 17 doenças tropicais negligenciadas. Nesta lista encontram-se: doença de chagas, dengue, úlcera de bauru, esquistossomose e as leishmanioses. Essas doenças são as principais causas do déficit de crescimento e problemas de educação do mundo, pois a desigualdade social é favorecida pelos efeitos adversos das doenças que recaem sobre a produtividade do trabalhador, cognição e desenvolvimento das crianças, limitando suas oportunidades educacionais (NORRIS *et al.*, 2012; VOGEL, 2006; HOTEZ, 2010. HOTEZ *et al.*, 2009).

1.2 Leishmanioses

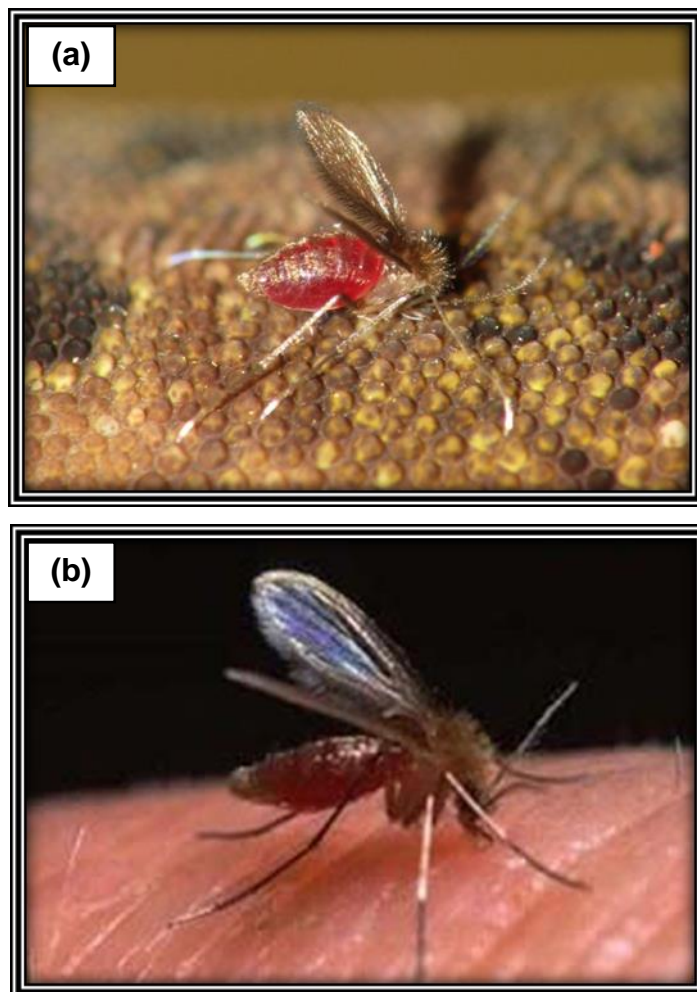
Segundo a OMS, a leishmaniose é a sexta doença mais expressiva nas regiões tropicais e subtropicais. Essa parasitose é infecciosa e não contagiosa causada pelos protozoários constituintes do gênero *Leishmania*. Essa doença representa um conjunto de manifestações clínicas e epidemiológica dependentes da espécie de *Leishmania* envolvida, e da relação parasita-hospedeiro (DESJEUX, 2004; PELISSARI *et al.*, 2011; CALDEIRA *et al.*, 2015; VIEITES *et al.*, 2009).

As Leishmanioses afetam cerca de 100 países do mundo, e estão associadas às precárias condições de vida humana. De acordo com a OMS, cerca de 310 milhões de pessoas estão em risco de infecção, e aproximadamente 1 milhão – 1,5 milhões de novos casos de Leishmaniose

cutânea são registrados por ano. Os países com maior número de casos são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. Anualmente, são registrados de 300.000 a 500.000 novos casos de Leishmaniose visceral, nos quais, mais de 90% dos casos ocorrem em: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão (FEIZ-HADDAD *et al.*, 2015; JEBALI; KAZEMI, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; DESJEUX, 2004).

A transmissão é causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* através da picada da fêmea do inseto flebótomo infectada com a forma promastigota do protozoário (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BATES, 2007). A epidemiologia é extremamente diversificada, cerca de 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para humanos e há cerca de 30 espécies de flebátomos vetores comprovados (DESJEUX, 1999, 2004; KATO *et al.*, 2010; BATES, 2007). As diferentes espécies de flebátomos estão agrupadas nos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), exibidos na Figura 1 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; RATH *et al.*, 2003; BAIOTTO *et al.*, 2009). Existem duas principais categorias epidemiológicas: a zoonótica que incluem mamíferos selvagens e domésticos como hospedeiros no ciclo de transmissão e a antroponótica em que o homem é a única fonte de infecção para o inseto vetor. Em termos de controle, os focos antroponóticos são estabelecidos como prioridade, por viabilidade, uma vez que, são mais suscetíveis a graves epidemias de leishmania visceral que em 95% dos casos, se não tratada, pode ser letal (DESJEUX, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

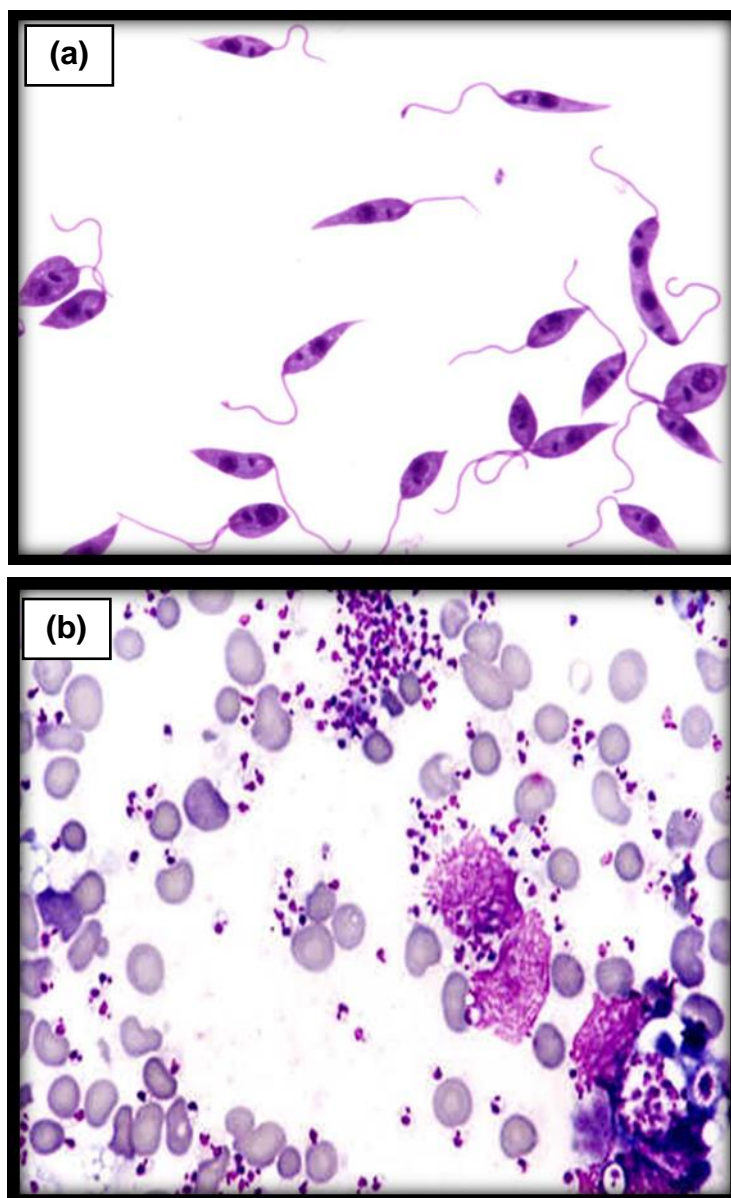
Figura 1 - Fêmeas dos insetos vetores das leishmanioses, nos gêneros (a) *Phlebotomus* (b) *Lutzomyia*



Fonte Adaptada: < <http://www.who.int/leishmaniasis/vector/en/> >

Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida digenético (heteroxênico), pois são parasitas intracelulares e vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Esses protozoários apresentam duas formas, uma flagelada ou promastigota e outra aflagelada ou amastigota, dependendo do estágio de desenvolvimento (Figura 2) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BATES, 2007; SILVEIRA NETO *et al.*, 2015).

Figura 2 – Protozoários do gênero *Leishmania* nas formas (a) promastigota e (b) amastigota

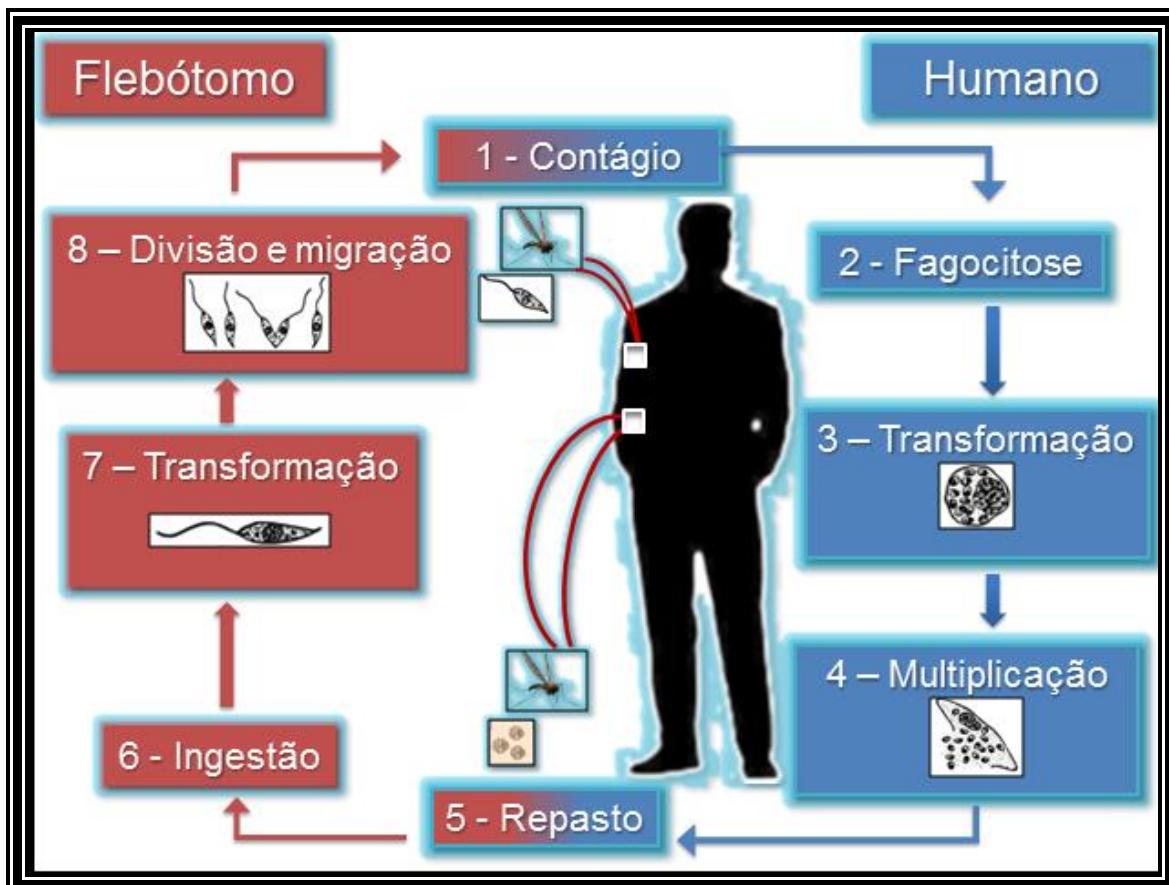


Fonte Adaptada: <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Leishmania&lang=3>

Nos hospedeiros mamíferos, os parasitas encontram-se na forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplicam, obrigatoriamente, dentro de células do sistema fagocítico mononuclear (macrófagos). À medida que os parasitas se multiplicam, a parede celular dos macrófagos se rompe liberando os parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Durante o repasto sanguíneo, os flebótomos ingerem as leishmanias na forma amastigota, estas vivem no meio extracelular (no tubo digestivo), e sofrem um processo de

diferenciação para formas flageladas, sendo posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada, como representado na Figura 3 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BATES, 2007; SILVEIRA NETO *et al.*, 2015).

Figura 3 - Esquema representativo do ciclo biológico heteroxênico dos protozoários do gênero *Leishmania*

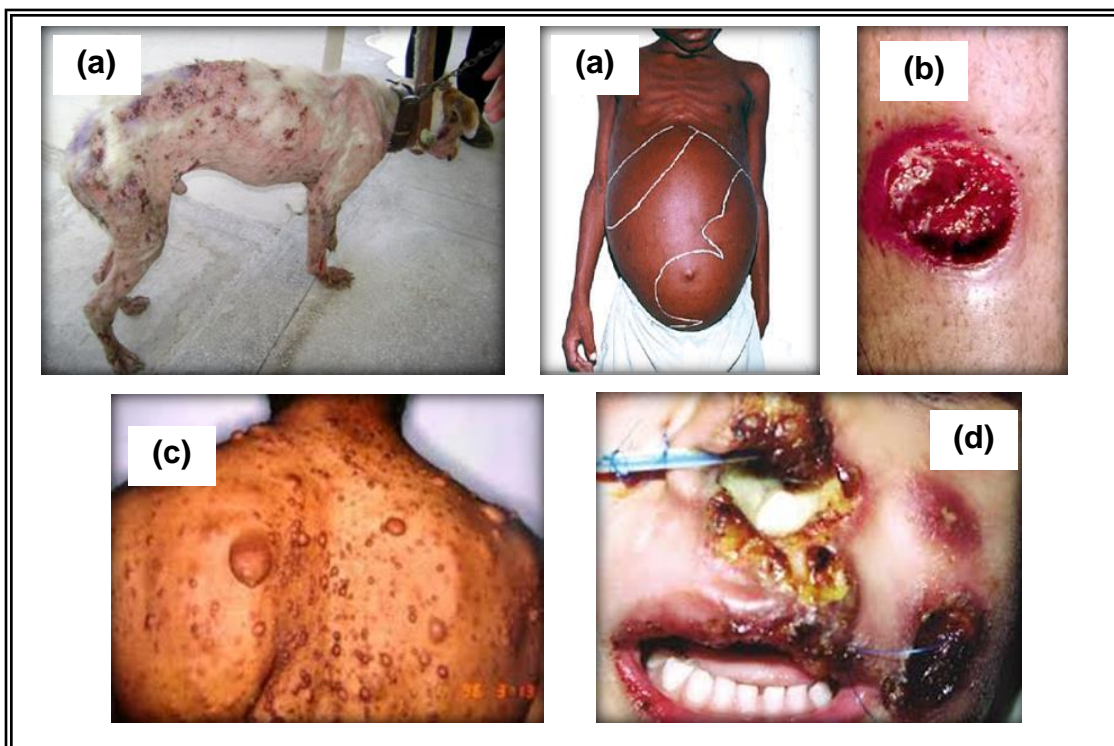


Fonte: Arquivo pessoal

Após o contágio, a leishmaniose pode se manifestar de diversas formas clínicas dependendo do agente etiológico, sendo estas classificadas em dois grupos: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar (cutânea) (DESJEUX, 2004; KATO *et al.*, 2010). A leishmaniose visceral (LV), popularmente conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença e pode ser fatal se não tratada. É caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço (esplenomegalia), aumento do fígado (hepatomegalia) e/ou linfadenopatia e anemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; DESJEUX, 2004; KATO *et al.*; 2010).

A leishmaniose tegumentar é sub-dividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). A LCL é forma mais comum da leishmaniose e causa lesões na pele, úlcera circular, indolor e bem delimitada, em áreas expostas do corpo, ocasionando cicatrizes ao logo da vida e deficiências graves. A LCD é a forma mais rara da doença, esta ocorre em indivíduos com resposta imune imediata por células defeituosas e é caracterizada por lesões nodulares, não ulcerosas e podem se espalhar por todo o corpo. A LMC, também conhecida como “Espundia”, é caracterizada pela destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta com lesões hediondas e desfigurantes, mutilações do rosto e grande sofrimento para a vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; DESJEUX, 2004; KATO *et al*; 2010). Na Figura 4, encontram-se alguns exemplos de pacientes com as referidas manifestações clínicas da leishmaniose.

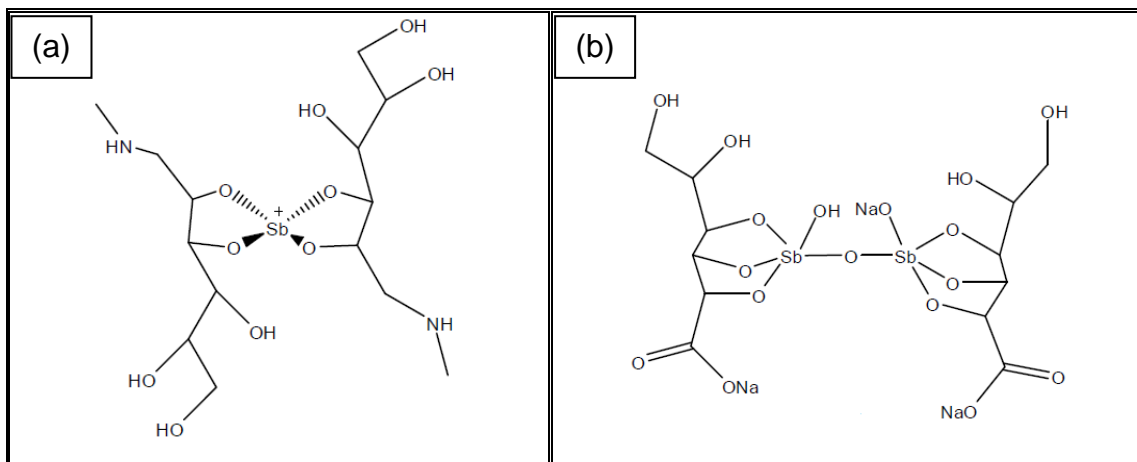
Figura 4 - Casos de leishmaniose nas formas (a) visceral, (b) cutânea localizada, (c) cutânea difusa e (d) mucocutânea



Fontes adaptadas: <<http://leishnao.blogspot.com.br/2014/02/lv-conhecendo-um-pouco-mais-sobre.html>>; <<http://www.dermatologia.net/cat-doencas-da-pele/leishmaniose-cutaneo-mucosa-ou-tegumentar-americana/>>; <http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Leishmaniasis+Cut%C3%A1nea+Difusa&lang=2>; VELOZO *et al.*, 2006

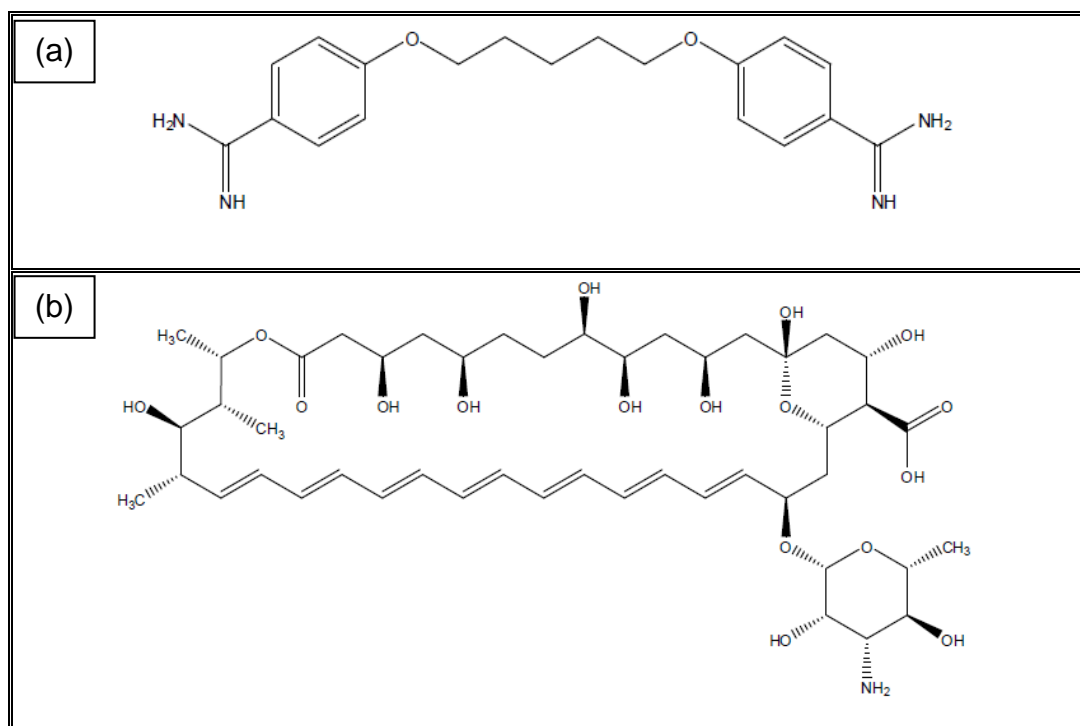
O tratamento das Leishmanioses é fundamentado na administração de fármacos antimoniais pentavalentes, tais como: antimoniato de N-metilglucamina (glucantime) (Figura 5a) e estibogluconato de sódio (pentostan) (Figura 5b). Esses medicamentos são aplicados no tratamento de todas as formas de leishmaniose, e quando há resistência dos protozoários esse tratamento é reforçado por pentamidinas (Figura 6a) e anfotericina B (Figura 6b). No entanto, além do alto custo, o tratamento apresenta efeitos colaterais graves, como: elevada toxicidade, efeitos cardiotóxicos e intolerância gastrointestinal. Com isso, há a necessidade de identificar meios mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento de leishmaniose (RATH *et al.*, 2003; BAIOTTO *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2012; JEBALI; KAZEMI, 2013; VIEITES *et al.*, 2009).

Figura 5 – Estruturas moleculares propostas para os antimoniais pentavalentes: (a) Antimoniato de N-metilglucamina (glucantime[®]) e (b) Estibogluconato de sódio (pentostan[®])



Fonte Adaptada: FRÉZARD *et al.*, 2008

Figura 6 – Estrutura molecular (a) Pentamidina e (b) Anfotericina B



Fonte: Arquivo pessoal

1.3 Materiais híbridos nanoestruturados

A nanociência é uma ciência inter/multidisciplinar muito importante contribuinte para a evolução científica e tecnológica, pois há a necessidade de desenvolver materiais mais sofisticados, miniaturizados, reciclável, ambientalmente amigável, com energia eficiente, confiável e barato. A miniaturização de sistemas para a escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) desperta interesse devido a possibilidade de desenvolver nanomateriais com novas propriedades e funcionalidades (SANCHEZ *et al.*, 2011; JUTZ; BOKER, 2011).

Os nanomateriais são materiais que possuem ao menos uma dimensão em tamanho nanométrico e que estejam, obrigatoriamente, abaixo do tamanho crítico. Esse tamanho é capaz de alterar algumas das propriedades do material, tais como: comportamentos mecânico, elétrico, óptico e magnético, solubilidade, reatividade, atividade catalítica, entre outras. Estes, também têm sido empregados no tratamento de várias doenças graves e crônicas por

apresentarem propriedades químicas, físicas e biológicas específicas (ZARBIN, 2007; ANGELI *et al.*, 2008; BARKALINA *et al.*, 2014).

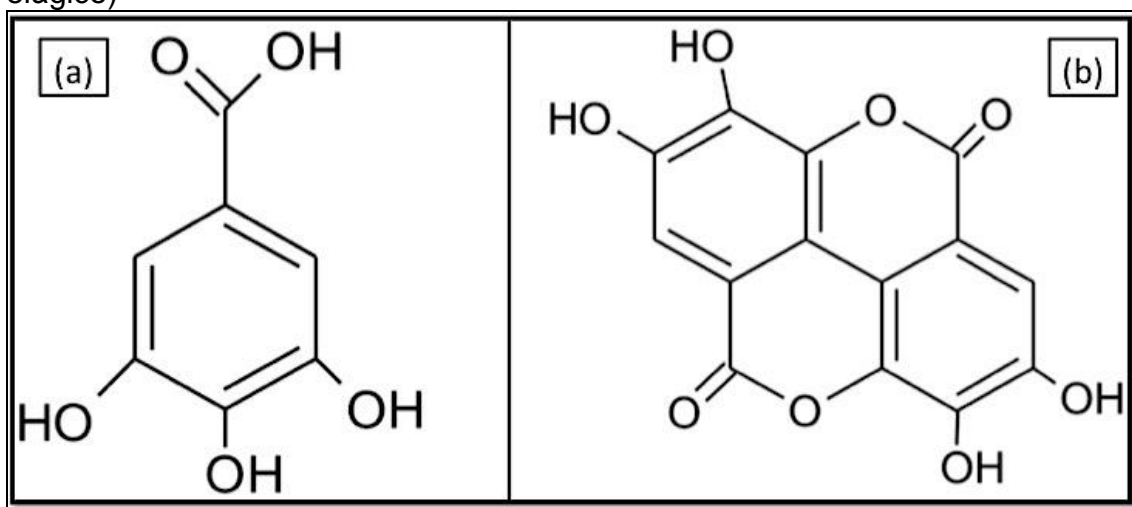
Estudos relatam que a mistura de materiais pode apresentar propriedades melhoradas quando comparados aos seus componentes de origem. Esses materiais são formados pela incorporação de um material de base estrutural a uma segunda substância, a matriz. Moléculas orgânicas funcionais de materiais híbridos demonstram muitas vezes maior estabilidade e desempenho numa matriz inorgânica. A diminuição no tamanho das unidades inorgânicas ao mesmo nível dos compostos orgânicos induz à formação de materiais mais homogêneos que permitem uma maior afinidade das propriedades. Os materiais híbridos formados, na maioria dos casos, por um material orgânico e um inorgânico, apresentam novas propriedades e multifuncionalidade, estimulando o surgimento de aplicações promissoras na óptica, eletrônica, mecânica, membranas, revestimentos funcionais e protetores, catálise, sensores e biologia. Com isso, a produção de nanomateriais torna-os interessantes para diversas aplicações, em especial, nas ciências biomédicas, com emprego em detecção biológica, liberação de fármacos, diagnóstico por imagem, engenharia de tecidos e medicina regenerativa (KICKELBICK, 2007; BARKALINA *et al.*, 2014; ZHANG, WEBSTER, 2009; JUTZ; BOKER, 2011).

A organização autônoma de componentes, que produzem padrões ou estruturas em qualquer escala, tem levantado interesse no desenvolvimento de nanomateriais funcionais com tamanho e morfologia controladas, para isto a automontagem surge como uma alternativa de adequar componentes de vários tamanhos e formas e fazê-los interagir ao nível molecular em maneiras diferentes, desenvolvendo estruturas funcionais. Os nanomateriais funcionais automontados são orientados por interações supramoleculares que podem ser covalentes ou interações não covalentes – interações de van der Waals, eletrostática, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações de coordenação (CARVALHO *et al.*, 2015; BUSSERON *et al.*, 2013; WHITESIDES; GRZYBOWSKI, 2002).

1.4 Ácido elágico

O ácido elágico (AE) representado na Figura 7b é um polifenol dimérico derivado do ácido gálico (AG), na Figura 7a. O AE é um composto de ocorrência natural, encontrado em muitas frutas (morango, romã, framboesa) e sementes (mirtilo, nozes), e sua estrutura consiste basicamente em dois grupos lactonas e quatro grupos hidroxilas. Os grupos hidroxilas podem atuar protegendo, no organismo, as células de danos oxidativos, pois elevam a atividade oxidante na peroxidação lipídica o que denota na remoção de radicais livres (SIMIC *et al.*, 2013; MAZZONE *et al.*, 2013; DANIEL *et al.*, 1989; LI *et al.*, 2015; SÁDECKÁ; TÓTHOVÁ, 2012; VEKIARI *et al.*, 2007; RATNAM *et al.*, 2006).

Figura 7 - Estrutura química do (a) ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico) e (b) 2,3,7,8-tetrahidroxobenzopirano[5,4,3-cde]benzopirano-5,10-diona (ácido elágico)



Fonte: Arquivo pessoal

Em virtude de sua vasta aplicação na área farmacológica e atividades biológicas, como potente antioxidante, anti-inflamatório, antimutagênico, antihiperlipidêmico, antimalárico, além de apresentar atividade antimicrobiana, antiplasmódica, antitumoral, antibacteriano e prebiótico, o AE pode ser aplicado na prevenção e terapia de diversas doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, e até no combate ao envelhecimento (MAZZONE *et al.*,

2013; SÁDECKÁ, TÓTHOVÁ, 2012; PRIYADARSINI *et al.*, 2002; YÜCE *et al.*, 2007; RATNAM *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2015).

Estudos farmacocinéticos demonstraram que o AE é pouco absorvido pelo organismo devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que denota uma necessidade de elevar sua biodisponibilidade sem perda de suas funções. Nanopartículas têm sido extensivamente aplicadas na liberação facilitada de fármacos e na modificação de moléculas orgânicas. A modificação na cristalinidade do AE por nanopartículas pode acarretar em melhorias na solubilidade e bioacessibilidade devido ao aumento da área superficial do material. (MAZZONE *et al.*, 2013; SÁDECKÁ, TÓTHOVÁ, 2012; PRIYADARSINI *et al.*, 2002; YÜCE *et al.*, 2007; RATNAM *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2015).

1.5 Nanopartículas Óxido Metálicas

A síntese de óxidos metálicos nanoparticulados atrai interesse devido suas potenciais aplicações. Os óxidos metálicos, como dióxido de titânio (TiO₂), óxido de zinco (ZnO), óxido de magnésio (MgO) e o óxido de cálcio (CaO) destacam-se principalmente pela estabilidade em condições adversas e também por serem seguros a seres humanos e animais (STOIMENOV *et al.*, 2002).

1.5.1 Óxidos Metálicos Modificados

Durante os últimos anos alguns óxidos metálicos foram modificados com outros compostos visando diversas aplicações. Por exemplo, Bafghi e colaboradores (2015) revestiram nanopartículas de óxido de magnésio (MgO NPs) com glucose (MONPCG) com vistas no tratamento contra a espécie *Leishmania (L) major*. A *L. major* apresenta duas importantes estruturas antigênicas chamadas de moléculas de superfície, glicoproteína 63 (gp63) e cisteína proteinase B (Cpb), que são as moléculas mais abundantes na superfície do parasita. Observou-se que o aumento da concentração de MgO NPs, MONPCG, e o tempo de incubação reduziram a viabilidade celular. A

expressão de genes gp63 e Cpb foi reduzida com o aumento da concentração de MgO NPs e MONPCG. As promastigotas tratadas com MgO NPs apresentaram expressão diminuída com o aumento do tempo de incubação, enquanto as tratadas com MONPCG não sofreram alteração na expressão dos genes gp63 e Cpb, indicando que o material híbrido silenciou os genes com maior eficácia.

Hussein e colaboradores (2011) sintetizaram o nanohíbrido (EAN) composto por ácido elálgico intercalado entre camadas de hidróxido de zinco (ZLH). O trabalho explorou o uso do ZnO como material precursor para intercalação de AE para a formação de um novo material AE-ZLH (EAN). Este estudo mostrou que a AE pode ser intercalado na camada intermédia de ZLH em meio não aquoso por reação direta com ZnO para a formação de híbrido orgânico-inorgânico. O material resultante foi usado na liberação controlada do fármaco ativo, no qual apresentou bom potencial. No ensaio *in vitro*, o EAN apresentou discreto efeito sobre as células de hepatócitos, semelhante ao seu homólogo, AE livre, o que indica que o EAN pode ainda ser usado no estudo em células cancerosas.

1.5.2 Nanopartículas de Óxido de Magnésio

Dentre os óxidos citados, vários pesquisadores investigaram as nanopartículas de óxido de magnésio (MgO NPs) e estas apresentaram excelentes propriedades em diversas áreas de aplicação, como: ópticas, térmicas, mecânicas, químicas, catálise, adsorção, cerâmica, tintas, supercondutores, lasers, retardantes de chamas, materiais optoeletrônicos, e de possuir elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade (SRIVASTAVA *et al.*, 2015; FAKHRI; ADAMI, 2014; PATIL; BHANAGE, 2013; CHOUDHURY *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016). Além disso, as MgO NPs possuem diversas aplicações na área biomédica como agente bactericida, biosensor, amenizador de queimaduras, regenerador de ossos, tratamento de câncer (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2012; AGHEBATI-MALEKI *et al.*, 2014).

Aspectos como tamanho, morfologia e estabilidade, e inclusive as propriedades das nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos são

influenciadas pelas condições experimentais, que poderão ser controladas pela otimização dos métodos de síntese destes nanomateriais (BHOSALE *et al.*, 2014). Segundo Tang e Shi (2008) relatam que concentração (entre 0,4-0,5 mol L⁻¹) e velocidade de gotejamento (abaixo de 0,5 mL/min) produzem cristais pequenos à temperatura ambiente. Vatsha e colaboradores (2013) investigaram diferentes temperaturas de precipitação (23, 60, e 85 °C) e temperaturas de calcinação (500, 600, e 700 °C) e além desses autores, Veldurthi e colaboradores (2011) também investigaram a temperatura de precipitação e concluíram que em temperaturas maiores produziram Mg(OH)₂ com poros menores e com menor polidispersão e que a temperatura de calcinação influencia diretamente na cristalinidade do material originando estruturas cúbicas e hexagonais. A estabilidade e/ou aplicação mais específica pode ocorrer com a modificação química de nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos durante o processo de incorporação de novos compostos, resultando num material híbrido (BHOSALE *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2013).

No entanto, com intuito de melhor compreender a estrutura molecular, comportamento espectroscópico e térmico do material híbrido constituído por MgO e ácido elágico, faz-se necessário relatar aspectos relacionados à reatividade do MgO com água.

A literatura relata que o MgO tende a hidratar-se em contato com a umidade do ambiente, vapor de água, ou em meio aquoso (AMARAL *et al.*, 2010). Em contato com a umidade do ambiente ocorre a formação de uma monocamada de MgOH⁺ sobre a superfície das MgO NPs. Esta camada atua como uma barreira evitando a difusão de água para o interior da estrutura do composto (SALOMÃO; PANDOLFELLI, 2008). Sob temperatura e umidade constantes, a reação de hidratação é interrompida, o que resulta em um núcleo anídrico de MgO rodeado por uma fina camada de MgOH⁺. A formação da camada se inicia com a doação de elétrons pelo MgO (equação 1) que é uma base forte de Lewis, seguida, da adsorção das hidroxilas à superfície carregada positivamente (equação 2), e quando desorvidas, liberam íon Mg²⁺ em solução (equação 3), ao atingir o ponto de saturação da concentração do íon Mg²⁺, o Mg(OH)₂ precipita sobre a superfície do MgO (equação 4) (AMARAL *et al.*, 2010; 2011; NEWBERG *et al.*, 2011). A Figura 8 demonstra a formação da camada de Mg(OH)₂ sobre a superfície de MgO.

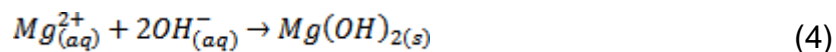
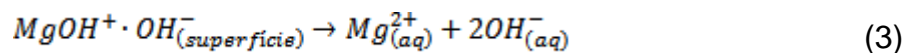
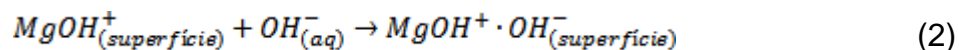
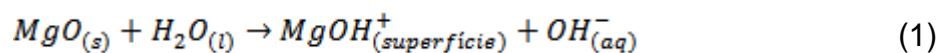
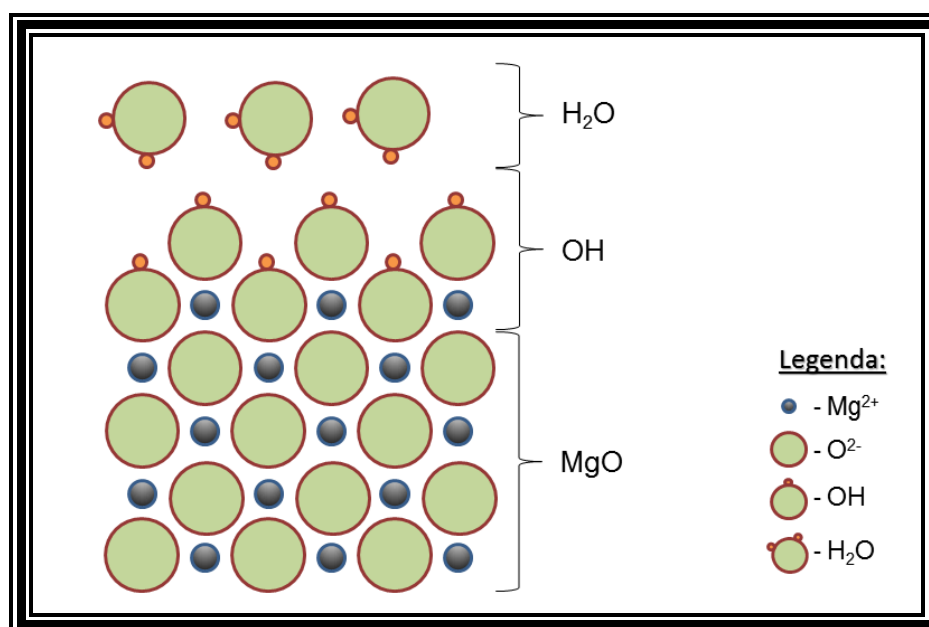


Figura 8 - Esquema ilustrativo da formação da camada de $Mg(OH)_2$ sobre as superfícies de MgO NPs



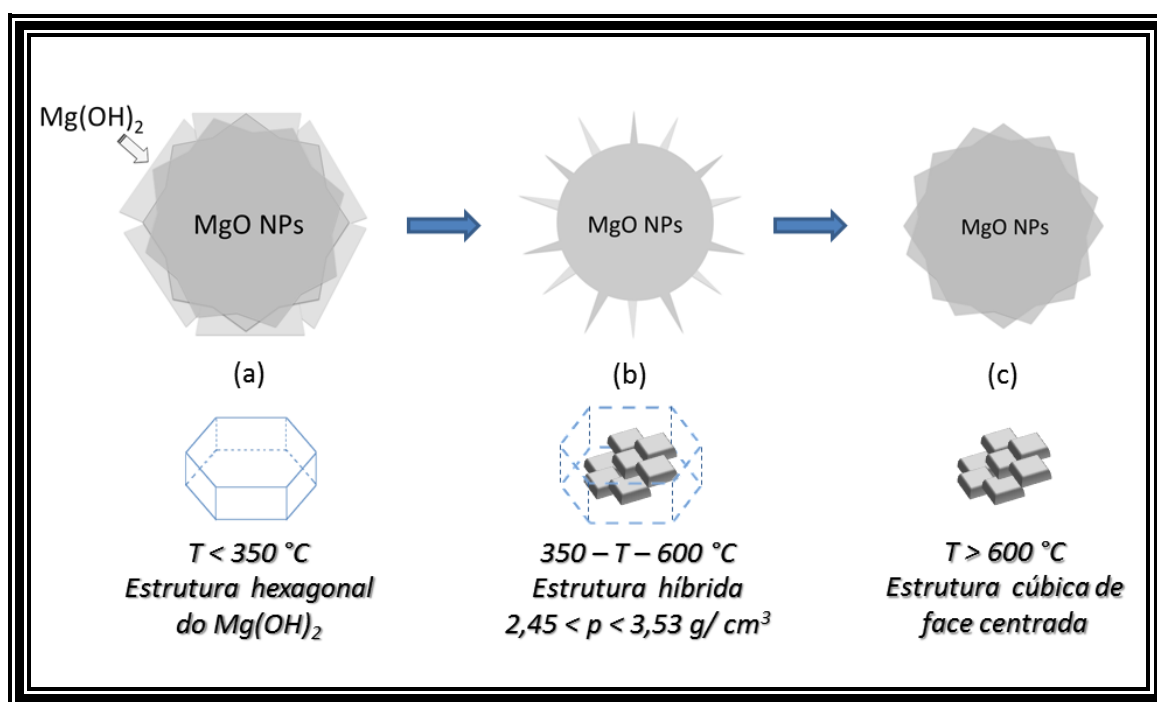
Fonte Adaptada: NEWBERG *et al.*, 2011

A camada ocasiona um intenso estresse sobre o óxido, devido o $Mg(OH)_2$ ($\rho=2,45 \text{ g cm}^{-3}$) possuir menor densidade que a partícula de MgO ($\rho=3,53 \text{ g cm}^{-3}$), levando a um aumento aparente no volume e causando diversos defeitos estruturais. Em meio aquoso, essa reação pode continuar, liberando após um período, as espécies $MgOH^+$ da superfície reagindo com os OH^- da solução formando $Mg(OH)_2$, e assim uma nova camada se origina (AMARAL *et al.*, 2010; 2011; SALOMÃO; PANDOLFELLI, 2008; 2014).

Na Figura 9 encontra-se um esquema ilustrativo do efeito da decomposição do $Mg(OH)_2$ na superfície das MgO NPs, na calcinação. A temperatura desse processo afeta diretamente a reatividade do MgO com a

água (em suspensão aquosa). Temperaturas abaixo de 350 °C não são eficientes para desencadear a decomposição do $\text{Mg}(\text{OH})_2$, originando uma estrutura de elevada área superficial e defeitos cristalinos. Entre 350 – 600 °C ocorre a decomposição total da camada do $\text{Mg}(\text{OH})_2$, formando uma estrutura com elevada área superficial e defeitos, acarretando o aumento da reatividade do MgO com água. Em temperaturas acima de 600 °C, mais precisamente em torno de 900 °C, ocorre diminuição da área superficial nas NPs, e conseqüentemente redução da reatividade das partículas e dos defeitos através da reconstrução da estrutura cristalina cúbica do MgO (SALOMÃO; PANDOLFELLI, 2008).

Figura 9 – Esquema ilustrativo do efeito da decomposição do $\text{Mg}(\text{OH})_2$: (a) MgO parcialmente hidratado depois de exposto a água ou umidade, (b) depois de calcinado a temperaturas intermediárias (350 – 600 °C) e (c) depois de calcinado a temperaturas acima de 600 °C

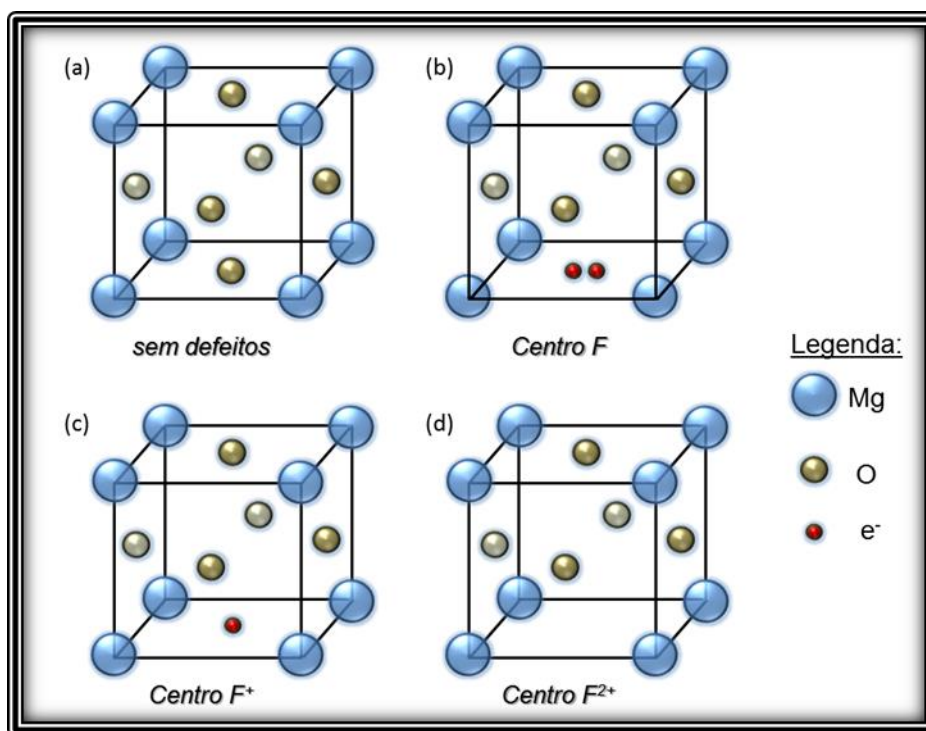


Fonte adaptada: SALOMÃO; PANDOLFELLI, 2008

Neste sentido, se faz necessário comentar os defeitos estruturais que podem ocorrer no composto MgO. A literatura reporta que as MgO NPs apresentam átomos de baixa coordenação nas arestas e vértices, exibindo absorção e luminescência, o que permite o surgimento de um defeito

cristalográfico denominado centro F. O centro F é resultante do aprisionamento de elétrons devido à perda de oxigênios que promove um ou mais pares de elétrons para as posições cristalográficas normais, deixando para trás alguns elétrons na vacância. A remoção de O^{2-} resulta em centros F^{2+} no qual nenhum elétron fica aprisionado, O^- forma centros F^+ e o O neutro resulta na formação de centros F, como representado na Figura 10. Estes defeitos podem ser observados entre as regiões do ultravioleta e infravermelho, pois apresentam diferentes energias de excitação, além de afetarem diretamente a reatividade das nanopartículas (CHOUDHURY *et al.*, 2014a; CHOUDHURY *et al.*, 2014).

Figura 10 – Esquema ilustrativo da estrutura cúbica de face centrada (CFC) das MgO NPs: (a) MgO NPs CFC sem defeitos, (b) MgO NPs CFC com centro F, (c) MgO NPs CFC com centro F^+ e (d) MgO NPs CFC com centro F^{2+}

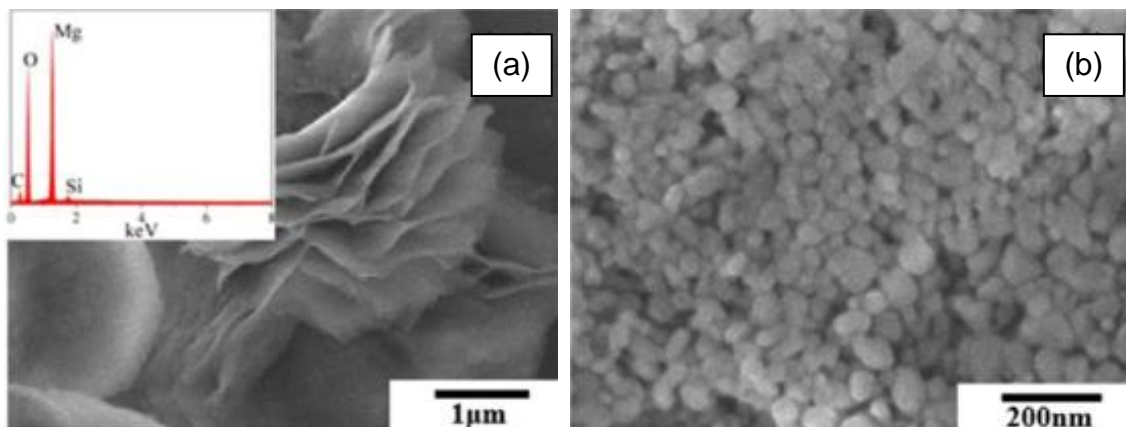


Fonte: Arquivo pessoal

Li e colaboradores (2016) realizaram a síntese das MgO NPs, e durante o processo, o precursor $Mg_5(CO_3)_4(OH)_2 \cdot 4H_2O$ foi submetido a diferentes temperaturas de calcinação (550 °C, 700 °C e 850 °C), seguido de caracterização por MEV. No trabalho de Li *et al.*, 2016 foi possível obter MgO NPs com morfologias variadas. Em temperaturas mais baixas (550 °C), obteve-

se uma estrutura hierárquica *3D-flower*, devido a preservação da morfologia do precursor do composto, como mostrado na Figura 11a, enquanto que em temperaturas mais elevadas (850 °C), pode-se obter as MgO NPs bem definidas, como mostrado na Figura 11b.

Figura 11 - Imagens de MEV das MgO NPs obtidas em temperatura de calcinação de 550 °C e 850 °C



Fonte adaptada: Li *et al.*, 2016

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar as nanopartículas de óxido de magnésio revestidas pelo polifenol ácido elágico, na proporção de 2:1 para MgO NPs e AE, respectivamente, resultando na formação do material híbrido nanoestruturado MgO-AE, além da avaliação do efeito citotóxico e da atividade antileishmania, com vistas para o tratamento da leishmaniose.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar MgO NPs pelo método de co-precipitação e o material híbrido nanoestruturado, por meio da modificação do ácido elágico por MgO NPs, com o intuito de reduzir a citotoxicidade e elevar a bioacessibilidade do polifenol;
- Realizar a caracterização dos materiais por:
 - Análise termogravimétrica (TG) com o objetivo de investigar a estabilidade térmica e as mudanças em percentual de massa com variação da temperatura e o grau de hidroxilação;
 - Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta visível (UV-Vis);
 - Espectroscopia vibracional na região infravermelho (FTIR);
 - Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada com espectroscopia por dispersão de energia (MEV/EDS) para estudar a morfologia e identificar os elementos químicos das amostras;
 - Difractometria de Raios-X (DRX) para analisar a cristalinidade e estrutura das amostras;
- Avaliar a ação dos materiais *in vitro* sobre formas promastigotas de *Leishmanias amazonenses*, a partir da realização dos protocolos experimentais pelo método colorimétrico;
- Avaliar a atividade citotóxica dos materiais sobre as células de mamíferos;

Parte Experimental

3 Parte Experimental

3.1 Materiais e Reagentes

A tabela 1 ilustra os principais reagentes empregados na realização deste trabalho, todos de grau analítico, incluindo suas fórmulas moleculares e respectivas procedências. A água ultrapura, utilizada no preparo de todas as soluções e no processo de lavagem dos precipitados, foi obtida pelo sistema Purelab Option-Q (Elga), com resistividade de 18,2 MΩ cm. O meio de cultura Schneider's, bem como o suplemento - constituído por soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Tabela 1 - Reagentes utilizados e suas respectivas procedências

Reagentes	Fórmula molecular	Procedência
Nitrato de Magnésio hexahidratado	(Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O)	Vetec
Hidróxido de sódio	NaOH	Impex
Ácido Elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	Laboratório de Produtos Naturais (LPN) – UFPI
AlamarBlue®	C ₁₂ H ₆ NNaO ₄	Sigma-Aldrich
Panótico rápido	-	Laborclin
Tioglicolato de sódio	C ₂ H ₃ NaO ₂ S	Sigma-Aldrich
Azul de tripan	C ₃₄ H ₂₄ N ₆ O ₁₄ S ₄ Na ₄	Sigma-Aldrich
Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S	Sigma-Aldrich

Fonte: Arquivo pessoal

3.2 Sínteses dos Nanomateriais

3.2.1 Nanopartículas de óxido de magnésio

As nanopartículas de óxido de magnésio foram sintetizadas pelo método de co-precipitação relatado por Vatsha e colaboradores (2013), com algumas alterações no procedimento. Em um frasco reacional, 10 mL de nitrato de magnésio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) permaneceu sob agitação magnética até atingir uma temperatura de $90 \text{ }^\circ\text{C}$, o aquecimento foi cessado e logo em seguida foi adicionado, gota a gota, 10 mL de hidróxido de sódio ($0,4 \text{ mol L}^{-1}$). Esta mistura permaneceu sob agitação magnética por 1 h, ocorrendo a formação do hidróxido de magnésio, um precipitado branco de aspecto gelatinoso, que foi lavado 4 vezes com água ultrapura com o auxílio de uma centrífuga, por 5 min a 3000 rpm, para a remoção dos íons Na^+ e NO_3^- . Em seguida, este precipitado foi seco em estufa a uma temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h, seguido de desaglomeração dos grânulos. O precipitado hidróxido de magnésio (Mg(OH)_2) foi calcinado em mufla a $900 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 h, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$, para a obtenção das MgO NPs, como representado na Figura 12. O mecanismo de formação das MgO NPs foi demonstrado nas Equações 5 e 6.

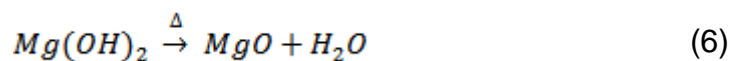
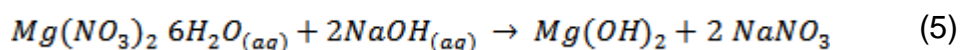
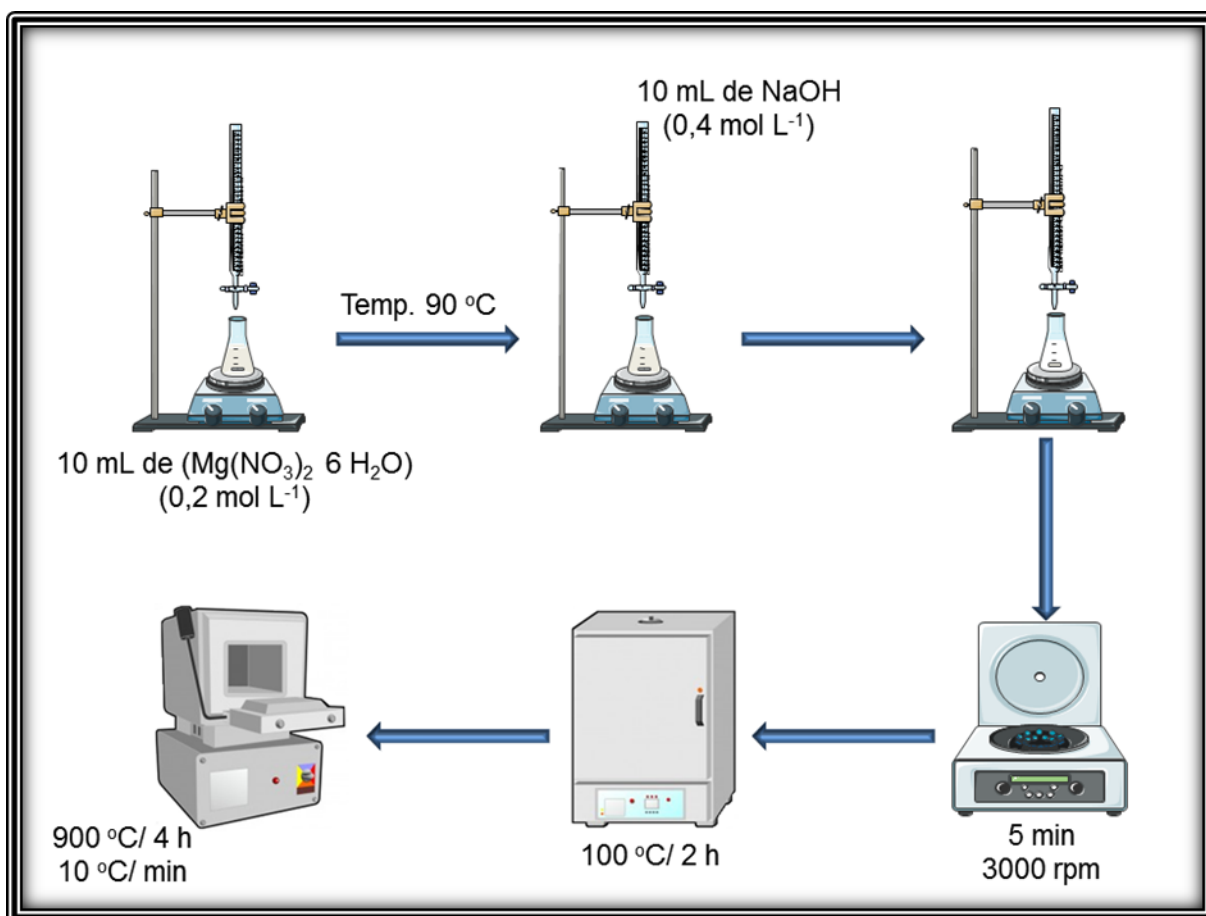


Figura 12 - Esquema ilustrativo da síntese das MgO NPs



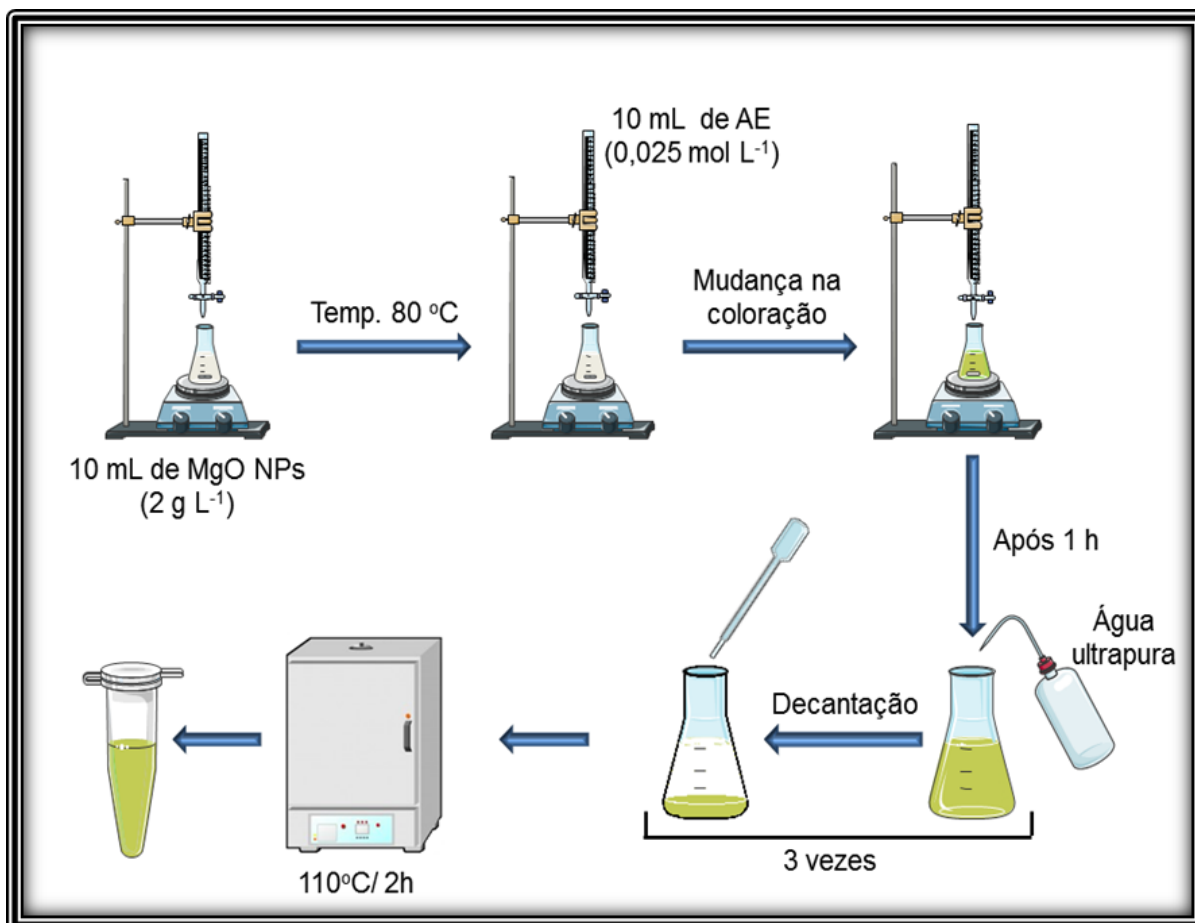
Fonte: Arquivo pessoal

3.2.2 Nanopartículas de óxido de magnésio revestidas por ácido elágico (MgO-AE)

O material híbrido nanoestruturado foi sintetizado pelo método de coprecipitação, na proporção de 2:1 para MgO NPs e AE, respectivamente. Em um frasco reacional, 10 mL de MgO NPs (2 g L^{-1}) permaneceu sob agitação magnética até atingir a temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, o aquecimento foi interrompido e adicionou-se 10 mL, gota a gota, da solução de ácido elágico ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$), como ilustrado na Figura 13. A adição do AE (coloração amarelo claro) na dispersão de MgO NPs (coloração branca) resultou em uma mudança imediata na coloração da mistura (verde fluorescente), que permaneceu sob agitação magnética por 1 h. O precipitado foi lavado com

água ultrapura, o frasco foi mantido em repouso e após decantação do precipitado, retirou-se o sobrenadante, repetiu-se o procedimento por 3 vezes, e o precipitado foi seco em estufa a 110 °C por 2 h.

Figura 13 - Esquema ilustrativo da síntese do nanomaterial híbrido MgO-AE



Fonte: Arquivo pessoal

3.3 Animais

O protocolo experimental de avaliação citotóxica utilizou quatro camundongos BALB/c, machos e fêmeas, com 20-30g e 8-10 meses de vida. Esses encontravam-se alojados no Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), mantidos a $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em ciclo claro-escuro de 12 h, com água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical conforme RESOLUÇÃO N° 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, sob

responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho (CRMV-PI N° 0335). Os experimentos desenvolvidos neste projeto foram aprovados pelo Comitê de ética em Experimentação Animal da UFPI (CEEA).

3.4 Parasitos e Células

As linhagens da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas no Laboratório de Atividade Antileishmania, localizado no NPPM da UFPI, com passagens sucessivas em camundongos BALB/c e cultivadas em meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, penicilina (100 U. mL^{-1}) e estreptomicina (100 mg.mL^{-1}), a $26 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os macrófagos foram retirados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, com 8-10 meses de vida, alojados no NPPM da UFPI. Aplicou-se 2 mL de tioglicolato de sódio estéril, por 72 h, e após a eutanásia os camundongos foram mantidos em álcool para posterior desinfecção. A retirada dos macrófagos foi feita em capela de fluxo laminar com o animal fixado em placa de cortiça, na posição decúbito dorsal, seguida da administração de 6 mL de tampão fosfato salino estéril, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, na cavidade abdominal. Em seguida, foi realizada uma massagem leve na região abdominal e aspirou-se o tampão injetado utilizando uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo falcon de 50 mL e centrifugado a 1000 rpm, durante 10 min. Logo após houve lavagem por três vezes com PBS estéril na temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a averiguação da viabilidade celular, o precipitado contendo macrófagos foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI e uma pequena quantidade foi diluída com azul de tripan a 0,4 %. A contagem foi realizada em hemocítômetro do tipo câmara de Neubauer.

3.5 Técnicas de caracterização

3.5.1 Análise Termogravimétrica (TG)

A técnica de termogravimetria foi utilizada para monitorar a quantidade de água na amostra e por meio dos resultados obtidos calcular o grau de hidratação/hidroxilação dos materiais. A análise foi feita utilizando um aparelho

TGA-50 da Shimadzu, em atmosfera inerte de N₂, com fluxo de 50 mL min⁻¹, com porta-amostra de platina, num intervalo de temperatura de 30 a 1000 °C.

3.5.2 *Difração de Raios X (DRX)*

As análises de difração de raios X foram realizadas em um aparelho da Empyrean Instrument – PANanalytical, cujos parâmetros determinados para análise foram: faixa de varredura de 2θ de 10° a 90°, operando em uma voltagem de 40 KV e uma corrente de 40 mA e a radiação usada foi de Co Kα. A técnica de difração de raios X foi empregada para investigar a estrutura cristalina das MgO NPs e a cristalinidade do material híbrido do MgO-AE e do AE.

3.5.3 *Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)*

A técnica de espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis foi utilizada para observar a formação do material híbrido, tendo como base os resultados dos materiais precursores. Para acompanhar este estudo, utilizou-se um espectrofotômetro com feixe duplo Mapada UV-6100S, da Allcrom, na faixa de varredura de 200 nm a 600 nm. Para a realização das medidas preparou-se soluções aquosas dos materiais precursores de concentração conhecida e dispersão do material híbrido, que posteriormente foram colocadas em cubetas de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

3.5.4 *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)*

A técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi realizada para identificar grupos funcionais presentes no material híbrido, bem como, deslocamentos, estiramentos e deformações angulares provenientes da interação. As medidas foram realizadas utilizando um IV espectrofotômetro FT-IR/ NIR Spectrometer PerkinElmer, em pastilhas de KBr, e varredura na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹.

3.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplada com espectroscopia por dispersão de energia (EDS)

A MEV foi utilizada para investigar características microestruturais de objetos sólidos, fornecendo informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos, quando acoplado com EDS é possível quantificar a composição química da amostra. Para a realização da técnica utilizou-se um aparelho da FEI Company, Quanta 250 – FEG, com diferença de potencial de 20 KV.

3.6 Avaliação da citotoxicidade de MgO-AE, MgO NPS e AE sobre macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT

Os ensaios de citotoxicidade do material híbrido e seus precursores foram avaliados pelo teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), cuja base está na interação de enzimas oxiredutase dependentes de NADPH, presentes apenas em células viáveis (D'ALESSANDRO et al., 2011).

Em placa de 96 poços foram adicionados 100 μL de meio RPMI 1640 suplementado e cerca de 2×10^5 macrófagos/poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 , por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI suplementado, com intuito de retirar as células que não aderiram. Logo em seguida, foram adicionados, em triplicata, 100 μL de RPMI 1640 suplementado juntamente com as soluções das MgO NPs, AE, MgO-AE, diluídas em DMSO variando as concentrações de 800 a 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As placas foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação, foram adicionados 10 μL do sal de MTT diluído em meio RPMI a 5 mg mL^{-1} de PBS. Foram incubados novamente, por 4 h, em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 , e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) em todos os poços. As placas foram colocadas sob agitação por cerca de 30 minutos em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente, para dissolução completa do MTT-formazan. Por último, a leitura foi realizada a 550 nm e os resultados expressos em termos de

concentração citotóxica média (CC_{50}), sendo o grupo controle considerado como 100%.

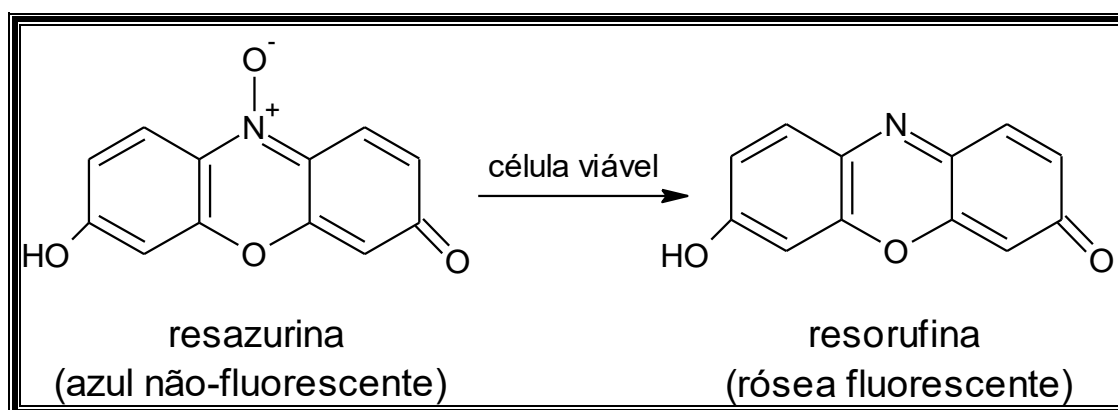
3.7 Avaliação da atividade antileishmania de MgO-AE, MgO NPs e AE in vitro sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonenses*

3.7.1 Método colorimétrico da resazurina (AlamarBlue®)

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *leishmanioses amazonenses* em fase de crescimento logarítmico. Estas foram adicionadas na quantidade de 1×10^6 promastigotas/poço em microplacas de cultivo celular de 96 poços, a 26 °C, contendo meio Schneider's suplementado e as oito concentrações das substâncias a serem testadas, em triplicata, obtidas por diluição seriada (800 a 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para MgO NPs, AE e para o material híbrido MgO-AE). A placa foi incubada por 48 h. Faltando 6 h para o término da incubação foram adicionados 20 μL de solução de resazurina $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, incubou-se novamente a placa.

A resazurina, conhecida como azul de alamar (AlamarBlue®), corante utilizado para quantificar indiretamente a toxicidade e viabilidade celular. A resazurina, que apresenta coloração azul e não-fluorescente, quando incubada com as células viáveis, penetra no citosol e pela atividade enzimática nas mitocôndrias é reduzida, convertendo-se a resofurina, de coloração rósea fluorescente, representado na Figura 14. A Fluorescência é emitida em 590 nm sendo analisada por espectroscopia de fluorescência ou no UV-Vis (AL-NASIRY et al., 2007; NAKAYAMA et al., 1997; PERROT et al., 2003; O'BRIEN et al., 2000).

Figura 14 – Esquema representativo da redução de resazurina em resorufina



Fonte: Arquivo pessoal

A leitura das placas foi realizada por um leitor de placas de absorvância Biotek (modelo ELX800), operando a 550 nm. Os ensaios foram expressos em termos de inibição de crescimento (%). Para desprezar a absorvância resultante do próprio meio foi realizado a leitura do branco meio Schneider's junto às triplicatas. O controle negativo é equivalente ao meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas/poço e, neste caso, a viabilidade foi de 100%, enquanto o controle positivo continha apenas o meio Schneider's apresentando 0% de viabilidade para o parasito.

3.7.2 Micrografias

As micrografias para avaliação da atividade antileishmania foram obtidas a partir de esfregaços espessos feitos em lamínulas após 1 h de ação dos materiais (MgO NPs, AE e MgO-AE) sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Para esta finalidade, utilizou-se uma placa de cultivo celular similar às citadas anteriormente, adicionando-se somente as maiores concentrações de cada amostra. O controle foi o meio Schneider's duplamente suplementado contendo promastigotas em fase logarítmica de crescimento. As lamínulas foram preparadas pela retirada de alíquotas de 10 μ L de cada poço e posicionadas num microscópio digital Olympus (modelo CX31), após coloração por panótico rápido e secagem à temperatura ambiente. O comportamento dos microrganismos foi observado em dois campos distintos das lamínulas.

3.8 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A comparação entre os dados foi feita por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, utilizando o software Graph Pad Prism (versão 5.0). Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória 50 – concentração que vai inibir 50% do crescimento dos parasitas) e CC₅₀ (coeficiente de citotoxicidade 50 – concentração que vai causar dano a 50% dos macrófagos avaliados no teste) foram calculados utilizando o software IBM SPSS Statistics 20.0.0, pelo modelo de regressão Probit, com limite de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes para análise.

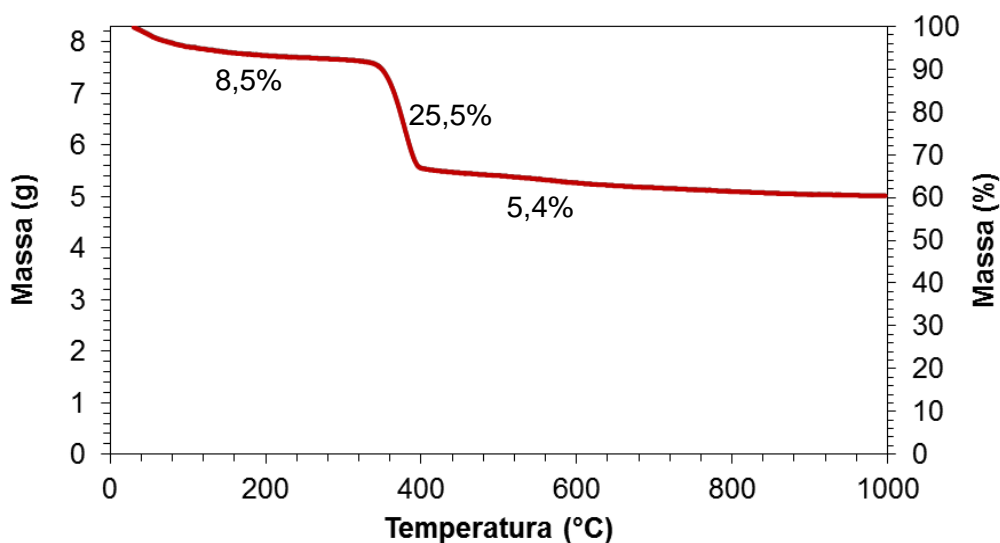
Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estrutura e cristalinidade

A conversão do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ a MgO , durante o processo de calcinação, pode ser evidenciada pelas análises de termogravimetria (TG) como mostrado na Figura 15 e pelo difratometria de raios-x (DRX), Figura 16. A curva de TG do hidróxido (Figura 15) possui duas perdas de massas que equivalem a 39,4% da massa total (8,3 mg). A primeira perda ocorre na faixa inicial até 350 °C proveniente da H_2O fisissorvida e quimissorvida na superfície do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ que representa um total de 8,5% da massa total. A segunda perda, correspondente a 25,5%, ocorre entre 350-470 °C, decorrente do processo de desidratação completa do $\text{Mg}(\text{OH})_2$. O excesso de massa perdida (5,4%), em temperatura superior a 470 °C pode ser atribuída a impurezas e água de oclusão. Em 900 °C não houve diminuição de massa, comprovando que esta temperatura é eficiente para a calcinação do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ originando MgO ausente de grupos hidroxilas. A reação de desidratação do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ é demonstrada na equação 6 (NAHDI *et al.*, 2009; ARMAGHAN; AMINI, 2014; BAUMANN *et al.*, 2015).

Figura 15 – Curva de TG do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ formando as MgO NPs, exibindo a variação da perda de massa em gramas e porcentagem, em temperatura de 30 a 1000 °C

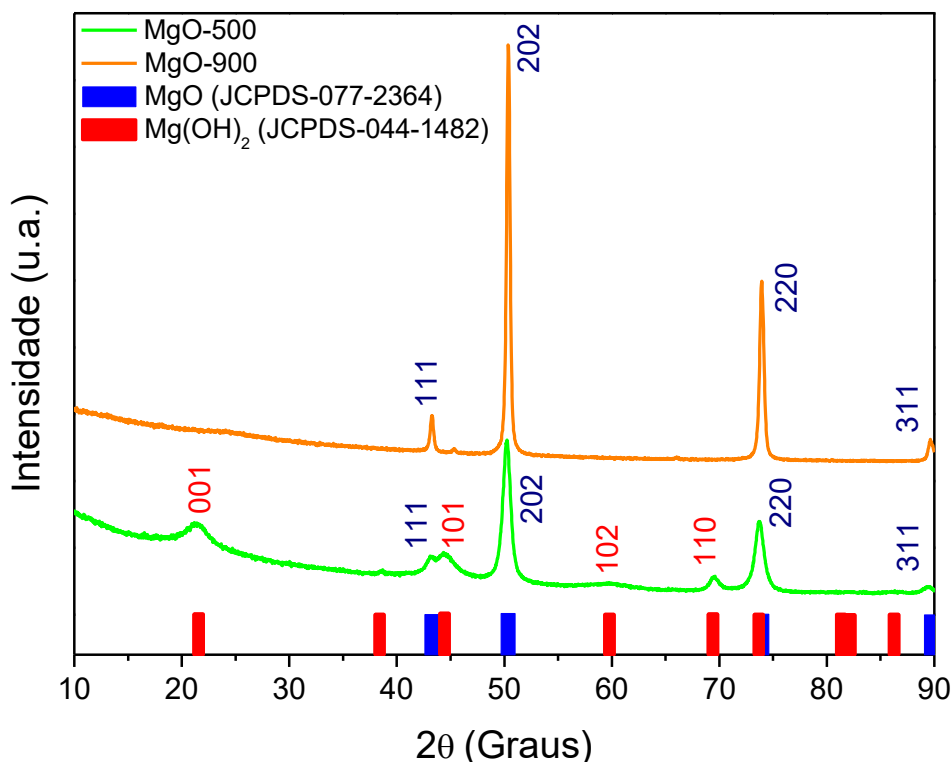


Fonte: Arquivo pessoal

O TG evidenciou a conversão do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ a MgO durante o processo de calcinação enquanto que o DRX evidenciou efeito da temperatura de calcinação na estrutura cristalina. Segundo Salomão e Pandolfelli (2008), a mudança da estrutura cristalina reduz a reatividade e os defeitos das NPs quando há transição da forma hexagonal para a cúbica. Na Figura 16 encontram-se as fichas cristalográficas referentes ao $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (barras vermelhas) e MgO (barras azuis) e das MgO NPs calcinadas nas temperaturas de 500 °C (MgO -500) e 900 °C (MgO -900).

As MgO -500 exibiram os planos cristalográficos (001), (101), (102), (110) em 21°; 44°; 59° e 69°, respectivamente, correspondentes aos planos cristalográficos do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (JCPDS-044-1482) indicando que a decomposição total do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ não é eficiente a 500 °C, apresentando dimorfismo (hexagonal e cúbica). As MgO -900 exibiram somente os planos referentes à estrutura cúbica (111), (200), (220), (311) em 43°; 50°; 74° e 89°, respectivamente, concordando com os dados do padrão JCPDS (077-2364) (VATSHA *et al.*, 2013).

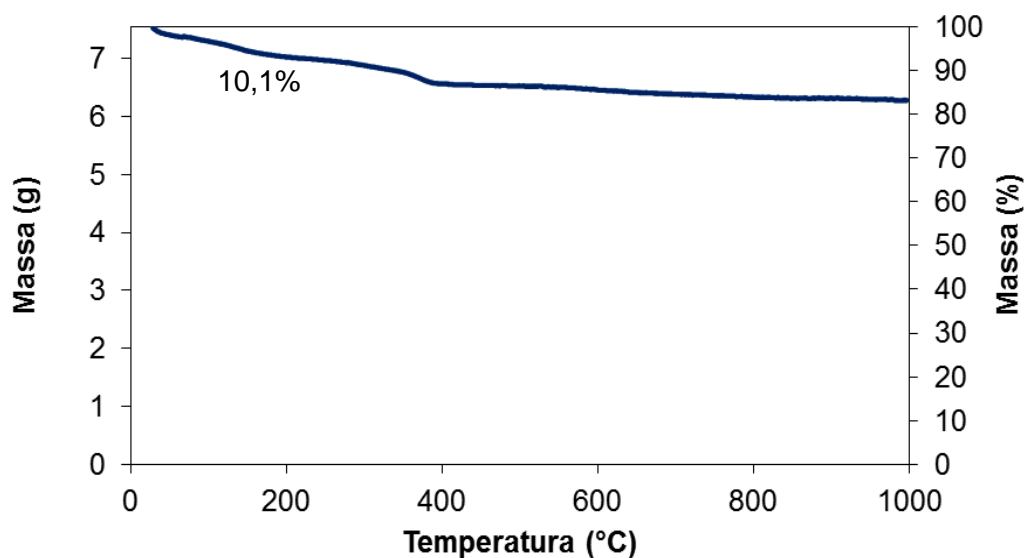
Figura 16 - Difratomogramas de Raios X para nanopartículas de óxido de magnésio MgO -500, MgO -900 e o JCPDS do $\text{Mg}(\text{OH})_2$ e MgO



Fonte: Arquivo pessoal

A curva de TG das MgO NPs obtidas a 900 °C (Figura 17) apresentou uma perda de massa no intervalo de 350-450 °C referente à desidratação do Mg(OH)₂ e água adsorvida, demonstrando que houve formação de uma camada sobre a superfície do óxido. É possível constatar que a H₂O fisissorvida e quimissorvida representa cerca de 10,1% da massa total (7,5 mg), e que a composição é de 20,5% de Mg(OH)₂ e 69,4% de MgO NPs.

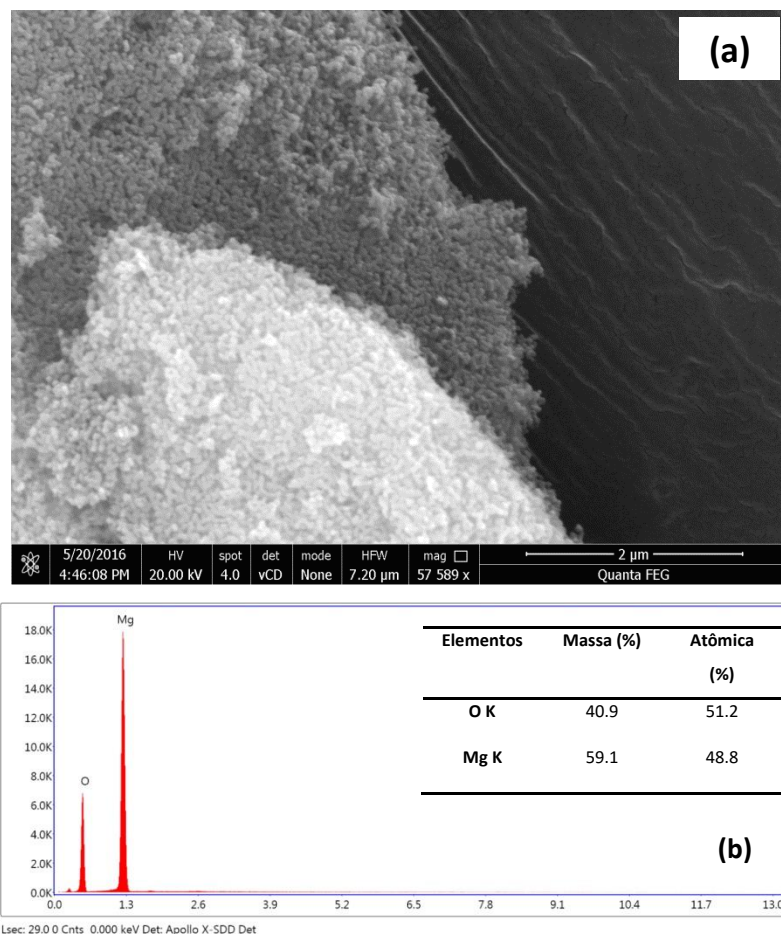
Figura 17 – Curva de TG das MgO NPs, exibindo a variação da perda de massa em gramas e porcentagem, em temperatura de 30 a 1000 °C



Fonte: Arquivo pessoal

As imagens de MEV acopladas com EDS possibilitaram evidenciar a morfologia e determinar a composição qualitativa das MgO NPs, AE e MgO-AE. As imagens de MEV das MgO NPs obtidas nesse trabalho (Figura 18a) estão em concordância com a Figura 11b, revelando a formação das MgO NPs. Essas nanopartículas encontram-se uniformes e agregadas formando uma estrutura supramolecular com superfície rugosa. A Figura 18b contém o gráfico de EDS e em destaque os valores percentuais das composições indicando a formação das MgO NPs.

Figura 18 - (a) MEV das MgO NPs; (b) Análise de EDS das MgO NPs e resultado qualitativo da análise química de EDS



Fonte: Arquivo pessoal

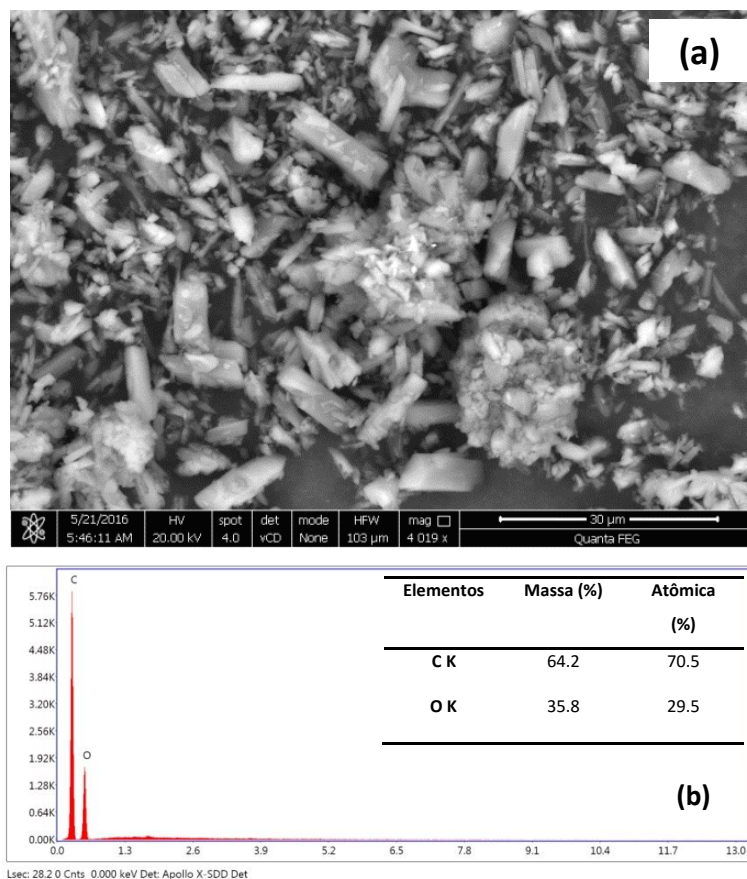
A técnica de DRX permitiu estimar o diâmetro médio do cristalito do MgO-900 (Figura 16) com valor de 25,2 nm, usando a equação de Debye-Scherrer, como apresentado na Equação 7, onde K é um fator de forma adimensional, com valor próximo da unidade, que depende da forma das partículas, o valor para estruturas cúbicas e hexagonais é de 0,89, o λ é o comprimento de onda de cobalto (1.7902 Å), θ é o ângulo de difração de Bragg do pico DRX, β é a largura à meia altura (FWHM) em radiano (VIJAYALAKSHMI; RAJENDRAN, 2012; VATSHA *et al.*, 2013; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2012).

$$D = \frac{0,89\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (7)$$

A Figura 19a ilustra a imagem de MEV para o AE, que apresentou estrutura cristalina não uniforme, com boa concordância com a técnica de DRX. Os cristais de AE se caracterizam por estruturas não organizadas com bastões de tamanhos variados na escala micro.

A Figura 19b apresenta o gráfico de EDS e os valores percentuais em destaque confirmando, qualitativamente, a presença do C e O, no qual os altos valores percentuais apontam para um composto de pureza.

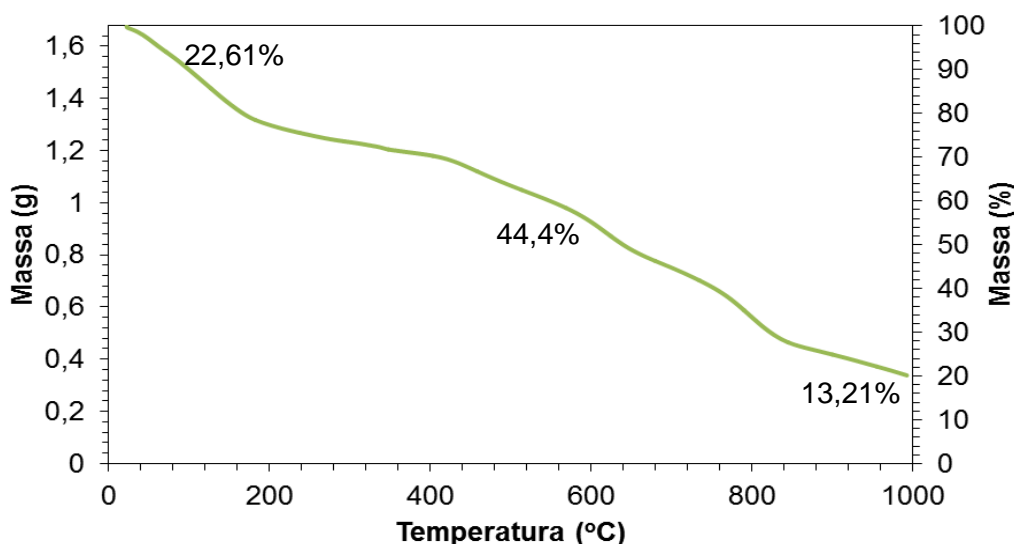
Figura 19 - (a) MEV do AE; (b) Análise de EDS do AE e resultado qualitativo da análise química de EDS



Fonte: Arquivo pessoal

A estabilidade térmica e a perda de massa em diferentes temperaturas do material híbrido MgO-AE (Figura 20) foram avaliadas utilizando a análise termogravimétrica. Na curva de TG do MgO-AE observou-se uma perda em porcentagem de massa de 22,62%, no intervalo de 0-200 °C, referente à perda de água fisissorvida e quimissorvida. É interessante colocar que a decomposição do AE foi reportada por Li *et al.*, 2015 e Arulmozhi et al., 2013 observando uma perda brusca de massa total do composto em 632 °C. Comparando este resultado com a curva de TG obtida para o material híbrido MgO-AE, no intervalo de 200-800 °C, observou-se uma perda de massa gradativa de 44,4% referente à massa do AE e conversão do Mg(OH)₂ a MgO, indicando aumento da estabilidade térmica do material híbrido nanoestruturado, devido a forte interação entre as MgO NPs e o AE. Essa perda de massa indicou pouca conversão de MgO para Mg(OH)₂, a massa resultante foi de 13,21% de MgO indicando que 7,8% converteu-se em Mg(OH)₂, correspondendo a relação em massa da reação 1AE: 2MgO, no qual usou-se inicialmente 79% de AE e 21% de MgO NPs,

Figura 20 – Curva de TG para o nanomaterial híbrido MgO-AE, exibindo a variação da perda de massa em gramas e porcentagem, em temperatura de 30 a 1000 °C

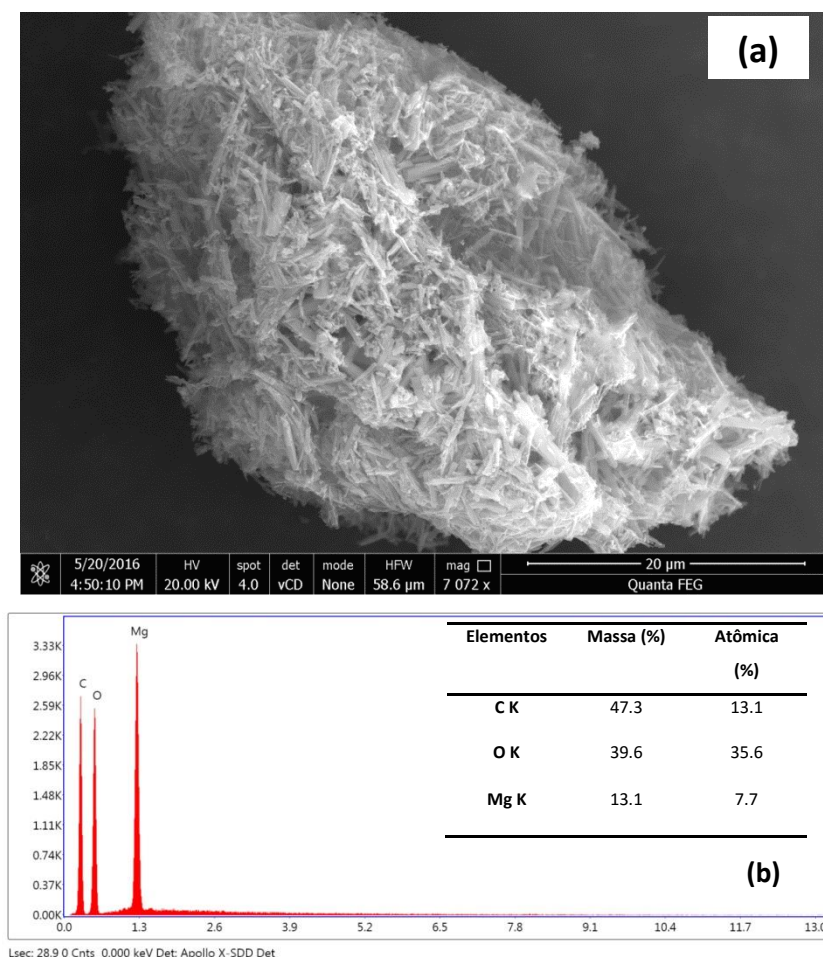


Fonte: Arquivo pessoal

A Figura 21a exibe as imagens de MEV para o material híbrido MgO-AE, revelando uma estrutura semicristalina formada pela interação química entre

MgO NPs e o AE. Essa estrutura apresentou superfície desorganizada com aglomerados semelhantes a hastes ou bastões, com tamanhos e formas não uniformes, de menor espessura, devido a forte interação entre as MgO NPs e o AE. Essa morfologia é significativamente diferente das estruturas do AE e MgO NPs isoladas. De acordo com a Figura 21b, o gráfico de EDS e em destaque os valores percentuais das composições, qualitativamente, indicaram a formação do material híbrido nanoestruturado a partir dos elementos encontrados, C; O e Mg.

Figura 21 - (a) MEV do nanomaterial híbrido MgO-AE; (b) Análise de EDS do MgO-AE e resultado semi quantitativo da análise química de EDS

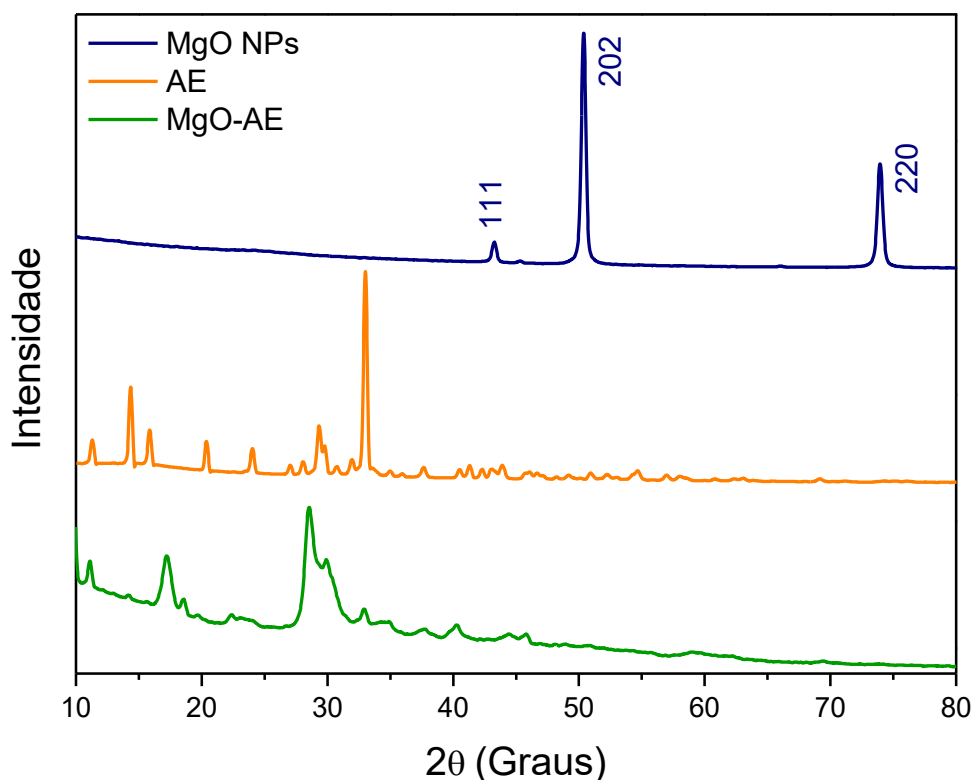


Fonte: Arquivo pessoal

A Figura 22 reporta os difratogramas das MgO NPs, AE e para o material híbrido MgO-AE. É possível observar que as MgO NPs apresentaram

uma estrutura cúbica altamente cristalina formada pela calcinação em temperaturas elevadas. O AE apresenta uma estrutura cristalina, no entanto, sua forma não é definida, como verificado na imagem de MEV. O DRX para o material híbrido MgO-AE exibiu uma estrutura com modificações, quando comparada ao AE isolado. Essa estrutura apresentou picos mais largos indicando a formação de uma estrutura semicristalina, possivelmente de interações químicas entre as MgO NPs e o AE. Propõe-se que nessa interação, os materiais são fortemente unidos por ligações de hidrogênio e o AE interage na superfície das MgO NPs, gerando uma estrutura semicristalina não uniforme. Essas novas ligações químicas (ligações de hidrogênio, e interações entre os grupos fenólicos do AE) provocam defeitos estruturais (centros F) nas MgO NPs, que será observado nos espectros de UV-Vis e nos grandes deslocamentos no espectro na região do infravermelho. Por fim, as interações químicas e físicas corroboram com a mudança de estrutura observada na morfologia do material a partir da MEV.

Figura 22 - Difratogramas de Raios X para MgO-900, AE e para o material híbrido MgO-AE



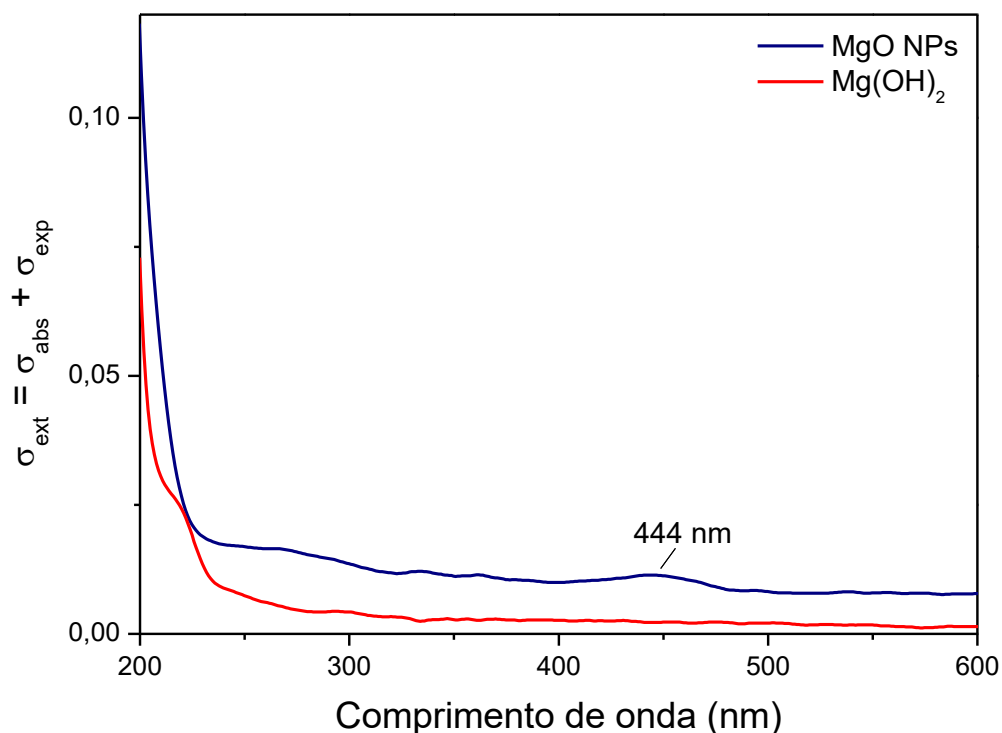
Fonte: Arquivo pessoal

4.2 Investigação Espectroscópica

A formação dos materiais foi investigada pela espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis e pela espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR).

Na Figura 23 encontram-se os espectros de absorção eletrônica das MgO NPs e do Mg(OH)₂. Confirmou-se a formação das MgO NPs pelo desaparecimento de uma pequena banda entre 220-240 nm correspondente ao Mg(OH)₂ (KHANOOKI; FAZILATI, 2014). Além de apresentar uma banda em 444 nm, essa banda é causada da transição eletrônica proveniente do aprisionamento de elétrons devido a perda dos 4 oxigênios coordenados ao magnésio. A presença de centros F afeta diretamente na interação que o material possui com a radiação ultravioleta, pois quanto maior o número de defeitos na superfície do cristal maior será o número de sítios para que as hidroxilas sejam adsorvidas à superfície (CHOUDHURY et al., 2013).

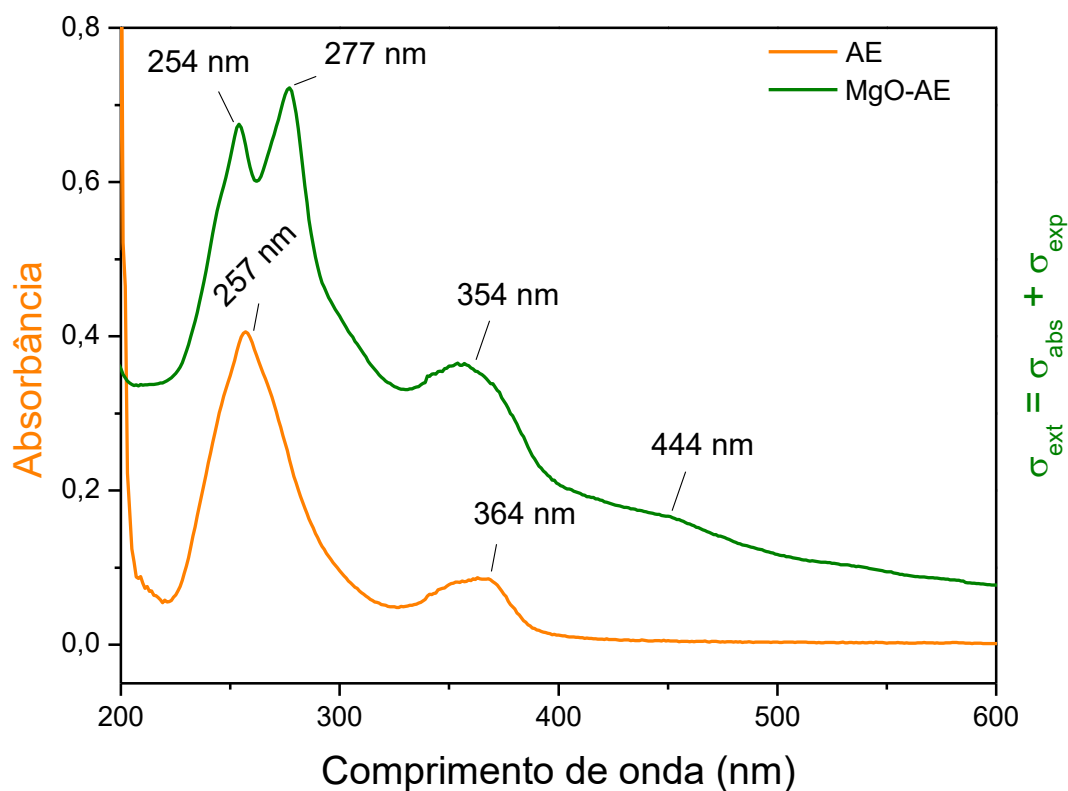
Figura 23 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis para as MgO NPs e Mg(OH)₂, na faixa de 200-600 nm



Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 24 encontram-se os espectros eletrônicos na região UV-Vis para o AE e material híbrido MgO-AE. O AE apresentou bandas de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ em 257 nm, correspondente à desprotonação de apenas uma hidroxila. As transições $\pi - \pi^*$ referentes às transições eletrônicas dos orbitais HOMO – LUMO são observadas em 364 nm. Esses orbitais estão deslocalizados em toda estrutura indicando que todos os anéis aromáticos contribuem para a transição (MAZZONE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010; SIMIC *et al.*, 2013).

Figura 24 - Espectros de absorção eletrônica na região do UV-Vis: AE ($3,74 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹) e MgO-AE ($1,75 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹) em água

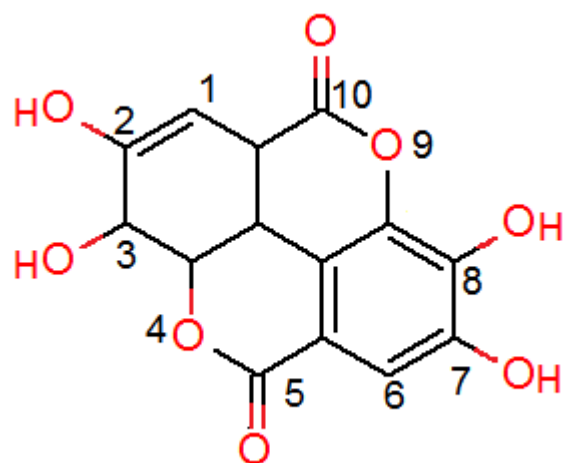


Fonte: Arquivo pessoal

O espectro do material híbrido MgO-AE apresentou absorções semelhantes com $\lambda_{\text{máx}}$ em 254 e 277 nm referentes a desprotonação das hidroxilas do C₃ e C₈ do AE, que são mais favoráveis a desprotonação do que as hidroxilas dos C₂ e C₈ do AE (Figura 25). De acordo com Simic (2013), a dissociação e formação de dianions (H₂A²⁻), podem ocorrer no AE em quatro

combinações possíveis. Considerando os valores ΔH_f e de carga atômica para o átomo de oxigênio, como ilustrado nas Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente, a desprotonação ocorre nesses carbonos, devido a baixa energia necessária para que ocorra a dissociação e formação dos diânions, que são afetados diretamente pelo pH da dispersão do material híbrido. A dispersão do MgO-AE apresentou pH igual a 7,32. Segundo Simic (2013), nesse pH inicia a segunda desprotonação, pois a primeira desprotonação ocorre em $\text{pH} > 4,29$ e a segunda desprotonação se inicia entre $6,09 < \text{pH} < 7,43$, e completa-se em $\text{pH} > 7,9$, e os valores de pK_a do AE correspondentes a esses pH são $\text{pK}_{a1} = 5,42 \pm 0,01$ e $\text{pK}_{a2} = 6,76 \pm 0,01$.

Figura 25 - Estrutura química do ácido elágico com carbonos numerados



Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 2 - Valores de ΔH_f correspondentes aos grupos OH do AE

Grupos OH	Valores de ΔH_f (KJ mol ⁻¹)
C ₃ e C ₈	1.325,7
C ₃ e C ₇	1.320,1
C ₂ e C ₇	1.320,0
C ₂ e C ₈	1.290,8

Fonte adaptada: Simic *et al.*, 2013

Tabela 3 - Valores de carga atômica para o átomo de oxigênio do AE

Ligação C-O	Tipo de ânion formado	Valores de carga atômica para o átomo de oxigênio
C ₂ – O	Monoânion	- 0,28
C ₂ – O	Diânion	- 0,30
C ₃ – O	monoânion	- 0,43
C ₃ – O	diânion	- 0,50
C ₇ – O	diânion	- 0,30
C ₈ – O	diânion	- 0,50

Fonte adaptada: Simic *et al.*, 2013

Além do processo de desprotonação a formação do material híbrido MgO-AE foi evidenciada pela absorção em 444 nm. Essa absorção se deve à transição dos 4 centros F coordenados do Mg²⁺O²⁻ (CHOUDHURY *et al.*, 2014).

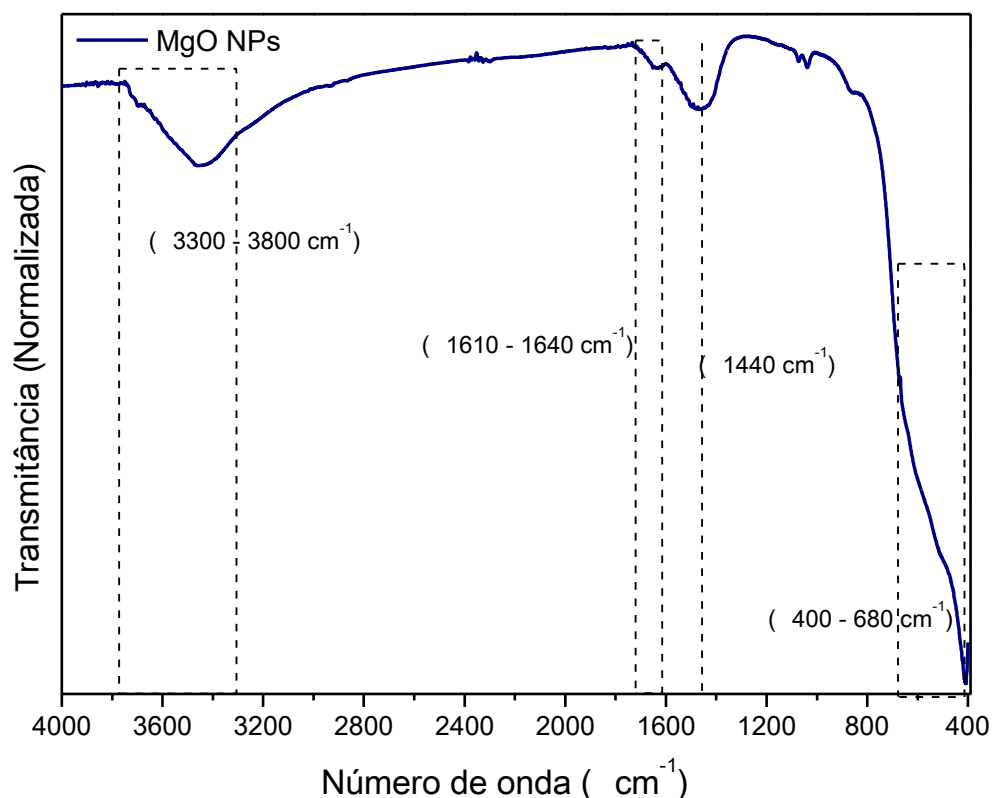
Observou-se ainda um aumento na linha de base característico da presença de materiais em baixa dimensionalidade, pois estas são capazes de promover a dispersão da luz. De acordo com a Teoria de Mie, a absorvância de luz total obtida ou coeficiente de extinção (σ_{ext}) é uma resultante do somatório das radiações absorvida e espalhada, como expressa a equação 8 (HORVATH, 2009; CARVALHO *et al.*, 2015; NUNES, 2014; SILVA, 2015; LOPES, 2015).

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{esp} \quad (8)$$

A presença dos centros F e formação do material também pôde ser investigada pelo FTIR. Na Figura 26, encontra-se o espectro de FTIR para as MgO NPs no qual observou-se indício de uma deformação δ Mg-O-Mg (400-680 cm⁻¹) que poderiam ser melhor observada se o aparelho possuísse um limite de detecção em números de onda inferiores a 400 cm⁻¹. O estiramento ν Mg-O

(1440 cm^{-1}) é referente à estrutura cúbica com centros F. A conversão das MgO NPs em $\text{Mg}(\text{OH})_2$ pode ser observada em $\nu\text{MgO-H}_2\text{O}$ ($1610\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$) referente a H_2O adsorvida à superfície do óxido e $\nu\text{O-H}$ ($3300\text{-}3800\text{ cm}^{-1}$) resultante da monocamada de MgOH^+ e das ligações de hidrogênio (ARMAGHAN; AMINI, 2014; MIRONYUK *et al.*, 2006).

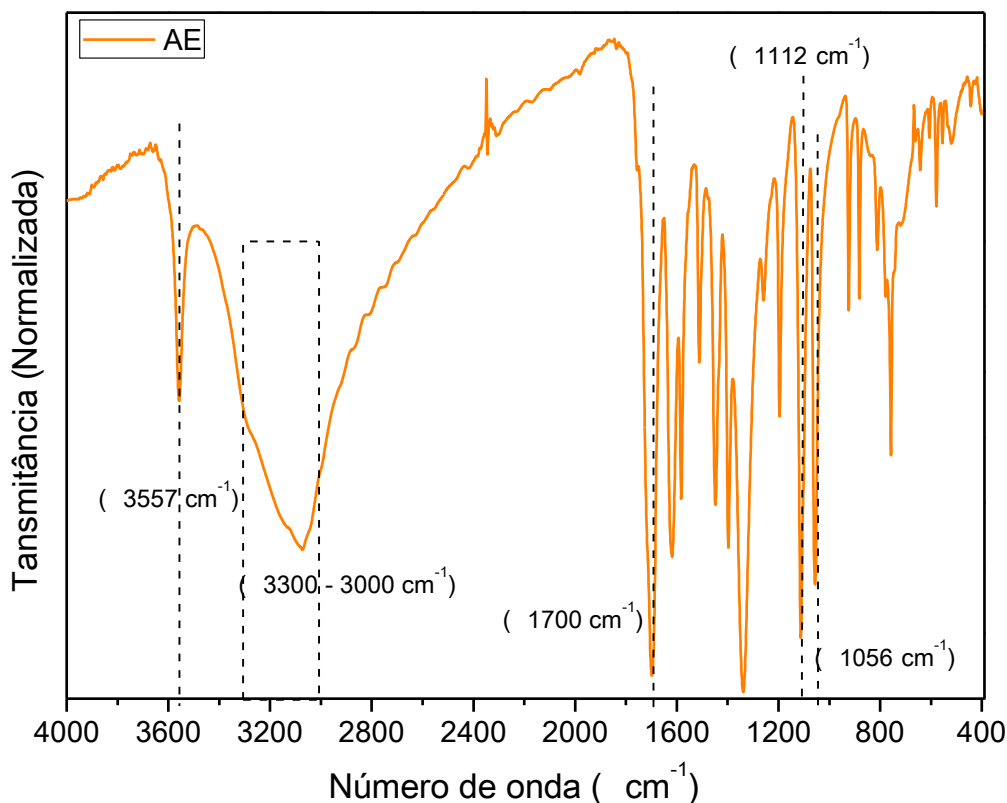
Figura 26 - Espectro vibracional na região do infravermelho para as MgO NPs em pastilha de KBr



Fonte: Arquivo pessoal

No espectro de FTIR do AE (Figura 27), os principais estiramentos foram: $\nu\text{O-H}$ (3557 cm^{-1}) de intensidade média, atribuído às hidroxilas livres; $\nu\text{O-H}$ ($3000 - 3300\text{ cm}^{-1}$) correspondente à ligação O-H ligados entre as moléculas do ácido, oriundos dos grupos fenóis; $\nu\text{C=O}$ (1700 cm^{-1}) oriundo do grupo da lactona; os $\nu\text{C-O}$ (1112 cm^{-1}) do grupo lactona e $\nu\text{C-O}$ (1056 cm^{-1}) formado pela desprotonação dos carbonos C_3 e C_8 do AE (HUSSEIN *et al.*, 2011; PRZEWLOKA; SHEARER, 2002).

Figura 27 - Espectro vibracional na região do infravermelho para o AE em pastilha de KBr

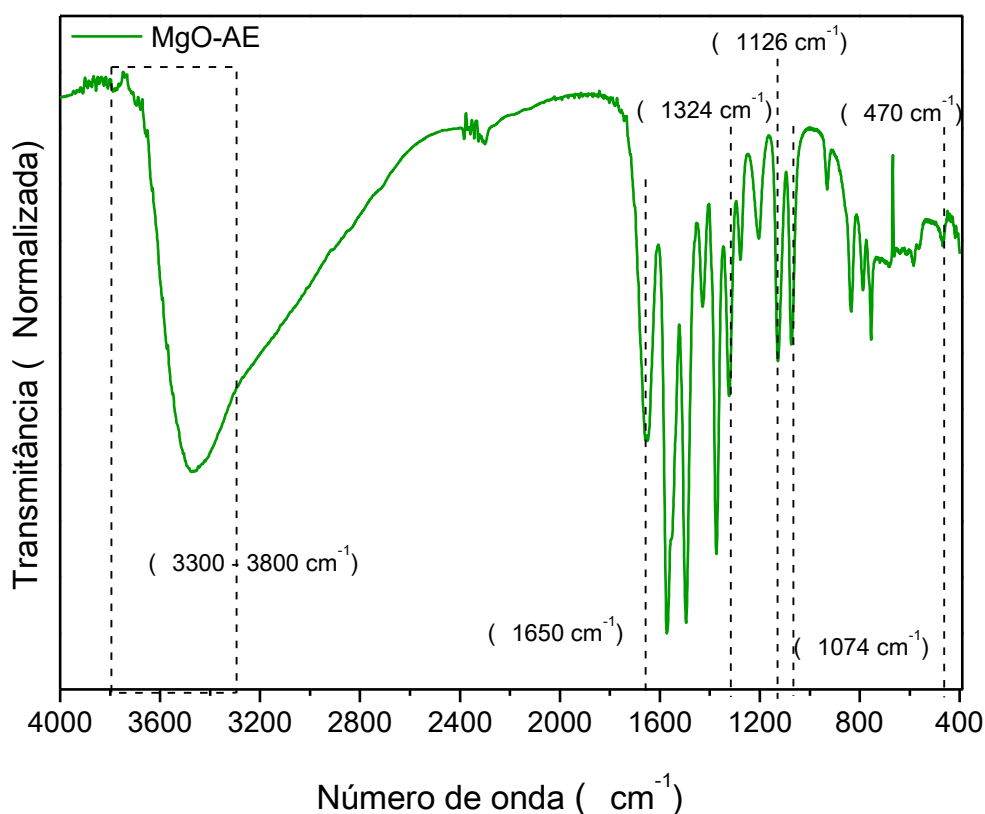


Fonte: Arquivo pessoal

Em comparação aos espectros dos precursores, o espectro de FTIR do material híbrido (Figura 28) apresentou mudanças significativas nos estiramentos resultante da interação química entre MgO NPs e o composto AE. Houve desaparecimento dos estiramentos referentes às hidroxilas livres, devido às interações existentes entre o ácido elágico e as MgO NPs. O material híbrido apresentou deslocamento do estiramento ν C-O (1126 cm^{-1}) do grupo lactona, para números de onda maiores, indicando que houve deslocalização das cargas resultando na forma ionizada do AE (PRZEWLOKA; SHEARER, 2002). O estiramento do grupo da banda da carbonila ν C=O (1650 cm^{-1}) sofreu deslocamento de 50 cm^{-1} para frequências menores, devido a diminuição do momento dipolo da ligação do grupamento lactona ocasionado por interações com as MgO NPs. A ligação Mg-O aparece em δ Mg-O (470 cm^{-1}), e as ligações C-O⁻, formadas pelo desprotonamento das hidroxilas nos carbonos C₃ e C₈ do AE aparecem em ν C-O⁻ (1074 cm^{-1}). O espectro na região do infravermelho

evidenciou que o AE está coordenado à camada inorgânica por átomos de oxigênio carregados negativamente dos agrupamentos fenólicos desprotonados, como também as carbonilas (C=O) das lactonas, pois ambos os grupos sofreram grandes deslocamentos no espectro (HUSSEIN *et al.*, 2011; PRZEWLOKA; SHEARER, 2002). Além disso, o material híbrido apresentou um deslocamento do estiramento para 3300 – 3800 cm^{-1} referente as $\nu\text{O-H}$ do AE que estão na mesma região do estiramento $\nu\text{O-H}$ das MgO NPs, sugerindo que a interação ocorra nestes grupamentos.

Figura 28 - Espectro vibracional na região do infravermelho para o MgO-AE em pastilha de KBr



Fonte: Arquivo pessoal

Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** encontram-se os estiramentos e deformações com as respectivas atribuições para as MgO NPs, AE e MgO-AE.

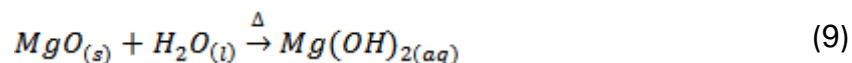
Tabela 4 – Atribuições para estiramentos e deformações do MgO, AE e MgO-AE

ESTIRAMENTOS			
E	MgO NPs	AE	MgO-AE
DEFORMAÇÕES			
$\delta Mg-O-Mg$	400-680 cm^{-1}	-	470 cm^{-1}
$\nu Mg-O$	1440 cm^{-1}	-	-
$\nu MgO-H_2O$	1610-1640 cm^{-1}	-	-
$\nu O-H$	3300-3800 cm^{-1}	3000 - 3300 cm^{-1}	3300 – 3800 cm^{-1}
$\nu O-H$ (livre)	-	3557 cm^{-1}	
$\nu C=O$	-	1700 cm^{-1}	1650 cm^{-1}
$\nu C-O$ (lactona)	-	1112 cm^{-1}	1126 cm^{-1}
$\nu C-O$	-	1056 cm^{-1}	1074 cm^{-1}
(desprotonação C₃ e C₈)			

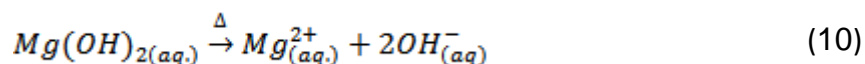
Fonte: Arquivo pessoal

Segundo Hussein e colaboradores (2011), acredita-se que a formação do material híbrido ocorra pelo mecanismo de dissociação – deposição. Este mecanismo é constituído de três etapas:

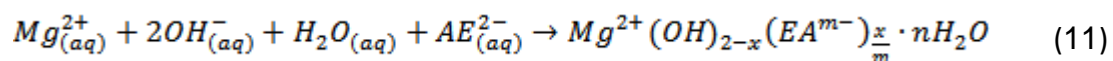
1. Formação da monocamada de Mg(OH)₂ NPs sobre a superfície das MgO NPs



2. Formação dos Mg²⁺ proveniente da dissociação das Mg(OH)₂ NPs



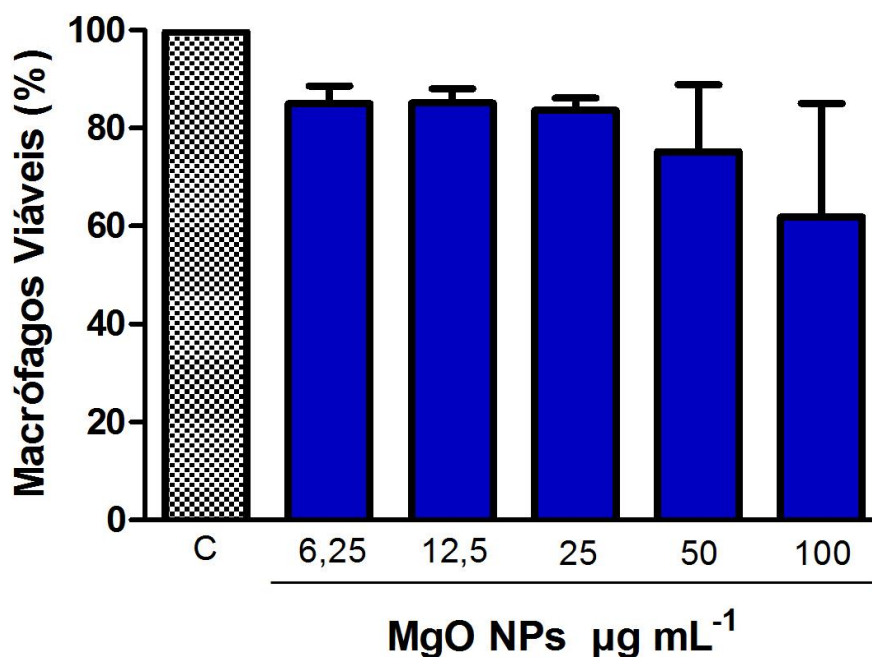
3. Reação entre Mg²⁺, OH⁻, H₂O e AE²⁻ produzindo um material híbrido em camadas



4.3 Avaliação das Atividades Citotóxica e Antileishmania

Investigou-se a citotoxicidade das MgO NPs, AE e do material híbrido sobre os macrófagos peritoneais murinos utilizando o teste de MTT, avaliando as concentrações entre 6,25 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 29, Figura 30 e Figura 31). Observou-se que a citotoxicidade das MgO NPs (Figura 29) não apresentaram diferença estatística significativa e revelaram uma relação dose-dependente das nanopartículas. O valor calculado de CC_{50} para as MgO NPs foi de 425 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ensaio citotóxico realizado por Jebali e Kazemi (2013) com MgO NPs em células de ratos, indicaram a viabilidade celular de 60% próximo a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em comparação, o composto MgO apresentou um efeito citotóxico mais moderado. Os mecanismos de destruição de células peritoneais ainda não são bem compreendidos, embora admita-se que o principal efeito seja a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em meio vivo. As ERO constituem-se de espécies químicas (principalmente o $OH\cdot$ e $O_2\cdot$) com elétrons desemparelhados instáveis. Esses radicais por serem muito reativos, são capazes de reagir com moléculas de proteínas, açúcares, lipídeos e ácidos nucleicos, levando a destruição da membrana e núcleo celular, promovendo a morte das células (VATTEM; SHETTY, 2005).

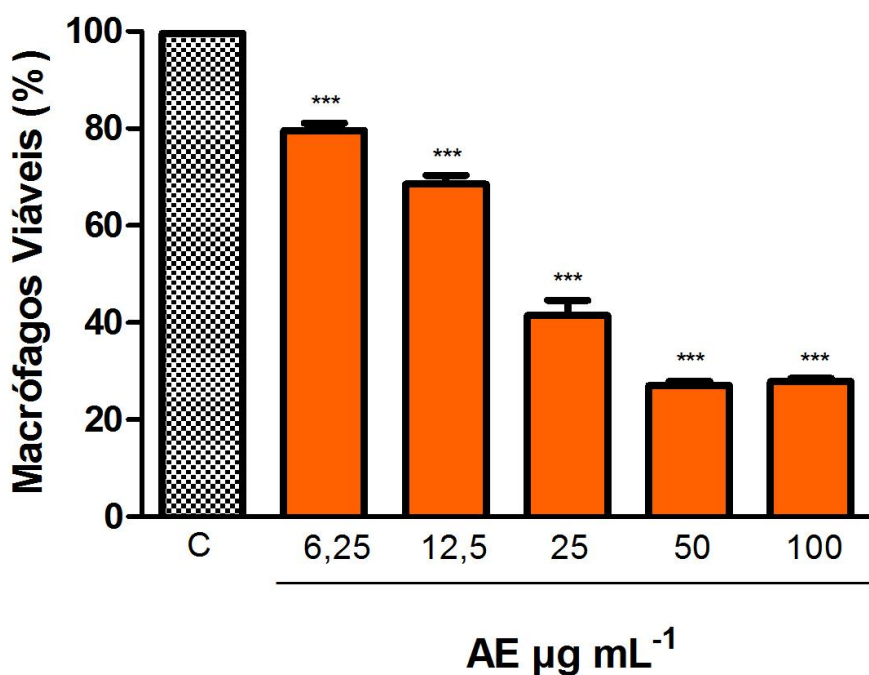
Figura 29 - Efeito das MgO NPs sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. Valores em média \pm desvio padrão da média, *** $p < 0,0001$



Fonte: Arquivo pessoal

O AE (Figura 30) exibiu elevada citotoxicidade (relação dose-dependência) nas concentrações avaliadas principalmente nas concentrações ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) no qual menos de 30% dos macrófagos permaneceram viáveis. O valor calculado de CC_{50} para o AE foi de $23,81 \mu\text{g mL}^{-1}$. Embora seja relatado o efeito benéfico do AE na literatura, como o seu efeito anticancerígeno, bactericida, e antioxidante, o ácido elágico, devido sua cadeia apolar, é capaz de migrar pela cadeia lipídica das células. Nesse processo, ocorre a inativação de proteínas e quelação de íons que são indispensáveis ao funcionamento dos macrófagos e consequente apoptose dos mesmos (VATTEM; SHETTY, 2005; GARCÍA-NIÑO; ZAZUETA, 2015).

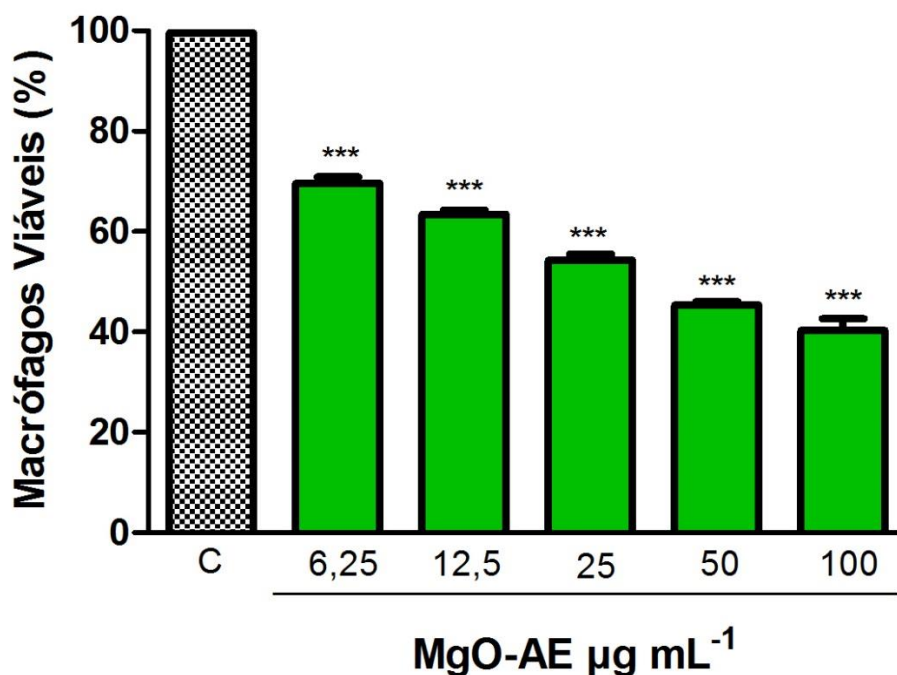
Figura 30 - Efeito do AE sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. Valores em média \pm desvio padrão da média, *** $p < 0,0001$



Fonte: Arquivo pessoal

O material híbrido nanoestruturado MgO-AE (Figura 31) embora apresentando elevada citotoxicidade nas concentrações testadas, apresentou uma diminuição da citotoxicidade quando comparado com AE, devido ao incremento das MgO NPs na composição. O AE, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, reduziu o número de macrófagos viáveis para 30%, enquanto que as MgO-AE, reduziram para 40% nas mesmas condições. O valor calculado de CC_{50} para o MgO-AE foi de 38,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

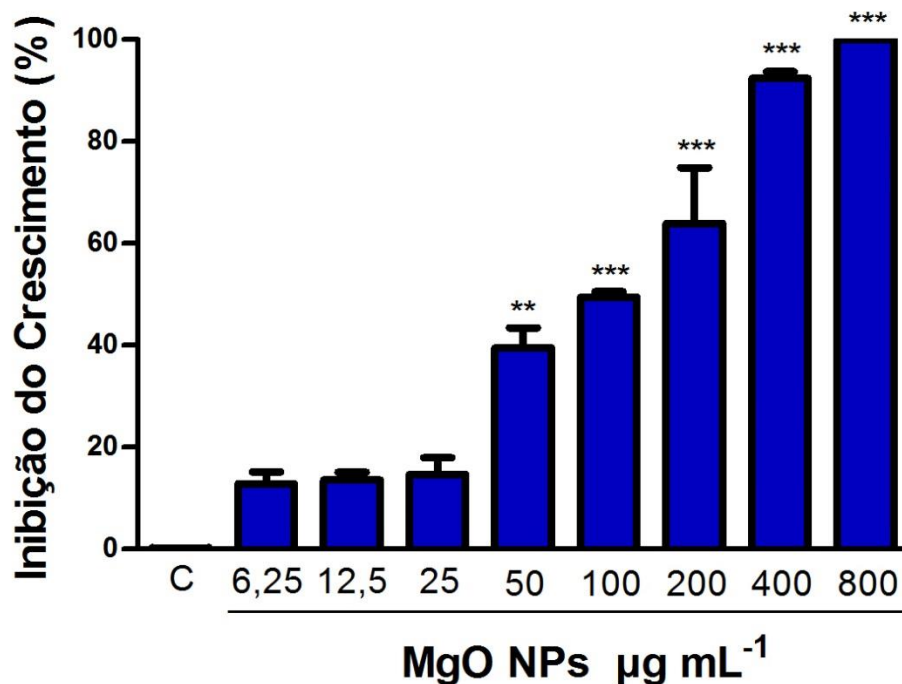
Figura 31 - Efeito do material híbrido nanoestruturado MgO-AE sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. Valores em média \pm desvio padrão da média, *** $p < 0,0001$



Fonte: Arquivo pessoal

Após analisar a citotoxicidade foi investigada a atividade antileishmania, utilizando o método colorimétrico, com corante AlamarBlue[®], analisando o comportamento dos protozoários na presença das MgO NPs, do AE e do material híbrido MgO-AE. Para as MgO NPs observou-se (Figura 32) que os protozoários apresentaram inibição total do crescimento para a concentração de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ e que ao reduzir a concentração pela metade ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) houve apenas uma pequena redução na inibição do crescimento para 92,72 %. Comparado ao controle a inibição mostrou-se significativa até a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor de IC_{50} calculado para as MgO NPs foi de $80,33 \mu\text{g mL}^{-1}$.

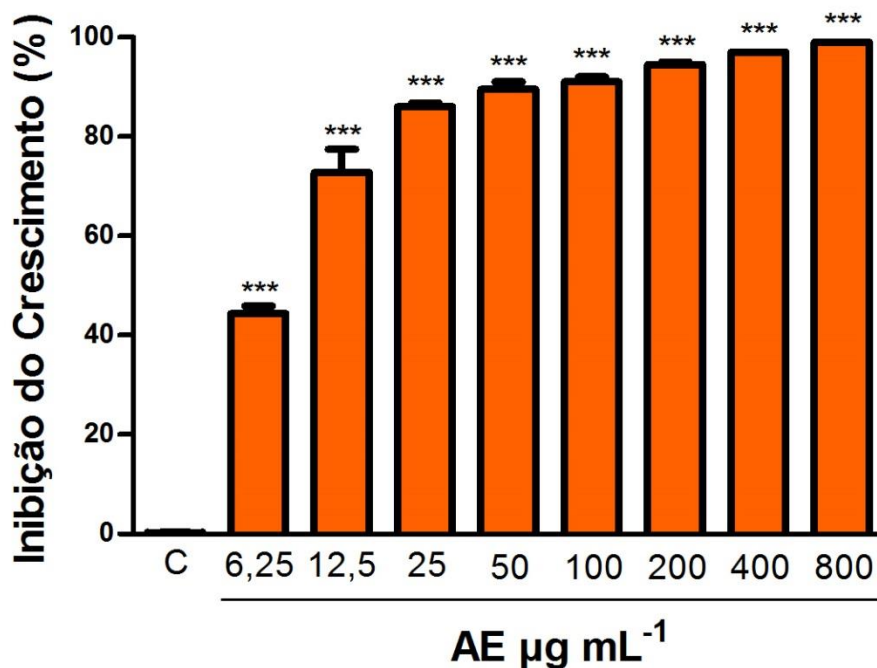
Figura 32 - Efeito inibitório das MgO NPs sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações. Valores em média \pm desvio padrão da média, *** $p < 0,0001$



Fonte: Arquivo pessoal

O AE (Figura 33) apresentou boa ação contra os protozoários do gênero *Leishmania*. O perfil inibitório foi significativo em todas as concentrações testadas, obtendo inibição total na maior concentração (800 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O valor de IC_{50} calculado para o AE foi de 3,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

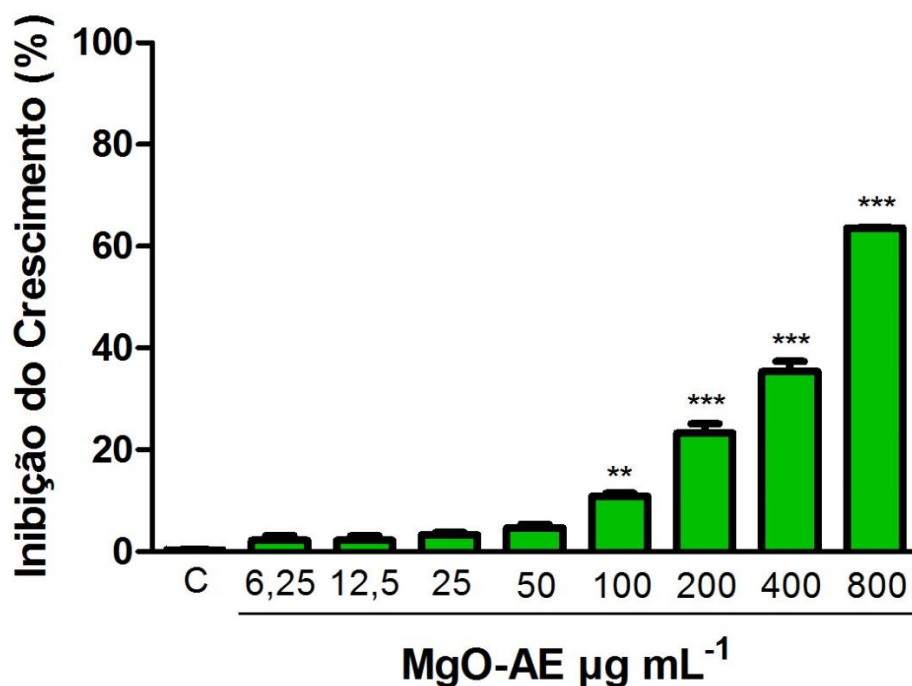
Figura 33 - Efeito inibitório do AE sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações. Valores em média \pm desvio padrão da média, ***p < 0,0001



Fonte: Arquivo pessoal

No entanto, como apresentado na Figura 34, o material híbrido MgO-AE não exibiu inibição total de crescimento contra os protozoários em nenhuma das concentrações testadas. Na maior concentração de MgO-AE, verificou-se uma inibição de 64,62 %. O valor de IC_{50} calculado para o material híbrido foi de $637,58 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que sugere uma redução da eficiência do material híbrido em baixas concentrações, necessitando de concentrações elevadas para inibir o crescimento de pelo menos 50% dos protozoários.

Figura 34 - Efeito inibitório do material híbrido nanoestruturado MgO-AE sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações. Valores em média \pm desvio padrão da média, ***p < 0,0001



Fonte: Arquivo pessoal

Além disso, por meio das concentrações de inibição de crescimento (IC_{50}) e pelas concentrações de citotoxicidade (CC_{50}) foi possível calcular o Índice de seletividade (IS), pelo qual determinou-se a seletividade dos materiais para causar mais danos aos parasitas do que aos macrófagos (Equação 12). Os valores de IS para as MgO NPs, o AE e o MgO-AE foram expostos na Tabela 5, juntamente com os ensaios descritos na literatura para anfotericina B, fármaco tradicional administrado no tratamento da doença.

$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}} \quad (12)$$

Tabela 5 - Valores de CC50 para macrófagos e IC50 para formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e seus respectivos índices de seletividade (IS)

	Macrófagos CC ₅₀	Promastigotas IC ₅₀	IS
	$10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$		
MgO NPs	10 625	2008, 25	5,29
AE	78, 841	12, 05	6,54
MgO-AE	99, 87	1669, 06	0,06
Anfotericina B*	14	0,2	70

Fonte: Arquivo pessoal

*Anfotericina B testado na forma amastigota (DAS et al., 2013)

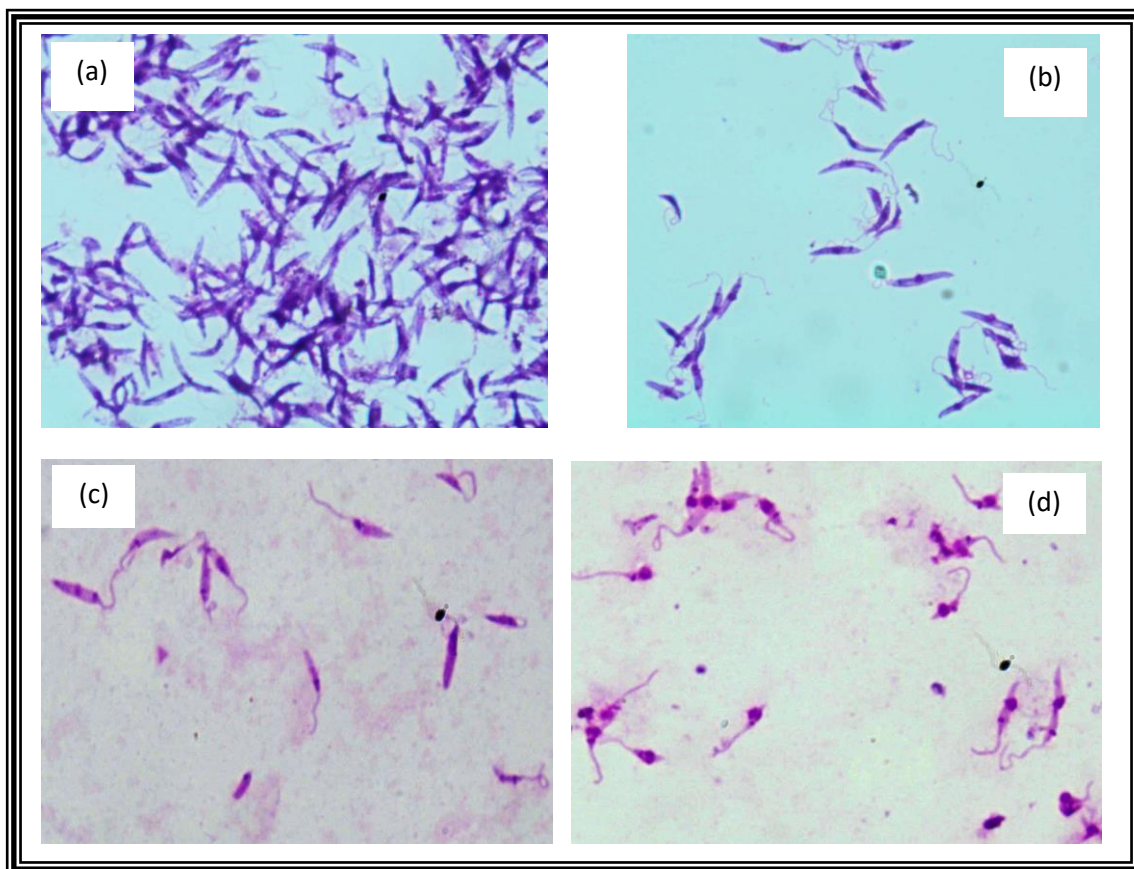
Os dados aqui reportados indicam que os materiais utilizados nos estudos apresentaram uma baixa capacidade de lesar células de ratos, quando comparados a anfotericina B. Analisando-se o índice de seletividade, os materiais apontam baixa especificidade, e conseqüentemente pouca diferenciação com combate ao protozoário e indução a apoptose de células peritoneais.

É descrito na literatura, que tanto o MgO NPs quanto o AE, apresentam efeito antileishmania nas suas formas livres. Esperava-se neste trabalho, que o material híbrido apresentasse um efeito sinérgico na aniquilação dos protozoários. De fato, a forte interação química existente entre o óxido e o ácido contribuem para a diminuição da atividade antileishmania. Reporta-se que o AE deve estar livre para penetrar pela camada lipídica e modificar o fluxo de íons no citosol, devido a sua capacidade de quelar íons metálicos, bem como impedir a cadeia de reações da enzima topoisomerase II do protozoário. Como indicado pelas técnicas espectroscópicas, as principais interações do ácido elágico com o MgO NPs ocorreram nos grupos hidroxila e carbonila, principais sítios de interação do AE com os metais e enzimas do patógeno. No modelo proposto, o AE estaria impedido de modificar o ciclo metabólico do protozoário, pelo bloqueio dos seus sítios ativos pelo MgO, diminuindo assim, sua seletividade.

O efeito da atividade antileishmania pôde ser visualizado pelas micrografias apresentadas na Figura 35, onde os protozoários, em presença das MgO NPs e do AE mantiveram sua morfologia, assim como no controle. Na presença do material híbrido observou-se a aparência incomum de alguns protozoários em determinados pontos da imagem, sugerindo que houve o rompimento de suas membranas.

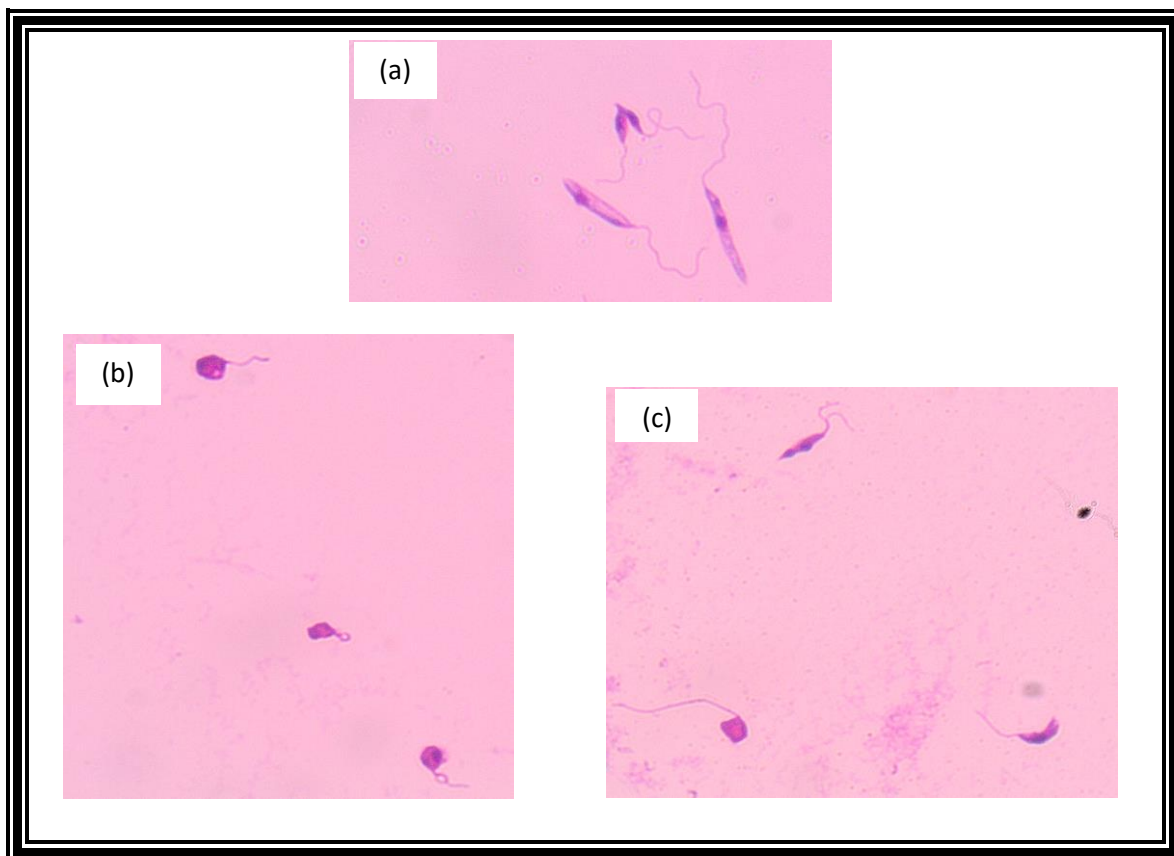
LOPES (2015), apresentou um trabalho semelhante pertencente ao grupo do Laboratório de Automontagem Supramolecular (LAS), em que foram utilizadas nanopartículas metálicas (AgNPs) com matriz estabilizante de ácido tânico (AT) aplicada com a mesma finalidade. Em comparação, observou-se que as AgNPs (Figura 36) apresentaram uma melhor atividade antileishmania do que as nanopartículas de óxido metálicos (MgO NPs) e maior nitidez na modificação da aparência dos protozoários. Esse efeito deve ser resultante da capacidade de oxidação das nanopartículas metálicas, que causa maiores danos às membranas, enzimas e DNA dos protozoários (JEBALI; KAZEMI, 2013).

Figura 35 - Micrografias da cultura de parasitos (a) no grupo controle, (b) exposta ao AE, (c) exposta a MgO NPs e (d) exposta ao MgO-AE. Aumento de 100x e corante hematológico panótico rápido



Fonte: Arquivo Pessoal

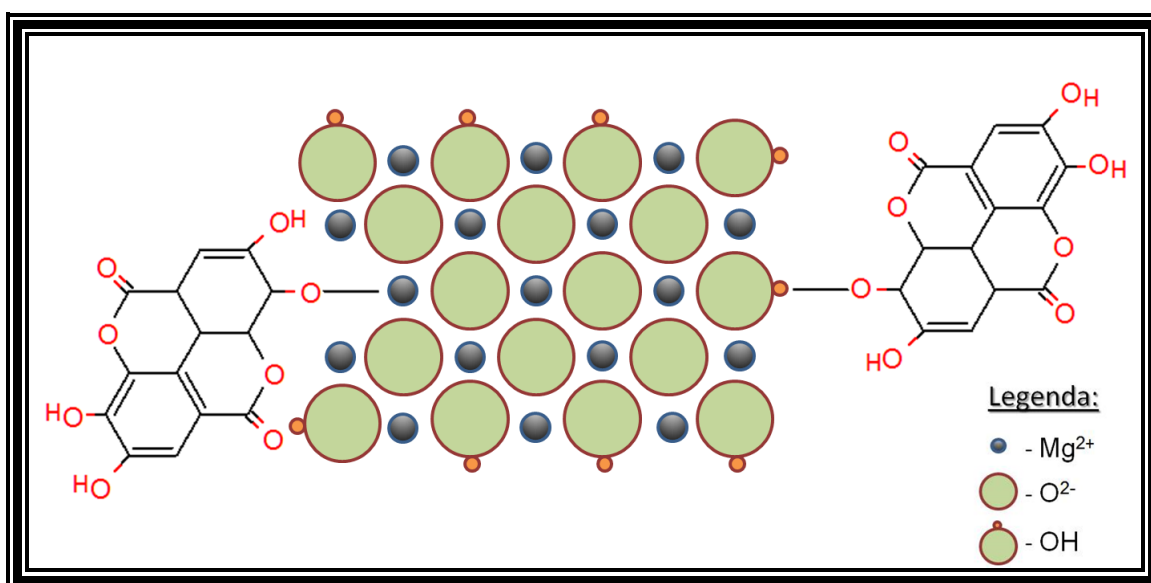
Figura 36- Micrografias da cultura de parasitos (a) no grupo controle, (b) exposta a AgNPs-AT e (c) exposta a AgNPs. Aumento de 100x e corante hematológico panótico rápido



Fonte adaptada: LOPES, 2015

Por fim, com base nas técnicas utilizadas para investigar a estrutura, cristalinidade, formação do material híbrido e principalmente pela atividade antileishmania foi possível propor um mecanismo de interação entre os materiais, como representado na Figura 37. Que a ligação entre os materiais pode ocorrer entre camada de $Mg(OH)_2$ formada na superfície das MgO NPs por meio de interações intermoleculares, como as ligações de hidrogênio, e ligações químicas entre os grupos fenólicos e carbonilas do AE, que provocam defeitos estruturais (centros F) nas MgO NPs, como foi observado nos espectros de UV-Vis e nos grandes deslocamentos no espectro na região infravermelho.

Figura 37 - Possíveis interações entre as MgO NPs e o AE



Fonte: Arquivo pessoal

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estabilidade e composição do material híbrido foi verificado por TG, na qual se verificou que as MgO NPs sintetizadas apresentaram uma camada de Mg(OH)₂, que representa 20,5% da massa total, sendo a temperatura de 900 °C eficiente para a formação das MgO NPs. O DRX demonstrou que as MgO NPs calcinadas a 900 °C possuem estrutura cúbica, e com a equação de Debye-Scherrer, estimou-se que o cristalito das MgO NPs possuem um diâmetro médio de 25,2 nm. Ainda com a técnica, determinou-se que o material híbrido (MgO-AE), possui uma estrutura semi-cristalina, diferente do AE e das MgO NPs isolados. Essas modificações foram verificadas com a microscopia eletrônica de varredura acoplada com EDS (MEV/EDS), indicando que as MgO NPs constituem-se de partículas uniformes e agregadas, formando uma estrutura com superfície rugosa. O material híbrido MgO-AE revelou uma estrutura semicristalina superficialmente desorganizada com aglomerados semelhantes a hastes ou bastões, com tamanhos e formas não uniformes, de menor espessura, devido a forte interação entre as MgO NPs e o AE.

A espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-Vis evidenciou a formação das MgO NPs pelo desaparecimento da banda característica do Mg(OH)₂ e confirmou que houve desprotonação de hidroxilas dos carbonos C₃ e C₈ do AE. O espectro vibracional na região do infravermelho, apresentou um deslocamento na banda C-O para frequências menores, e a presença de ligação Mg-O, indicando que os principais sítios de interação entre as nanopartículas e o polifenol ocorrem entre as hidroxilas desprotonadas e carbonila do AE com a monocamada MgOH⁺.

Os testes de citotoxicidade evidenciaram elevada atividade citotóxica para o AE e a sua modificação por MgO NPs, reduziu seu efeito em células viáveis de murinos. Observou-se, pela avaliação da atividade antileishmania *in vitro*, que os protozoários de *L. amazonensis* foram resistentes na presença do MgO-AE, havendo inibição apenas em concentrações mais elevadas. Em comparação com a anfotericina B, os materiais causaram menos danos as células de ratos e pelo índice de seletividade os materiais apontaram baixa especificidade não havendo diferenciação ao combater os protozoários e induzir a apoptose das células peritoneais.

O impedimento do AE em modificar o ciclo metabólico do protozoário, que ocorre pelo bloqueio dos seus sítios ativos pelas MgO NPs, resultando na diminuição da seletividade justifica o modelo que propõe os sítios de interação do AE com as MgO NPs.

Perspectivas

6 PERSPECTIVAS

As perspectivas futuras do presente trabalho consistem em:

- Investigar a morfologia e arranjo supramolecular das MgO NPs, Mg(OH)₂ e MgO-AE por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Investigar os sítios de interação entre MgO e AE por modelagem computacional utilizando Teoria do Funcional da Densidade (DFT);
- Modificar a síntese para que as MgO NPs e o AE tenham interações físicas ou fracas interações, com o objetivo de tentar permitir que as hidroxilas do AE fiquem livres para interagirem com os metais e enzimas do patógeno;
- Publicação de artigo científico em periódico especializado.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHEBATI-MALEKI, L.; SALEKI, B.; BEHFAR, R.; SAEIDMANESH, H.; AHMADIAN, F.; SAREBANHASSANABADI, M.; NEGAHDARY, M. Designing a Hydrogen Peroxide Biosensor using Catalase and Modified Electrode with Magnesium Oxide Nanoparticles. **International Journal of Electrochemical Science**. V. 9, p. 275-271, 2014.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-1309, 2007.

AMARAL, L. F.; OLIVEIRA, I. R.; BONADIA, P.; SALOMÃO, R.; PANDOLFELLI, V.C. Chelants to inhibit magnesia (MgO) hydration. **Ceramics International**, v. 37, n. 5, p. 1537–1542, 2011.

AMARAL, L. F.; OLIVEIRA, I. R.; SALOMÃO, R.; FROLLINI, E.; PANDOLFELLI, V. C. Temperature and common-ion effect on magnesium oxide (MgO) hydration. **Ceramics International**, v. 36, n. 3, p. 1047–1054, 2010.

ANGELI, E.; BUZIO, R.; FIRPO, G.; MAGRASSI, R.; MUSSI, V.; REPETTO, L.; VALBUSA, U. Nanotechnology applications in medicine. **Tumori**, v. 94, n. 2, p. 206-215, 2008.

ARMAGHAN, M.; AMINI, M. M. Adsorption of diazinon and fenitrothion on nanocrystalline magnesium oxides. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

ARULMOZHI, V.; PANDIAN, K.; MIRUNALINI, S. Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles for drug delivery system in human oral cancer cell line (KB). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 313–320, 2013.

BAFGHI, A. F.; DAGHIGHI, M.; DALIRI, K.; JEBALI, A. Magnesium oxide nanoparticles coated with glucose can silence important genes of *Leishmania major* at sub-toxic concentrations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 300–304, 2015.

BAIOCCO, P.; COLOTTI, G.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603-2612, 2009.

- BARKALINA, N.; CHARALAMBOUS, C.; JONES, C.; COWARD, K. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 5, p. 921-938, 2014.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BAUMANN, S. O.; SCHNEIDER, J.; STERNIG, A.; THOMELE, D.; STANKIC, S.; BERGER, T.; GRÖNBECK, H.; DIWALD, O. Size effects in MgO cube dissolution. **Langmuir**, v. 31, p. 2770–2776, 2015.
- BHOSALE, R. R.; KULKARNI, A. S.; GILDA, S. S.; ALOORKAR, N. H.; OSMANI, R. A.; HARKARE, B. R. Innovative eco-friendly approaches for green synthesis of silver nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 2328-2337, 2014.
- BOISSON, S.; ENGELS, D.; GORDON, B. A.; MEDLICOTT, K. O.; NEIRA, M. P.; MONTRESOR, A.; SOLOMON, A. W.; VELLEMAN, Y. Water, sanitation and hygiene for accelerating and sustaining progress on neglected tropical diseases: a new Global Strategy 2015–20. **International health**, v. 8, n. suppl 1, p. i19-i21, 2016.
- BUSSERON, E.; RUFF, Y.; MOULIN, E.; GIUSEPPONE, N. Supramolecular self-assemblies as functional nanomaterials. **Nanoscale**, v. 5, n. 16, p. 7098-7140, 2013.
- CALDEIRA, L. R.; FERNANDES, F. R.; COSTA, D. F.; FRÉZARD, F.; AFONSO, L. C. C.; FERREIRA, L. A. M. Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, p. 125-131, 2015.
- CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A.; SANTANA, L. C. L. R.; SOUSA, A. P. L.; NETO, J. M. M.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 111-116, 2012.
- CARVALHO, C. L. C.; SILVA, A. T. B.; MACEDO, L. J. A.; LUZ, R. A. S.; MOITA NETO, J. M.; RODRIGUES FILHO, U. P.; CANTANHÊDE, W. New hybrid nanomaterial based on self-assembly of cyclodextrins and cobalt prussian blue analogue nanocubes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14594-14607, 2015.

CHOUDHURY, B.; BASYACH, P.; CHOUDHURY, A. Monitoring F^- , F^+ and F_2^{2+} related intense defect emissions from nanocrystalline MgO. **Journal of Luminescence**, v. 149, p. 280–286, 2014a.

CHOUDHURY, B.; CHOUDHURY, A. Microstructural, optical and magnetic properties study of nanocrystalline MgO. **Materials Research Express**, v. 1, n. 2, p. 025026, 2014.

D'ALESSANDRO, S.; BASILICO, N.; CORBETT, Y.; SCACCABAROZZI, D.; OMODEO-SALÈ, F.; SARESELLA, M.; MARVENTANO, I.; VAILLANT, M.; OLLIARO, P.; TARAMELLI, D. Hypoxia modulates the effect of dihydroartemisinin on endothelial cells. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 476-484, 2011.

DANIEL, E. M.; KRUPNICK, A. S.; HEUR, Y.-H.; BLINZLER, J. A.; NIMS, R. W.; STONER, G. D. Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. **Journal of food composition and analysis**, v. 2, n. 4, p. 338-349, 1989.

DAS, S.; ROY, P.; MONDAL, S.; BERA, T.; MUKHERJEE, A. One pot synthesis of gold nanoparticles and application in chemotherapy of wild and resistant type visceral leishmaniasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 27-34, 2013.

DESJEUX, P. Global control and Leishmania HIV co-infection. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 317-325, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

FAKHRI, A.; ADAMI, S. Adsorption and thermodynamic study of Cephalosporins antibiotics from aqueous solution onto MgO nanoparticles. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 3, p. 1001–1006, 2014.

FEIZ-HADDAD, M.-H.; KASSIRI, H.; KASIRI, N.; PANAHANDEH, A.; LOTFI, M. Prevalence and epidemiologic profile of acute cutaneous leishmaniasis in an endemic focus Southwestern Iran. **Journal of Acute Disease**, v. 4, n. 4, p. 292-297, 2015.

FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M.C.M.; PIMENTA, A.M.C.; FERREIRA, W.A.; DE MELO, J.E.; MANGRUM, J.B.; DEMICHELI, C. New

insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonite and sodium stibogluconate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 656–665, 2008.

GARCÍA-NIÑO, W. R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 84-103, 2015.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

HORVATH, H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 110, n. 11, p. 787-799, 2009.

HOTEZ, P. J. A plan to defeat neglected tropical diseases. **Scientific American**, v. 302, n. 1, p. 90-96, 2010.

HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MOLYNEUX, D. H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1570-1575, 2009.

HUSSEIN, M. Z.; ALI, S. H. A.; ZAINAL, Z.; HAKIM, M. N. Development of antiproliferative nanohybrid compound with controlled release property using ellagic acid as the active agent. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 1373–1383, 2011.

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.

JUTZ, G.; BÖKER, A. Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks – A new class of nanomaterials. **Polymer**, v. 52, n. 2, p. 211-232, 2011.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; UEZATO, H.; MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **Internacional Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 814-826, 2010.

KHANOOKI, T. A.; FAZILATI, M. The toxicity effect of magnesium oxide nanoparticles. **Advances in Environmental Biology**, v. 8, n. June, p. 969–973, 2014.

KICKELBICK, G. Introduction to hybrid materials. Hybrid materials: Synthesis, characterization, and applications. **Wiley-VCH**, Weinheim, 2007.

KRISHNAMOORTHY, K.; MANIVANNAN, G.; KIM, S.J.; JEYASUBRAMANIAN, K.; PREMANATHAN, M. Antibacterial activity of MgO nanoparticles based on lipid peroxidation by oxygen vacancy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, p. 1063, 2012.

LI, S.; ZHOU, B.; REN, B.; XING, L.; TAN, L.; DONG, L.; LI, J. Preparation of MgO nanomaterials by microemulsion-based oil/water interface precipitation. **Materials Letters**, v. 171, p. 204-207, 2016.

LI, Y.; ZHAO, X.; ZU, Y.; ZHANG, Y.; GE, Y.; ZHONG, C.; WU, W. Preparation and characterization of micronized ellagic acid using antisolvent precipitation for oral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 486, n.1, p. 207-216, 2015.

LOPES, L. C. da S. **Rota verde para a síntese de nanopartículas metálicas utilizando ácido tânico: Caracterização e avaliação das atividades antileishmania e citotóxica**. 2015, 82 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Piauí, 2015.

MAZZONE, G.; TOSCANO, M.; RUSSO, N. Density functional predictions of antioxidant activity and UV spectral features of nasutin A, isonasutin, ellagic acid, and one of its possible derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9650–9657, 2013.

MESHKANI, F.; REZAEI, M. Facile synthesis of nanocrystalline magnesium oxide with high surface area. **Powder Technology**, v. 196, n. 1, p. 85-88, 2009.

MIRONYUK, I. F.; GUN'KO, V. M.; POVAZHNYAK, M. O.; ZARKO, V. I.; CHELYADIN, V. M.; LEBODA, R.; SKUBISZEWSKA-ZIEBA, J.; JANUSZ, W. Magnesia formed on calcination of Mg(OH)₂ prepared from natural bischofite. **Applied Surface Science**, v. 252, p. 4071–4082, 2006.

NAHDI, K.; ROUQUEROL, F.; TRABELSI, M. Mg(OH)₂ dehydroxylation : A kinetic study by controlled rate thermal analysis (CRTA). **Solid State Sciences**, v. 11, p. 1028–1034, 2009.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

NEWBERG, J. T.; STARR, D. E.; YAMAMOTO, S.; KAYA, S.; KENDELEWICZ, T.; MYSAK, E. R.; PORSGAARD, S.; SALMERON, M. B.; BROWN JR., G. E.; NILSSON, A.; BLUHM, H. Formation of hydroxyl and water layers on MgO films studied with ambient pressure XPS. **Surface Science**, v. 605, n. 1-2, p. 89–94, 2011.

NORRIS, J.; ADELMAN, C.; SPANTCHAK, Y.; MARANO, K. Social and economic impact review on neglected tropical diseases. **Hudson Institute's Center for Science in Public Policy**. [Online.] <http://www.hudson.org>, 2012.

NUNES, P. A. **Sistemas híbridos ferrimagnéticos contendo nanopartículas de ouro e ciclodextrina: preparação e caracterização**. 2014, 69 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Piauí, 2014.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PATIL, A. B.; BHANAGE, B. M. Novel and green approach for the nanocrystalline magnesium oxide synthesis and its catalytic performance in Claisen–Schmidt condensation. **Catalysis Communications**, n. 36, p. 79-83, 2013.

PELLISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; LIMA JÚNIOR, F. E. F. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PERROT, S.; DUTERTRE-CATELLA, H.; MARTIN, C.; RAT, P.; WARNET, J. M. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. **Toxicological Sciences**, v. 72, n. 1, p. 122-129, 2003.

PRIYADARSINI, K. I.; KHOPDE, S. M.; KUMAR, S. S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 2200-2206, 2002.

PRZEWLOKA, S. R.; SHEARER, B. J. The Further Chemistry of Ellagic Acid II. Ellagic Acid and Water-Soluble Ellagates as Metal Precipitants. **Holzforschung**, v. 56, n. 1, p. 13–19, 2002.

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

RATNAM, D. V.; BHARDWAJ, V.; RAVI KUMAR, M. N. V. Simultaneous analysis of ellagic acid and coenzyme Q₁₀ by derivative spectroscopy and HPLC. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 387–391, 2006.

SÁDECKÁ, J.; TÓTHOVÁ, J. Spectrofluorimetric determination of ellagic acid in brandy. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p.893-897, 2012.

SALOMÃO, R.; ARRUDA, C. C.; SOUZA, A. D. V.; FERNANDES, L. Novel insights into MgO hydroxylation: Effects of testing temperature, samples' volume and solid load. **Ceramics International**, v. 40, n. 9 PART B, p. 14809–14815, 2014.

SALOMÃO, R.; PANDOLFELLI, V. C. Magnesia sinter hydration-dehydration behavior in refractory castables. **Ceramics International**, v. 34, n. 8, p. 1829–1834, 2008.

SANCHEZ, C.; SHEA, K. J.; KITAGAWA, S.; Recent progress in hybrid materials sciene. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 471-472, 2011.

SILVA, A. T. B. **Nanocubos do análogo de azul da prússia de cobalto modificados por nanopartículas ferromagnéticas**. 2015, 76 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Piauí, 2015.

SILVA, A. T. B.; COELHO, A. G.; LOPES, L. C. S.; MARTINS, M. V. A.; CRESPILO, F. N.; MERKOÇI, A.; SILVA, W. C. Nano-assembled supramolecular films from chitosan-stabilized gold nanoparticles and cobalt (II) phthalocyanine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1237-1245, 2013.

SILVEIRA NETO, L.; MARCONDES, M.; BILSLAND, E.; MATOS, L. V. S.; VIOL, M. A.; BRESCIANI, K. D. S. Clinical and epidemiological aspects of feline leishmaniasis in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1467-1480, 2015.

SIMIĆ, A. Z.; VERBIĆ, T. Z.; SENTIĆ, M. N.; VOJIĆ, M. P.; JURANIĆ, I. O.; MANOJLOVIĆ, D. D. Study of ellagic acid electro-oxidation mechanism. **Monatshefte fur Chemie**, v. 144, n. 2, p. 121–128, 2013.

SRIVASTAVA, V.; SHARMA, Y. C.; SILLANPÄÄ, M. Green synthesis of magnesium oxide nanoflower and its application for the removal of divalent metallic species from synthetic wastewater. **Ceramics International**, v. 41, n. 5, p. 6702–6709, 2015.

STOIMENOV, P. K.; KLINGER, R. L.; MARCHIN, G. L.; KLABUNDE, K. J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agentes. **Langmuir**, v. 18, n. 13, p. 6679-6686, 2002.

TANG, Z.-X.; SHI, L.-E. Preparation of nano-MgO using ultrasonic method and its characteristics. **Eclética Química**, v. 33, n. 1, p. 15–20, 2008.

VATSHA, B.; TETYANA, P.; SHUMBULA, P. M.; NGILA, J. C.; SIKHWIVHILU, L. M.; MOUTLOALI, R. M. Effects of precipitation temperature on nanoparticle surface area and antibacterial behaviour of Mg(OH)₂ and MgO nanoparticles. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, p. 365-373, 2013.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

VEKIARI, S. A.; GORDON, M. H.; GARCÍA-MACÍAS, P.; LABRINEA, H. Extraction and determination of ellagic acid content in chestnut bark and fruit. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 1007–1011, 2008.

VIEITES, M.; SMIRCICH, P.; GUGGERI, L.; MARCHÁN, E.; GÓMEZ-BARRIO, A.; NAVARRO, M.; GARAT, B.; GAMBINO, D. Synthesis and characterization of a pyridine-2-thiol N-oxide gold (I) complex with potent antiproliferative effect against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. insight into its mechanism of action. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1300-1306, 2009.

VIJAYALAKSHMI, R.; RAJENDRAN, V. Synthesis and characterization of nano-TiO₂ via different methods. **Arch App Sci Res**, v. 4, n. 2, p. 1183-1190, 2012.

VOGEL, G. Tackling neglected diseases could offer more bang for the buck. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 592-593, 2006.

WANG, F.; HUANG, W.; WANG, Y.; TANG, B. Determination of nucleic acid by its enhancement effect on the fluorescence of Ellagic acid – Cationic surfactant system. **Journal of Molecular Structure**, v. 967, n. 1-3, p. 183–188, 2010.

WHITESIDES, G. M.; GRZYBOWSKI, B. Self-assembly at all scales. **Science**, v. 295, n. 5564, p. 2418-2421, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniases. In: **World Health Organization Technical Report Series**, n. 949, 2010.

YÜCE, A.; ATESSAHIN, A.; ÇERIBASI, A. O.; AKSAKAL, M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 101, n. 5, p. 345-349, 2007.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZHANG, L; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nanotoday**, v. 4, n. 1, p. 66-80, 2009.