

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

LARISSA DUTRA COELHO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE LIPOSSOMAS CONTENDO TÁRTARO  
EMÉTICO PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA PARA DOSEAMENTO DE  
ANTIMÔNIO**

Belo Horizonte

2021

LARISSA DUTRA COELHO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE LIPOSSOMAS CONTENDO TÁRTARO EMÉTICO PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA PARA DOSEAMENTO DE ANTIMÔNIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Cristina de Oliveira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Marques Gontijo de Aguiar

Belo Horizonte

2021

C672a Coelho, Larissa Dutra.  
Avaliação da toxicidade aguda de lipossomas contendo tártaro emético para tratamento da leishmaniose e validação de método por espectrometria de absorção atômica para doseamento de antimônio / Larissa Dutra Coelho. – 2021.  
81 f. : il.

Orientadora: Mônica Cristina de Oliveira.  
Coorientadora: Marta Marques Gontijo de Aguiar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Leishmaniose visceral – Teses. 2. Lipossomos – Teses. 3. Tártaro emético – Teses. 4. Toxicidade aguda – Teses. 5. Espectrometria de absorção atômica – Teses. I. Oliveira, Mônica Cristina de. II. Aguiar, Marta Marques Gontijo de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.9364



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

### **FOLHA DE APROVAÇÃO**

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE LIPOSSOMAS CONTENDO TÁRTARO EMÉTICO PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA PARA DOSEAMENTO DE ANTIMÔNIO

**LARISSA DUTRA COELHO**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Clésia Cristina Nascentes

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - Orientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar - Coorientadora

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 23 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Monica Cristina de Oliveira, Membro**, em 23/08/2021, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 23/08/2021, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGCFA 0913948

SEI 23072.243714/2021-03 / pg. 1



Documento assinado eletronicamente por **Marta Marques Gontijo de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 23/08/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clesia Cristina Nascentes, Membro de comissão**, em 24/08/2021, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Marcos Zech Coelho, Usuário Externo**, em 24/08/2021, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufmg.br/sei/controlador externo.php?acao=documento conferir&id orgao acesso externo=0>, informando o código verificador **0913948** e o código CRC **36F7D04A**.

## **COLABORADORES**

Professora Dra. Maria José Nunes de Paiva – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

Doutoranda Mirna Maciel D'Auriol Souza - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

Professor Dr. André Luís Branco de Barros – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais.

Professor Dr. Geovanni Dantas Cassali – Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

Professora Dra. Clésia Cristina Nascentes – Departamento de Química – Universidade Federal de Minas Gerais.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Josemary e Alexandre  
e aos meus irmãos, Rafael e Lucas.

Onde estiverem, muito obrigada  
por me apoiarem.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço de todo o coração a minha mãe, Josemary e ao seu companheiro Paulo César por me darem apoio sempre e por me ajudarem em todas as minhas decisões. Agradeço por serem meu porto seguro. Agradeço ao meu irmão Rafael e a minha cunhada Tâmara por sempre estarem por perto e se orgulharem de mim.

Gostaria de agradecer a todos que estiveram sempre por perto, me apoiando, me trazendo momentos leves e divertidos e que me ajudaram durante o período do mestrado e ao longo da minha vida.

A minha orientadora Professora Mônica, pela confiança desde o momento que aceitou meu pedido de orientação. Agradeço imensamente por contribuir com o meu crescimento acadêmico e profissional, disponibilizando seu tempo e transmitindo conhecimento, ajudando sempre que possível e dando apoio nas decisões tomadas. Obrigada por acreditar em mim.

A minha coorientadora, Professora Marta, por toda a ajuda e contribuição neste trabalho. Agradeço pela paciência, conselhos e todo o conhecimento transmitido e por se fazer presente durante o trabalho. Sua ajuda foi fundamental.

A técnica Mirna pela colaboração e recepção no laboratório, pelo auxílio e horas gastas em nossos experimentos. Pela paciência e atenção mesmo em horários atípicos.

Ao doutorando Cassiano por ter me ajudado na reta final e conseguir transmitir seu conhecimento e despendendo do seu tempo para finalizar o trabalho.

Aos técnicos Adelaide e Batista, pela atenção e grande ajuda nos experimentos com animais.

Aos professores do LTF pelos ensinamentos constantes.

A todos os amigos do LTF pelo apoio, convivência e experiências compartilhadas.



A Carol por ter me acompanhado e por sempre estar perto, disposta a ajudar, a tomar um café, a compartilhar muitos momentos felizes mas também outros difíceis. Acredite que você tornou toda a caminhada mais leve.

A Rapha por ter ajudado nos experimentos e me apresentado o LTF desde a graduação, por momentos de brincadeiras e pelas conversas pra aliviar a tensão.

A aluna de IC Ellen por me auxiliar na execução do trabalho.

Aos animais que foram utilizados para os estudos.

Agradeço a FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A Deus, por me dar força nos momentos difíceis dessa e de outras caminhadas.

A cada pessoa envolvida, mesmo que indiretamente, e que teve papel importante para que esse trabalho fosse finalizado. Muito obrigada!

“Na natureza nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”.

(Antoine Lavoisier)

## RESUMO

As substâncias bioativas a base de antimônio trivalente, incluindo o tártaro emético (TE), foram a primeira classe de compostos empregados no tratamento para esquistossomose e leishmaniose. Porém, o seu uso foi descontinuado devido ao seu baixo índice terapêutico e seus efeitos adversos como trombocitopenia e distúrbios no eletrocardiograma. O uso de lipossomas tem se mostrado uma estratégia promissora de entrega de substâncias bioativas na região de interesse e de redução e/ou eliminação de efeitos indesejáveis. O desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos requer a realização de estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e biodistribuição, o que permite verificar as regiões de acúmulo das substâncias bioativas e vias de eliminação. Essas informações possibilitam inferir sobre alvos de atividade terapêutica e toxicidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e validar método de espectrometria por absorção atômica para posterior estudo de biodistribuição *in vivo* de lipossomas contendo TE. Para o estudo de toxicidade aguda, camundongos saudáveis foram tratados com TE livre ou lipossoma contendo TE (Lip-TE) em dose única de 16 mg/Kg de  $Sb^{3+}$  por via intravenosa, e acompanhados por 14 dias. Foi observada a morte de dois animais no grupo tratado com TE livre e nenhuma morte no grupo tratado com Lip-TE. Após os 14 dias, os animais foram eutanasiados, o sangue e órgãos coletados para exames hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Observou-se uma maior toxicidade hepática e cardíaca nos animais tratados com TE quando comparados aos animais tratados com Lip-TE, Lip-Branco e PBS. Também foi desenvolvido um método analítico para determinar a concentração total de antimônio (Sb) em coração de camundongos saudáveis por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS), após digestão ácida com ácido nítrico 65% (v/v). A solução resultante foi introduzida diretamente em tubo de grafite por meio de amostrador automático. O método foi validado seguindo procedimentos e critérios de aceitabilidade requeridos pelo INMETRO (DOQ-CGCRE-008). O método apresentou efeito de matriz e linearidade na faixa de concentração de 20 µg/L e 100 µg/L. O limite de detecção e quantificação foram de 20.1 µg/L e 31.5 µg/L, respectivamente. A

repetibilidade e precisão foram avaliadas com a fortificação das amostras em concentrações conhecidas de antimônio, com recuperação entre 92% e 105%. Foi possível concluir com este trabalho que o Lip-TE conseguiu reduzir a toxicidade sistêmica do TE e também que os parâmetros analíticos avaliados demonstraram que o método desenvolvido para determinar a concentração de Sb em coração de camundongos por GFAAS produz resultados satisfatórios.

Palavras-chave: lipossomas; tártaro emético; leishmaniose visceral; toxicidade aguda; espectrometria de absorção atômica.

## ABSTRACT

Bioactive substances based on trivalent antimony, including tartar emetic (TE), were the first class of compounds used in the treatment of schistosomiasis and leishmaniasis. However, its use has been discontinued due to its low therapeutic index and its adverse effects such as thrombocytopenia and electrocardiogram disturbances. The use of liposomes has shown to be a promising strategy for the delivery of bioactive substances in the region of interest and for the reduction and/or elimination of undesirable effects. Development of new pharmaceutical products requires carrying out of pre-clinical studies of acute toxicity and biodistribution, which makes it possible to verify regions of accumulation of bioactive substances and elimination pathways. This information makes possible to infer on targets of therapeutic activity and toxicity. Therefore, the objective of this work was to evaluate the acute toxicity and validate the atomic absorption spectrometry method for further study of *in vivo* biodistribution of TE-containing liposomes. For the study of acute toxicity, healthy mice treated with free TE or liposome containing TE (Lip-TE) in a single dose of 16 mg/kg Sb<sup>3+</sup> intravenously, and followed for 14 days. Death of two animals in free TE treated group and no death in the Lip-TE treated group was observed. After 14 days, the animals were euthanized, blood and organs collected for hematological, biochemical and histopathological exams. A superior liver and cardiac toxicity was observed in animals treated with TE when compared to animals treated with Lip-TE, Lip-Blank and PBS. A simple analytical method also developed to determine the total concentration of antimony (Sb) in healthy mice hearts by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), after acid digestion with 65% nitric acid (v/v). The method was validated following procedures and acceptability criteria required by INMETRO (DOQ-CGCRE-008). The method showed matrix effect and linearity in the concentration range of 20 µg/L and 100 µg/L. The detection and quantification limits were 20.1 µg/L and 31.5 µg/L, respectively. Repeatability and precision were evaluated by fortifying the samples at known concentrations of antimony, with recovery between 92% and 105%. It was possible to conclude with this work that Lip-TE was able to reduce the systemic toxicity of TE and also that the analyzed analytical parameters demonstrated that the method developed to determine the concentration of Sb in heart of mice by GFAAS produces satisfactory results.

Key words: liposomes; emetic tartar; visceral leishmaniasis; acute toxicity; atomic absorption spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - (A) Forma flagelada ou promastigota. (B) Forma com flagelo inaparente ou amastigota.....	23
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp. ....	23
<b>Figura 3</b> - Fêmea de flebotomíneo da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	25
<b>Figura 4</b> - Paciente com LV e apresentando hepatoesplenomegalia. ....	27
<b>Figura 5</b> - Fórmula estrutural do tártaro emético. ....	33
<b>Figura 6</b> - Estrutura básica e composição de lipossomas. ....	35
<b>Figura 7</b> - Classificação dos lipossomas de acordo com diâmetro médio e número de bicamadas.....	37
<b>Figura 8</b> - Descrição do método de preparo de lipossomas por evaporação em fase reversa. ....	43
<b>Figura 9</b> - Diluição seriada com a amostra de lipossoma TE purificado. ....	46
<b>Figura 10</b> - Diluição seriada com a amostra lipossoma TE total.....	46
<b>Figura 11</b> - Diluição seriada da solução padrão de TE.....	47
<b>Figura 12</b> - Fluxograma do método proposto para a quantificação de Sb em coração de camundongos BALB/c por GFAAS.....	52
<b>Figura 13</b> - Fotomicrografia de criomicroscopia eletrônica de transmissão de Lip-TE.....	59
<b>Figura 14</b> - Porcentagem de variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas após 7 e 14 dias de administração intravenosa.....	60
<b>Figura 15</b> - Avaliação da quantidade de AST em camundongos fêmea BALB/c após 14 dias de administração intravenosa de PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ). ....	64
<b>Figura 16</b> - Avaliação da quantidade de ALT em camundongos fêmea BALB/c após 14 dias de administração intravenosa de PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ). ....	65
<b>Figura 17</b> - Avaliação da quantidade de CK-MB em camundongos fêmea BALB/c após 14 dias de administração intravenosa de PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ). ....	66

<b>Figura 18</b> - Cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c fêmea corados com hematoxilina & eosina. (A) PBS (B) Lip-TE 16 mg/kg Sb <sup>3+</sup> (C) Lip-Branco e (D) TE 16 mg/kg Sb <sup>3+</sup> . As setas pretas indicam vacúolos nos cardiomiócitos. ....	67
<b>Figura 19</b> - Cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c fêmea corados com hematoxilina & eosina. (A) PBS (B) Lip-TE 16 mg/kg Sb <sup>3+</sup> (C) Lip-Branco e (D) TE 16 mg/kg Sb <sup>3+</sup> . ....	68
<b>Figura 20</b> - Curvas de calibração analítica para doseamento de Sb por espectrometria de absorção atômica e gráficos de resíduos das curvas. ....	71



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da doença em humanos. ....	24
<b>Tabela 2</b> - Principais diferenças da leishmaniose visceral no Velho e no Novo Mundo.	28
<b>Tabela 3</b> - Condições de análise para determinação de antimônio trivalente por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.....	45
<b>Tabela 4</b> - Programa de temperatura utilizado para determinação analítica de Sb em coração da camundongos BALB/c por GFAAS.....	52
<b>Tabela 5</b> - Níveis de concentração da curva de calibração para determinação de Sb em coração de camundongos BALB/c por GFAAS.....	54
<b>Tabela 6</b> - Critérios de aceitação para recuperação. ....	56
<b>Tabela 7</b> - Parâmetros avaliados para caracterização química e físico-química dos Lip-TE e Lip-Branco. ....	58
<b>Tabela 8</b> – Avaliação da resposta de administração de diferentes doses de Lip-TE e TE em camundongos BALB/c para fins de estudo de toxicidade aguda adaptado do guia da OECD 423.....	61
<b>Tabela 9</b> – Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c tratados com PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ).....	62
<b>Tabela 10</b> - Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c tratados com PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> ). ....	63
<b>Tabela 11</b> - Avaliação de efeito matriz em amostra de coração de camundongo BALB/c fortificado com Sb para doseamento por espectrometria de absorção atômica* (n=3). .	69
<b>Tabela 12</b> - Teste F de média das variâncias dos resíduos e teste t de comparação de médias.....	70
<b>Tabela 13</b> - Limite de detecção e quantificação obtidos pelo método de espectrometria de absorção atômica otimizado.....	72
<b>Tabela 14</b> - Repetibilidade e precisão intermediária obtidas utilizando matriz branca fortificada.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
μ	Micro
%	Porcentagem
ALT	Alanina Amino Transferase
AmB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Amino Transferase
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CH	Colesterol
CK-MB	Creatinoquinase MB
CV	Coeficiente de variação
DC-CHOL	3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
FDA	Food and Drug Administration
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio

HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IP	Índice de polidispersão
kg	Kilograma
kV	Kilovolt
L.	Leishmania
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Limite de detecção
Lip-TE	Lipossoma contendo tártaro emético
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPDK	Leishmaniose dérmica pós-kalazar
LQ	Limite de quantificação
LT	Leishmaniose tegumentar
Lu.	Lutzmyia
LUV	Vesículas unilamelares maiores
LV	Leishmaniose visceral
mg	Miligrama
mL	Mililitros
MLV	Vesículas multilamelares
MRC	Material de referência certificado
NaOH	Hidróxido de sódio

NM	Novo mundo
ppb	Partes por bilhão
PEG	Polietilenoglicol
REV	Evaporação em fase reversa
rpm	Rotações por minuto
Sb	Antimônio
Sb <sup>3+</sup>	Antimônio trivalente
Sb <sup>5+</sup>	Antimônio pentavalente
SUV	Vesículas unilamelares menores
TE	Tártaro emético
v/v	Unidade de concentração volume por volume
VM	Velho Mundo
P.	<i>Phlebotomus</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
OMS	Organização Mundial de Saúde
OECD	Guideline for testing of chemicals

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
<b>2.1 Leishmaniose</b> .....	22
<b>2.1.1 Etiologia</b> .....	22
<b>2.1.2 Leishmaniose Visceral</b> .....	26
<b>2.1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral</b> .....	29
<b>2.1.4 Tratamento da Leishmaniose</b> .....	30
<b>2.2 Antimônio trivalente (Tártaro emético)</b> .....	32
<b>2.3 Lipossomas</b> .....	34
<b>2.4 Estudo de Avaliação da Toxicidade Aguda</b> .....	37
<b>2.5 Validação de método por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)</b> .....	38
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	40
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
<b>4.1 Material</b> .....	41
<b>4.2 Métodos</b> .....	42
<b>4.2.1 Preparo dos lipossomas</b> .....	42
<b>4.2.2 Caracterização química e físico-química dos lipossomas</b> .....	45
<b>4.2.3 Estudo de toxicidade aguda <i>in vivo</i> de lipossomas contendo TE</b> .....	47
<b>4.2.4 Validação de método analítico de espectrometria de absorção atômica</b>	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>5.1 Caracterização química e físico-química de Lip-TE</b> .....	58
<b>5.2 Toxicidade aguda <i>in vivo</i> de lipossomas contendo TE</b> .....	59

5.2.1 Avaliação de peso corporal, sinais clínicos e mortalidade dos animais	59
5.2.2 Análise hematológica .....	62
5.2.3 Análise bioquímica.....	62
5.2.4 Análise histopatológica .....	67
5.3 Validação de método analítico de espectrometria de absorção atômica .....	69
5.3.1 Efeito Matriz.....	69
5.3.2 Linearidade .....	71
5.3.3 LD e LQ .....	72
5.3.4 Tendência/recuperação .....	72
5.3.5 Precisão .....	73
5 CONCLUSÃO .....	75
REFERÊNCIAS.....	76

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania* (WHO, 2021). As formas principais da doença são: leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, e leishmaniose mucocutânea (LMC), sendo a LV a forma mais grave da doença. Esses parasitas são transmitidos aos humanos pela picada do mosquito palha fêmea infectado. Os medicamentos utilizados para tratamento incluem antimoniais, miltefosina, paromomicina e anfotericina B (AmB) (CDC, 2021).

O composto antimonial, sob a forma de sal trivalente (TE), foi usado pela primeira vez no tratamento da leishmaniose em 1912 por Gaspar Vianna. Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos na década de 1940 e incluem o antimoniato de metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo apenas o primeiro disponível no Brasil. Esses fármacos têm a vantagem de poderem ser administrados em nível ambulatorial, o que diminui os riscos relacionados à hospitalização (COSTA *et al.*, 2007). Os antimoniais podem ocasionar cardiotoxicidade dose e tempo dependentes, por isso, os pacientes devem ser avaliados semanalmente e em caso de arritmias o medicamento deve ser imediatamente suspenso. Outros eventos adversos incluem pancreatite grave, artralgias, adinamia, anorexia, dor no local da aplicação e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Os compostos à base de antimônio pentavalente continuam sendo utilizados como primeira escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose no homem. No Brasil o medicamento utilizado é o Glucantime®, o qual possui severos efeitos adversos e é administrado por via parenteral por 20 a 40 dias, o que compromete a adesão dos pacientes ao tratamento (FRÉZARD *et al.*, 2005).

Sabemos que desenvolver um novo medicamento para tratamento de doenças é um processo demorado e dispendioso. Portanto, utilizar uma substância bioativa conhecida do ponto de vista farmacológico e desenvolver novas formulações torna-se

uma estratégia interessante, por isso a ideia de utilizar lipossomas contendo TE pode ser promissora.

No século passado, grupos de pesquisadores ingleses e americanos propuseram o uso de lipossomas convencionais contendo fármacos leishmanicidas como uma nova abordagem para o tratamento da LV (BLACK *et al.*, 1977). Lipossomas são vesículas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso, sendo biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos. Essas características os tornam altamente versáteis para a terapêutica (BATISTA *et al.*, 2007). A encapsulação de substâncias bioativas em lipossomas pode contribuir para minimizar a sua degradação e a inativação após a administração, assim como aumentar a biodisponibilidade e a fração da substância bioativa que alcança a área patológica, melhorando assim a eficácia terapêutica e minimizando a toxicidade (LOPES *et al.*, 2013).

Recentemente, desenvolvemos uma formulação de lipossomas contendo TE (Lip-TE) para o tratamento da LV a qual foi comparada com o tratamento convencional utilizando o Glucantime® em relação à sua eficácia no tratamento de animais infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Os resultados obtidos mostraram uma redução da carga parasitária estatisticamente significativa no baço e no fígado ao tratar com o Lip-TE em relação ao tratamento com TE livre. Portanto, visando dar continuidade aos estudos pré-clínicos relacionados ao uso de Lip-TE para o tratamento da LV, propomos na presente dissertação de mestrado realizar o preparo, caracterização química e física, a avaliação da toxicidade aguda dessa formulação lipossomal assim como validação de método para quantificação de antimônio em coração de camundongos BALB/c sadios.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Leishmaniose

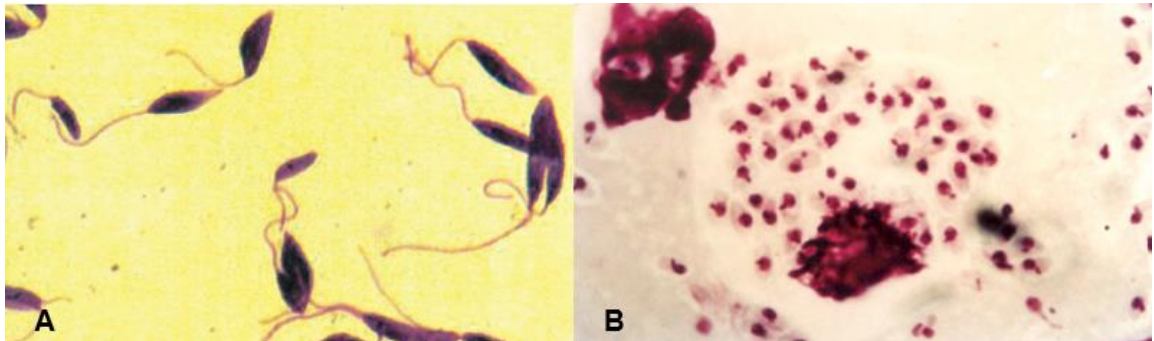
A leishmaniose é uma doença transmitida por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Essa doença está difundida em áreas tropicais e subtropicais sendo encontrada em 98 países da Europa, África, Ásia e América (ALVAR *et al.*, 2012). Entretanto, mais de 95% dos novos casos de leishmaniose ocorrem somente em 10 países, sendo eles: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Ao considerarmos todas as formas da doença é estimado que entre 700 mil e um milhão de novos casos ocorram anualmente, mas somente uma pequena fração dos infectados eventualmente podem desenvolver a doença (OMS, 2021).

No Brasil, a leishmaniose tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominante em ambientes rurais e periurbanas e, mais recentemente, em centros urbanos como, Rio de Janeiro, Corumbá, Belo Horizonte, Araçatuba, Palmas, Três Lagoas, Campo Grande, entre outros. Atualmente, no Brasil a LV é registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1600 municípios apresentando transmissão autóctone (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

#### 2.1.1 Etiologia

Os agentes etiológicos da LV são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e forma arredondada com flagelo inaparente ou amastigota (Figura 1) nos tecidos dos vertebrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

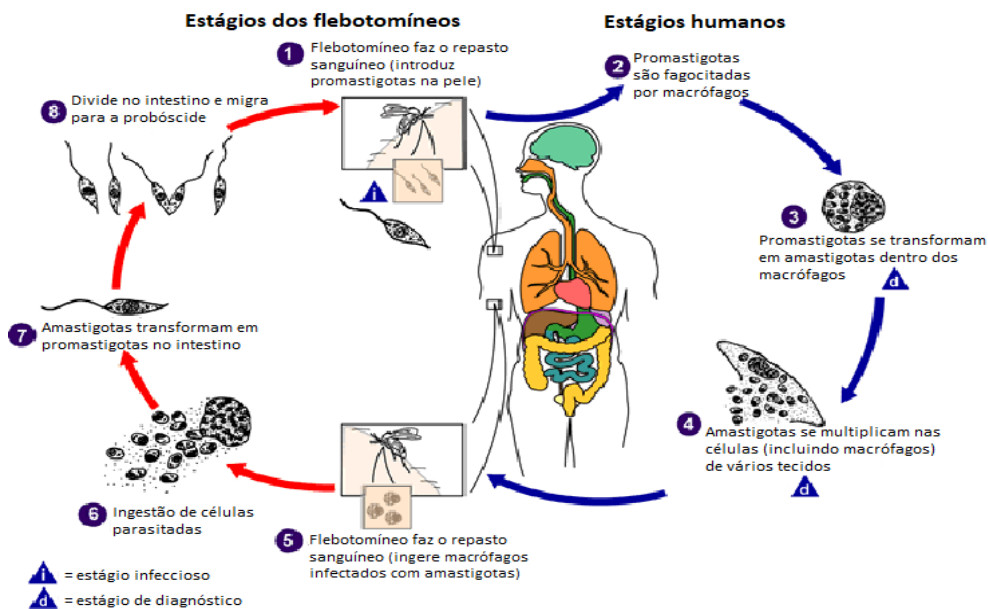
**Figura 1 - (A)** Forma flagelada ou promastigota. **(B)** Forma com flagelo inaparente ou amastigota.



Adaptado de <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2019/05/2014-Manual-de-vigil%C3%A2ncia-e-controle-da-leishmaniose-visceral.pdf>

Ao picar o hospedeiro, os parasitas são fagocitados pelos macrófagos e se transformam em formas amastigotas intracelulares, onde se multiplicam nos vacúolos parasitóforos. As amastigotas podem posteriormente infectar outros macrófagos ou serem ingeridas por outro vetor. No intestino dos flebotomos, a forma amastigota se diferencia em promastigota, completando o ciclo do parasita (Figura 2) (KAYE; SCOTT, 2011).

**Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.**



Adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

A infecção humana é causada por algumas das espécies representadas na Tabela 1. As diferentes espécies são morfologicamente indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise de isoenzimas, métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (CDC, 2021).

**Tabela 1** - Espécies de *Leishmania* causadoras da doença em humanos.

Subgênero	Espécie	Velho/Novo Mundo	Forma clínica da doença	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	VM	LCL, LCD	Leste Africano (Etiópia, Quênia).
	<i>L. amazonensis</i>	NM	LCL, LCD, LMC	América do Sul (Brasil, Venezuela, Bolívia).
	<i>L. donovani</i>	VM	LV, LDPK	África Central, Sul Asiático, Oriente Médio, Índia, China.
	<i>L. infantum</i> (sin. <i>L. chagasi</i> )	VM, NM	LV, LC	Países do mediterrâneo (Norte Africano e Europa), sudeste Europeu, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte, América Central e América do sul (México, Venezuela, Brasil, Bolívia).
	<i>L. major</i>	VM	LC	África Central e do Norte, Oriente Médio, Ásia Central.
	<i>L. mexicana</i> (sin. <i>L. pifanoi</i> )	NM	LCL, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru.
	<i>L. tropica</i>	VM	LCL, LV	África Central e do Norte, Oriente Médio, Ásia central, Índia.
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	LCL	Norte da América do sul, Venezuela.
	<i>L. waltoni</i>	NM	LCD	República Dominicana.
	<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	LCL, LMC
<i>L. guyanensis</i>		NM	LCL, LMC	Norte da América do sul (Guiana Francesa, Suriname, Brasil, Bolívia).
<i>L. lainsoni</i>		NM	LCL	Brasil, Bolívia, Peru.
<i>L. lindenbergi</i>		NM	LCL	Brasil.
<i>L. naiffi</i>		NM	LCL	Brasil, Guiana Francesa.
<i>L. panamensis</i>		NM	LCL, LMC	América Central e América do Sul (Panamá, Colômbia, Venezuela, Brasil).

---

	<i>L. peruviana</i>	NM	LCL, LMC	Peru, Bolívia.
	<i>L. shawi</i>	NM	LCL	Brasil.
<i>Mundinia</i>	<i>L. martiniquensis</i>	VM, NM	LCL, LV	Martinica, Tailândia.

Abreviações: LC, leishmaniose cutânea; LV, leishmaniose visceral; LCD, leishmaniose cutânea difusa; LCL, leishmaniose cutânea localizada; LMC, leishmaniose mucocutânea; LPDK, leishmaniose dérmica pós-kalazar; NM, Novo Mundo; VM, Velho Mundo.

---

Adaptado de STEVERDING (2017).

O mosquito palha é um pequeno flebotomíneo com significativa importância na área da saúde com várias espécies servindo como vetores para protozoários do gênero *Leishmania*, agente etiológico da LC e LV em humanos e animais (TATENG *et al.*, 2019).

No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Figura 3). A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. (L.) chagasi* no Brasil, sendo a sua distribuição geográfica considerada ampla e parece estar em expansão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

**Figura 3** - Fêmea de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*.




---

Adaptado de <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/43-produtos/reativos/450-leishmaniose-sintomas-transmissao-e-prevencao-ifi-humana>

Raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*), têm sido considerados como reservatórios silvestres. No ambiente urbano, o cão é a principal fonte de infecção para o vetor, podendo desenvolver os sintomas da doença, que são: emagrecimento, queda de pelos, crescimento e deformação das

unhas, paralisia de membros posteriores, desnutrição, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Os mecanismos de controle do organismo sobre a *Leishmania* ou a predisposição à infecção não são bem compreendidos. A participação da resposta imune adaptativa nas alterações observadas em pacientes com LV é reforçada por diversas evidências, tais como: a hipergamaglobulinemia é constante nesses pacientes; o teste de Coombs pode ser positivo em pacientes com LV clássica ou associada à anemia hemolítica (POLLACK *et al.*, 1988; MAHAJAN & MARWAHA, 2007); pacientes com LV apresentam maior predisposição a infecções bacterianas (ANDRADE, CARVALHO & ROCHA, 1990); a melhora clínica, parasitológica e hematológica é precedida da liberação de imunocomplexos circulantes. É possível que os anticorpos desempenhem função importante nas interações precoces entre promastigotas e macrófagos, que são críticas para o desfecho da infecção (PEARSON *et al.*, 1983). O teste cutâneo de Montenegro é negativo na fase de atividade da doença – quando altos níveis de anticorpos contra os antígenos de *Leishmania* são detectáveis –, e torna-se positivo após o tratamento, mas não está associado ao prognóstico da doença (ALMEIDA SILVA *et al.*, 2006). A ocorrência de infecções subclínicas ou assintomáticas em uma grande proporção de indivíduos que residem nas áreas endêmicas, associada à detecção de anticorpos anti-leishmania (BADARÓ *et al.*, 1986), constitui evidência da participação de imunidade naturalmente adquirida no curso da infecção (BADARÓ *et al.*, 1986).

### **2.1.2 Leishmaniose Visceral**

A LV é a forma mais grave da infecção e tem sido alvo especial quando observamos que grandes epidemias foram descritas no Sudão, na Índia, em Bangladesh e no Brasil (COLLIN *et al.*, 2004; COSTA, PEREIRA & ARAÚJO, 1990; THAKUR, 1984; RAHMAN & ISLAM, 1983).

Um terço dos indivíduos acometidos são crianças com menos de dois anos de idade, que apresentam uma rápida progressão da doença e elevado índice de complicações, especialmente infecções bacterianas e sangramentos. Nos últimos anos, a letalidade vem aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A variedade de manifestações clínicas decorrentes da infecção depende da habilidade que o parasito tem em evadir-se dos mecanismos de defesa mediante complexa interação com o hospedeiro (SAHA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006). A forma clássica da doença caracteriza-se por febre recorrente, palidez, emagrecimento, hepatoesplenomegalia (Figura 4), anemia, leucopenia, plaquetopenia e hipergamaglobulinemia (BERMAN, 1997; HERWALDT, 1999)

**Figura 4** - Paciente com LV e apresentando hepatoesplenomegalia.



---

Adaptado de <https://f5.jor.br/v2017/content/uploads/2018/03/leishmaniose-visceral-70-638.jpg>

As complicações mais associadas ao óbito são as infecções bacterianas e os distúrbios da coagulação sanguínea podendo representar a primeira manifestação da LV (QUEIROZ, ALVES & CORREIA, 2004).

O comprometimento do fígado ocorre em grande parte dos pacientes com LV, sendo bem reconhecido e formas graves de dano hepático têm sido descritas (ASHKAN E RAHIM, 2008).

A síndrome clássica da LV é muito semelhante nas distintas regiões do globo, apesar das diferenças regionais dos flebotomíneos dos parasitos e das variações genéticas das populações afetadas. Atualmente, a LV incide em cidades de médio e grande porte no Brasil, enquanto predomina em pequenas vilas e áreas rurais no velho mundo (CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES, 2014).

A LV que ocorre no subcontinente indiano e na África Oriental não tem reservatório animal reconhecido. Ela é transmitida por vetores predominantemente antropofílicos do gênero *Phlebotomus*, destacando-se *P. papatasi*, *P. argentipes*, *P. orientalis* e *P. sergenti* (KILLICK-KENDRIC, 1990). A doença zoonótica causada por *L. donovani* acontece na bacia do Mediterrâneo, na África Ocidental, no norte da China, no Irã e no Paquistão (WALSH, MOLYNEUX & BIRLEY, 1993).

A LV acomete pessoas mais jovens na América, em comparação com a África e a Ásia (OLLIARO *et al.*, 2011) essa maior proporção de crianças com LV, na América, pode estar relacionada à maior força de transmissão na doença zoonótica, na qual existe um reservatório doméstico proximamente em contato com as pessoas, em comparação à doença antroponótica da Ásia e da África (CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES, 2014). Na Tabela 2 podemos verificar as principais diferenças da LV no velho e novo mundo.

**Tabela 2** - Principais diferenças da leishmaniose visceral no Velho e no Novo Mundo.

	<b>Velho mundo</b>	<b>Novo Mundo</b>
<b>Agente etiológico</b>	<i>Leishmania donovani</i> : Subcontinente Indiano, Paquistão, Nepal, África	<i>L. infantum</i>

	Oriental <i>L. infantum</i> : Oriente Médio, bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e África Ocidental	
<b>Vetor</b>	<i>Phlebotomus</i> spp., principalmente <i>P. papatasi</i> , <i>P. argentipes</i> , <i>P. chinensis</i> , <i>P. smirnovi</i> , <i>P. longiductus</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> , <i>P. neglectus</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i> ; <i>Lu. cruzi</i>
<b>Reservatórios</b>	Índia: pessoas China: cães, outros reservatórios silvestres África Oriental: pessoas, cães, canídeos, roedores Mediterrâneo: roedores, cães	Cães, pessoas, canídeos silvestres, marsupiais
<b>Apresentação clínica</b>		
<b>Idade</b>	Principalmente adolescentes e adultos	Principalmente crianças

Adaptado de CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES, 2014.

### 2.1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral

O diagnóstico da LV é complexo pela diversidade das manifestações clínicas comuns a outras condições como malária, anemia falciforme, doença de Chagas aguda, hepatite, cirrose com hipertensão portal, esquistossomose, tripanossomíase africana, tuberculose miliar, brucelose, Aids, febre tifoide, endocardite bacteriana, histoplasmose, leucemias, aplasia de medula (HERWALDT, 1999; AL-GHAZALY *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2008). Assim, a confirmação laboratorial antes do início do tratamento é vital e requer um sensível balanço entre a sensibilidade e a especificidade do método de diagnóstico, e ainda, entre o custo e os riscos.

O diagnóstico da LV pode ser confirmado por diversas formas: visualização direta de parasitos, cultura ou inoculação em animais, detecção de ácido



desoxirribonucleico (DNA) em amostras de tecido, ou imunodiagnóstico por meio da detecção de antígenos do parasito ou de anticorpos anti-leishmania em amostras de tecido, sangue, urina (SUNDAR & RAÍ, 2002). Os exames parasitológicos são a referência do diagnóstico, mas exigem procedimentos invasivos e têm sensibilidade dependente do treinamento dos laboratoristas e do tempo dedicado à busca (SILVA, STEWART & COSTA, 2005). A sensibilidade do exame microscópico de aspirado esplênico varia entre 95% e 98%, mas o procedimento é invasivo e as complicações podem ser graves, mesmo com as técnicas consideradas mais seguras. A sensibilidade na detecção de formas amastigotas em esfregaços de medula óssea tem sensibilidade de 70%, mas pode ultrapassar 95% quando o material é examinado por técnico experiente (ZIJLSTRA *et al.*, 1992). Os parasitos também podem ser detectados, com menor sensibilidade, no material de biópsia hepática ou de linfonodos (ZIJLSTRA *et al.*, 1992). O cultivo de parasitos em diversos meios de cultura como meio monofásico de Schneider paralelo à pesquisa direta aumenta a confirmação do resultado obtido no diagnóstico. As técnicas tradicionais de cultura exigem período de incubação de até quatro semanas (SUNDAR & RAI, 2002), mas novas técnicas de microcultura utilizando tubos capilares ou técnicas de minicultura usando placas de 96 poços ou microtubos demonstraram vantagens relacionadas ao menor custo, simplicidade no preparo e manuseio, maior sensibilidade e menor tempo de incubação mesmo com baixos índices de parasitemia (BOGGILD *et al.*, 2008; HIDE *et al.*, 2007).

#### **2.1.4 Tratamento da Leishmaniose**

O tratamento da doença depende de vários fatores, como espécie causadora, forma clínica, estado clínico do paciente, comorbidades existentes e localização geográfica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; MINODIER & PAROLA, 2007; OMS, 2020). Os tratamentos disponíveis não eliminam o parasito, mas proporcionam melhora clínica e uma limitação é a possibilidade de ocorrência de recidivas devido a imunossupressão (OMS, 2021).

Os medicamentos permitidos para o tratamento da LV são muito limitados, sendo que os agentes leishmanicidas mais potentes disponíveis no Brasil são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B.

Gaspar Vianna, pesquisador pioneiro em Doença de Chagas e leishmaniose, relatou a eficácia do complexo de antimônio trivalente, tártaro emético (TE), no tratamento da leishmaniose muco-cutânea. Entretanto, o uso clínico desse composto foi interrompido, por causa de seus severos efeitos adversos, como a intolerância gastrointestinal e efeitos cardiotoxicos, e também a descoberta de novos fármacos menos tóxicos (FRÉZARD *et al.*, 2005). Dentre esses fármacos, tem-se o antimoniato de meglumina, o qual é preparado pela reação do antimônio pentavalente com o N-metil-D-glucamina (ROBERTS *et al.*, 1998). Com a finalidade de padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose do antimonial seja calculada em massa (mg) de antimônio pentavalente. A dose recomendada no Brasil para LV é de 20 mg de  $Sb^{5+}$  por kg/dia, com aplicação intravenosa ou intramuscular por trinta dias, com limite de três ampolas/dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A anfotericina B foi usada pela primeira vez e com sucesso, na terapêutica da LV por Prata (PRATA, 1963), em 1960, porém, sua utilidade no tratamento da LV somente foi reconhecida a partir da década de 1990, em razão da diminuição da eficácia dos antimoniais pentavalentes na Índia. Esse fármaco possui ação leishmanicida mais potente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo recomendada para o tratamento de gestantes e de pacientes que tenham contraindicações ao uso dos antimoniais pentavalentes ou que tenham apresentado toxicidade (CONCEIÇÃO-SILVA & ALVES, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014)

O desoxicolato de anfotericina é a formulação mais acessível, sendo a dose recomendada no Brasil para LV de 1mg/kg/dia durante 14 a 20 dias. Reações adversas são frequentes, principalmente aquelas associadas à infusão, como febre, calafrios, náuseas, vômitos, tromboflebite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Os sintomas podem ser aliviados com antipiréticos, anti-inflamatórios não hormonais, antieméticos e anti-histamínicos. A nefrotoxicidade é o principal fator limitante ao seu uso, mas outros eventos adversos incluem dispneia transitória, hipotensão ou hipertensão arterial,

miocardite, hipocalemia, disfunção renal, anemia e trombocitopenia (GOLENSER; DOMB, 2006).

As formulações lipídicas de anfotericina B, apresentam menos efeitos tóxicos e podem ser administradas em intervalo mais curto que o desoxicolato de anfotericina B (MEYERHOFF, 1999; THAKUR *et al.*, 1996).

O foco das pesquisas atualmente é a busca por terapias isoladas ou combinadas que sejam seguras, eficazes, acessíveis e de fácil administração para o tratamento da LV.

## **2.2 Antimônio trivalente (Tártaro emético)**

O tártaro emético (TE) (Figura 5) foi obtido pela primeira vez colocando vinho azedo em recipientes de antimônio e seu uso era prescrito para muitas doenças, especialmente as pulmonares (FRÉZARD *et al.*, 2013). Os fármacos a base de antimônio trivalente, incluindo o TE, foram a primeira classe de compostos empregados no tratamento clínico para a esquistossomose e da leishmaniose entre 1912-1960 (MACIEL *et al.*, 2010). O uso medicinal de compostos de antimônio começou nos séculos XVI e XVII com o tartarato de potássio de antimônio (III) (TE) para o tratamento de doenças pulmonares (pneumonia), febre tifoide e esquistossomose (HAYAT, *et al.*, 2020). Porém, o seu uso foi descontinuado devido ao seu baixo índice terapêutico e seus efeitos adversos como trombocitopenia e distúrbios no eletrocardiograma.

Até recentemente, pouco era conhecido sobre as estruturas químicas e farmacológicas dos compostos a base de antimônio, assim como os métodos usados na indústria para o seu preparo (FREZÁRD *et al.*, 2013).

**Figura 5** - Fórmula estrutural do tártaro emético.

Fórmula estrutural	Nome químico/ Nome comercial
$\left\{ \begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CO} - \\   \\ \text{HCO} - \text{Sb} - \text{OH} \\   \\ \text{HCO} - \\   \\ \text{COOH} \end{array} \right\} \text{K}$	Tartarato de antimônio e potássio
	Tártaro emético

Adaptado de RATH *et al.*, 2003

Os complexos de antimônio pentavalente menos tóxicos, incluindo antimoniato de meglumina, foram introduzidos como terapia para leishmaniose em 1940. Entretanto, a terapia muitas vezes é acompanhada por efeitos adversos que incluem cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Como consequência a supervisão médica é necessária e problemas com adesão dos pacientes ao tratamento são comuns (KATO *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não é totalmente esclarecido. Sugere-se que o antimônio pentavalente ( $\text{Sb}^{5+}$ ) seja um pró-fármaco, que é convertido em antimônio trivalente ( $\text{Sb}^{3+}$ ), após sua administração. Entretanto, o mecanismo (enzimático ou não enzimático) e o sítio da redução parasitária ainda não foram determinados (ROBERTS *et al.*, 1998; SERENO *et al.*, 1998; OUELLETTE *et al.*, 2004). Em 1998, Sereno *et al.* demonstraram que o  $\text{Sb}^{3+}$  foi substancialmente mais potente que o  $\text{Sb}^{5+}$ , para as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*.

Na Índia, onde o acesso ao antimoniato de meglumina é livre, o uso irregular e o tratamento incompleto levou ao surgimento de resistência. Durante a última década, em Bihar, 60% dos casos diagnosticados de LV não respondem ao tratamento com esse fármaco. Estudos *in vitro* mostraram que o possível mecanismo primário de resistência é a redução da concentração do fármaco no parasito, pela diminuição da entrada ou

pelo aumento do efluxo. Outros possíveis mecanismos incluem a inibição da ativação fármaco e a inativação da forma ativa (CROFT *et al.*, 2006; MALTEZOU; 2010).

O fármaco considerado, atualmente, como primeira escolha em todo o mundo está longe de ser satisfatório. Assim, alternativas terapêuticas para tratamento de todas as formas das leishmanioses (LC e LV) têm sido intensamente investigadas, incluindo a identificação de novos fármacos e formulações.

Nesse contexto, a reintrodução do TE em uma nova formulação lipossomal, visa direcionar a substância bioativa aos principais focos de proliferação do parasito potencializando sua atividade leishmanicida e provavelmente diminuindo sua toxicidade celular e tecidual (CASTRO *et al.*, 2014).

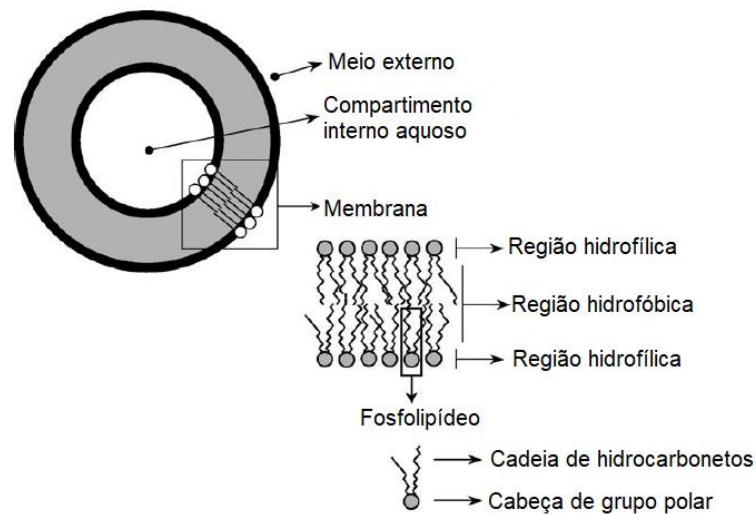
### **2.3 Lipossomas**

Lipossomas foram descobertos em 1960 pelo hematologista britânico Dr. Alec D. Bangham e colaboradores do instituto Babraham, na Universidade de Cambridge e a primeira publicação foi em 1964 (BANGHAM e HORNE., 1964).

Lipossomas são pequenas vesículas artificiais de forma esférica que podem ser criadas a partir de colesterol e fosfolipídeos naturais e/ou sintéticos e atóxicos. Devido ao seu tamanho e seu caráter anfifílico, os lipossomas são sistemas promissores para entrega de substâncias bioativas. As propriedades físico-químicas e químicas dos lipossomas podem diferenciar consideravelmente de acordo com a composição lipídica, carga superficial, tamanho e método de preparo (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

As moléculas lipídicas possuem grupamentos polares que se orientam para a cavidade interna e para a superfície externa e esses interagem com as moléculas de água, enquanto as cadeias apolares dos hidrocarbonetos são repelidas pelas moléculas de água e se dispõem na parte interna da bicamada lipídica (Figura 6) (LOPES *et al.*, 2013).

**Figura 6** - Estrutura básica e composição de lipossomas.



Adaptado de LOPES *et al.*, 2013

Os lipossomas podem ser uma combinação de dois ou mais fosfolípidos e consistem em bicamadas lipídicas simples ou múltiplas. Dependendo da cabeça de grupo polar dos fosfolípidos, o lipossoma pode adquirir uma carga positiva, negativa ou neutra (LOMBARDO *et al.*, 2016).

Além dos fosfolípidos, existem mais componentes lipossomais que podem melhorar sua estabilidade, como o colesterol (CH); glicóis, como o polietilenoglicol (PEG); e até mesmo polímeros, como quitosana. Esses componentes podem exercer vários efeitos nos tecidos e células, assim como podem ativar ou suprimir o sistema imunológico (INGLUT *et al.*, 2020). A incorporação do CH na bicamada lipídica pode influenciar na fluidez da bicamada podendo reduzir ou aumentar sua permeabilidade, assim como a sua estabilidade *in vitro* e *in vivo*. As moléculas de CH se acomodam entre os fosfolípidos com um grupo hidroxila próximo a região hidrofílica e os anéis paralelos à cadeia de ácidos graxos da bicamada lipídica (BELTRÁN-GRACIA *et al.*, 2019). O CH é crucial para a estabilidade estrutural do lipossomas, na sua ausência os lipossomas podem interagir com as proteínas (albumina, transferrina e lipoproteínas de alta densidade). Essas interações podem desestabilizar a estrutura da membrana lipossomal, e conseqüentemente, reduzir sua performance como sistema de entrega de fármacos ( LU *et al.*, 2013; MARANHÃO *et al.*, 2017).

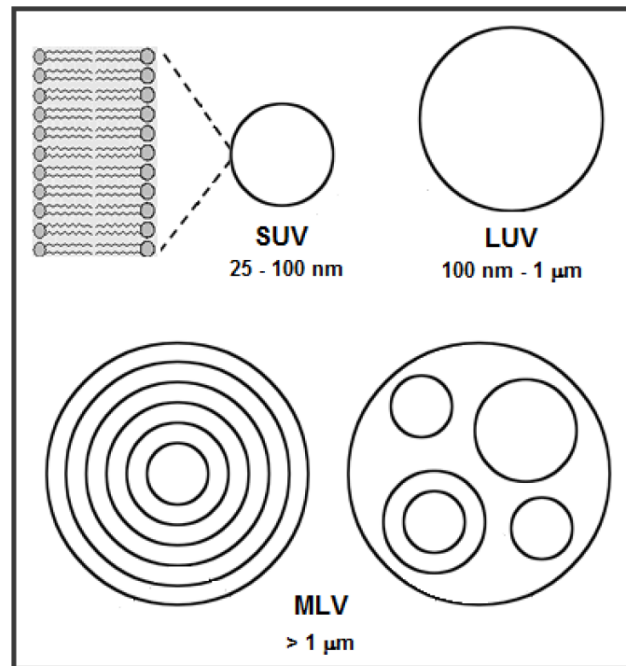
Apesar da vasta gama de métodos convencionais aplicados na preparação de lipossomas, os mais comumente usados são o método de Bangham, evaporação em fase reversa e dispersão de solução orgânica de lípidos (KARN *et al.*, 2013; MEURE *et al.*, 2008). Esses métodos envolvem os seguintes estágios básicos: lípidos dissolvidos em solventes orgânicos, remoção de solvente orgânico, purificação de lipossomas e caracterização química e físico-química dos lipossomas finais (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

No método de evaporação em fase reversa os fosfolípidos são solubilizados em solvente orgânico para a formação do filme e o solvente orgânico é então removido por rotaevaporação. O filme é então redissolvido em éter etílico seguido da adição da fase aquosa, resultando na formação de uma emulsão óleo/água (PATTNI *et al.*, 2015). Se necessário, a mistura é sonicada até a formação de uma emulsão. A evaporação do éter etílico sob baixa pressão resulta então numa dispersão lipossomal (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

O diâmetro dos lipossomas pode variar de vesículas muito pequenas (0,025  $\mu\text{m}$ ) a maiores (2,5  $\mu\text{m}$ ). Além disso, lipossomas podem ter uma ou mais membranas. O tamanho das vesículas é um parâmetro que determina o tempo de meia-vida que os lipossomas ficam na circulação sanguínea e o número de bicamadas afeta a quantidade de substância bioativa encapsulada nos lipossomas (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

Vesículas unilamelares menores (SUV) consistem em uma única bicamada lipídica com um diâmetro médio entre 25 a 100 nm. Vesículas unilamelares maiores (LUV) também consistem de uma única bicamada lipídica e são maiores que 100 nm, ao passo que vesículas multilamelares (MLV) são compostas por várias bicamadas lipídicas concêntricas e medem de 1 – 5  $\mu\text{m}$  (Figura 7) (LOPES *et al.*, 2013).

**Figura 7** - Classificação dos lipossomas de acordo com diâmetro médio e número de bicamadas.



Adaptado de LOPES *et al.*, 2013.

A maioria dos lipossomas produzidos passam por métodos para redução do seu tamanho, como a sonicação, homogeneização ou extrusão. (MEURE *et al.*, 2008).

## 2.4 Estudo de Avaliação da Toxicidade Aguda

O estudo de avaliação da toxicidade aguda é uma etapa importante quando o objetivo é a introdução de novos produtos farmacêuticos para uso clínico (LIU *et al.*, 2010). Recentemente, existe um grande esforço das agências de bioética em reduzir o uso de roedores e outros animais nos estudos de segurança de novos produtos para uso humano. Métodos *in vitro*, utilizando cultura de células, têm sido propostos como métodos alternativos com boa predição da toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2011).

As pesquisas envolvendo toxicidade aguda devem ser conduzidas em animais saudáveis, de origem conhecida, com peso e idade adequados por períodos pré-



determinados, de acordo com as diferentes regulamentações preconizadas por diversos órgãos internacionais (FDA, 1996; OECD, 2001). Para o uso correto dos animais os guias preconizam um período de acompanhamento dos animais de, no mínimo, quatorze dias após o tratamento e que todos os grupos experimentais sejam avaliados com relação aos sinais clínicos, peso corporal e patologia clínica (hematológica e bioquímica) e que os animais sejam necropsiados (OECD, 2001).

Atualmente, é observado um aumento do estudo e do uso de nanopartículas. Porém, devido à falta de regulamentação específica para as nanopartículas, os estudos envolvendo a toxicidade dessas novas formas farmacêuticas ainda são controversos quanto a padronização e resultados. No entanto, alguns órgãos regulatórios, como o FDA, recomendam o estudo de toxicidade para sistemas lipossomais utilizando a forma encapsulada, o fármaco livre e o carreador puro (FDA, 2010).

Dessa maneira, estudos pré-clínicos de avaliação da toxicidade aguda de novos sistemas lipossomais contendo TE são necessários e importantes para se conhecer o seu perfil de segurança.

## **2.5 Validação de método por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS)**

Validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2020).

A validação deve ser suficientemente abrangente para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação. O processo de validação de um método deve estar descrito num relatório com o objetivo de confirmar a adequação dos métodos para o uso pretendido. Os resultados obtidos devem ser registrados assim como o procedimento utilizado para a validação e uma avaliação de que o método é ou não adequado para o uso pretendido. Os estudos de avaliação dos parâmetros de validação devem ser realizados utilizando equipamentos e instrumentos dentro das

especificações, funcionando corretamente e devidamente qualificados (EURACHEM, 2016).

Os parâmetros a serem verificados durante o processo de validação de método para a determinação de traços em atendimento às demandas do INMETRO são: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), tendência/recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e a robustez sendo um procedimento opcional. Assim, a utilização de métodos analíticos altamente sensíveis, rápidos e confiáveis é extremamente necessária para obtenção de uma resposta correta (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2020).

Algumas características da GFAAS, como o uso de pequenas quantidades de amostra, a eliminação eficiente de interferências espectrais e não espectrais, a possibilidade de se utilizar processos mais simplificados de preparo de amostras, baixos valores para os limites de quantificação e custo relativamente baixo, tornam a técnica atrativa para o monitoramento da presença de metais em determinados tecidos (PEREIRA *et al.*, 2011).

Com o uso do forno de grafite, poucos microlitros de amostra são depositados dentro do tubo, que é aquecido eletricamente mediante a passagem de corrente elétrica. Dessa forma, uma série programada de eventos de aquecimento ocorre, cuja as etapas são a secagem, pirólise, atomização e limpeza. A temperatura e duração de cada etapa de aquecimento podem ser controladas, sendo essencial para o desenvolvimento de metodologias analíticas (SKOOG, *et al.*, 2007).

Algumas técnicas de correção de fundo (ruído) estão disponíveis comercialmente para compensar interferências, entre elas podemos citar o corretor de fundo por efeito Zeeman (HOLLER, *et al.*, 2009).

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* de lipossomas contendo TE e desenvolver um método analítico para a determinação de antimônio em coração de camundongos BALB/c.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar do ponto de vista químico e físico-químico lipossomas contendo TE;
- Investigar a toxicidade aguda da formulação lipossomal contendo TE em animais saudáveis por meio de observação comportamental; determinação do peso corporal, morbidade e mortalidade; análises bioquímicas, hematológicas e histológicas;
- Otimizar o procedimento de digestão ácida com ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e as condições instrumentais da técnica de GFAAS: temperatura de concentrador, tempo de digestão, temperatura de pirólise, tempo de pirólise e temperatura de atomização;
- Fornecer evidências de que o método desenvolvido satisfaz os requisitos especificados no documento do INMETRO (DOQ-CGCRE-008), por meio da validação, demonstrando sua adequação para o uso pretendido.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Tartarato de potássio-antimônio trihidratado (tártaro emético – TE) (Sigma-Aldrich, EUA), cloreto de sódio (MERCK KGaA, Alemanha), fosfatidilcolina de ovo (EPC) (Lipoid GmbH, Alemanha), 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-CHOL) (Chem-Impex International, Inc., EUA), clorofórmio (Vetec Quimica Fina Ltda, Brasil), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (MERCK, Alemanha), fosfato de potássio monobásico anidro (Vetec Quimica Fina Ltda, Brasil), HEPES (Vetec Quimica Fina Ltda, Brasil), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (ECIBRA, Brasil).

Os kits para análises bioquímicas foram obtidos das empresas Labtest (Lagoa Santa, Brasil) e Bioclin (Belo Horizonte, Brasil). Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com cerca de 8 a 10 semanas para estudo de toxicidade aguda e coleta de órgãos para validação de método em GFAAS. O estudo em modelo animal experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob protocolo n° 240/2018.

Para a validação de método em GFAAS todos os reagentes foram de grau analítico, ácido nítrico a 65% (v/v) (MERCK, Alemanha), peróxido de hidrogênio 30% (v/v) (Labsynth Produtos Para Laboratório Ltda, Brasil) e solução de referência de 1000 mg L<sup>-1</sup> de antimônio (MERCK, Alemanha).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparo dos lipossomas**

#### **4.2.1.1 Preparo do tampão PBS**

Foram pesadas as massas de cada reagente, descritos a seguir: 0,4490 g de fosfato de sódio dibásico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,0211 g de fosfato de potássio monobásico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro), 0,8050 g de NaCl em balança analítica. Em seguida, efetuou-se a solubilização desses reagentes em cerca de 50 mL de água destilada em um béquer, ajustou-se o pH com NaOH 1M até 7,4, com auxílio de um pHmetro (pHMETRO DM-20/DIGIMED, Brasil). Em seguida, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

#### **4.2.1.2 Solubilização do TE**

Para o preparo dos lipossomas foram pesados 300 mg de TE, seguida de sua transferência para um frasco de penicilina contendo 5 mL de tampão PBS e procedeu-se a homogeneização no agitador magnético por cinco minutos até completa solubilização.

#### **4.2.1.3 Preparo do tampão HEPES**

Foram pesados 0,2397 g de HEPES, 0,8490 g de NaCl, 0,1462 g de EDTA em balança analítica e solubilizou-se em cerca de 70 mL de água destilada em um béquer. Em seguida, ajustou-se o pH com solução de NaOH 1M até pH 7,4, com auxílio de um pHmetro (pHMETRO DM-20/DIGIMED, Brasil). A solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

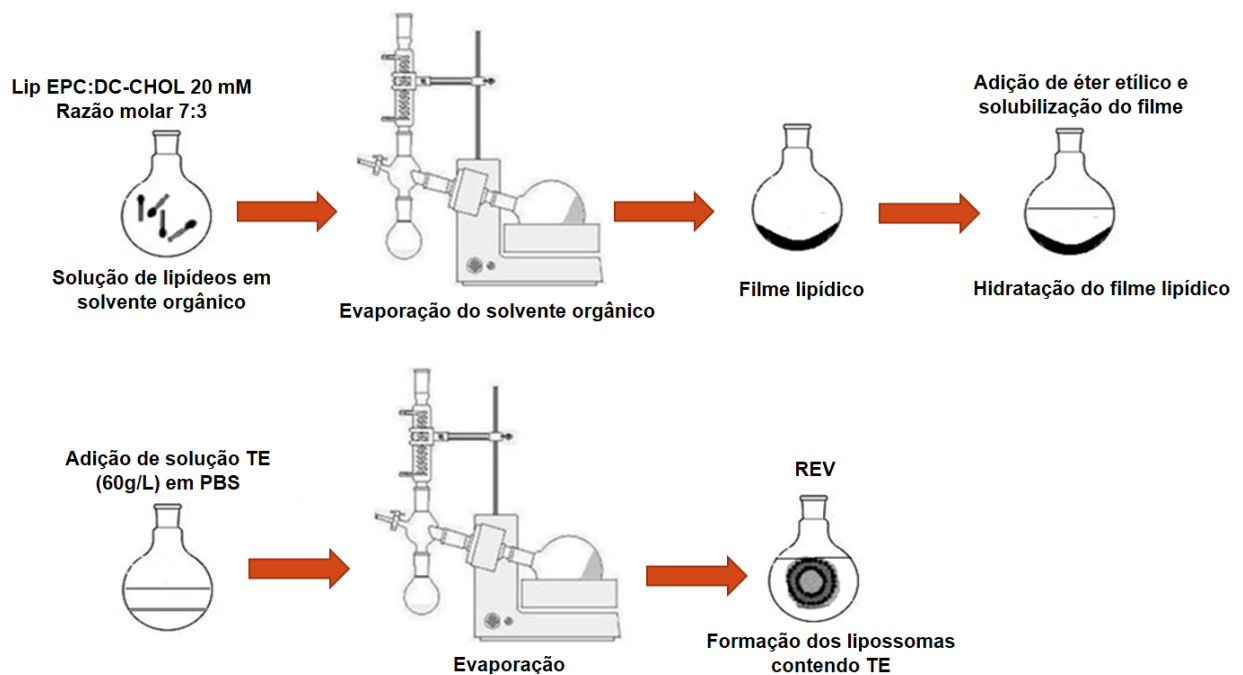
#### 4.2.1.4 Eliminação de peróxido do éter etílico

A proporção de éter etílico:HEPES foi de 3:1, de modo que foram medidos 21 mL de éter etílico e 7 mL de HEPES, por exemplo. O éter etílico e o tampão HEPES foram adicionados em um funil de decantação, e procedeu-se a agitação dos mesmos, sendo posteriormente descartada a fase aquosa.

#### 4.2.1.5 Preparo dos lipossomas contendo TE

Foram preparados lipossomas contendo TE e lipossomas brancos (sem TE), sendo utilizado o método de evaporação em fase reversa (REV) conforme ilustrado na Figura 8.

**Figura 8** - Descrição do método de preparo de lipossomas por evaporação em fase reversa.



Adaptado de LOPES *et al.*, 2013

Inicialmente, foi formado um filme lipídico contendo EPC e DC-CHOL na concentração lipídica total de 20 mM (razão molar 7:3, respectivamente). Para 5 mL de formulação foram aliqüotados 2,34 mL da solução de EPC 30mM e 0,6 mL da solução de DC-CHOL 50 mM, os quais foram transferidos para um balão de fundo redondo de 150 mL. A evaporação do solvente orgânico e formação do filme lipídico foram realizadas nas seguintes condições: rotavapor a 200 rpm, 25°C e 1 hora. O éter etílico tratado foi adicionado ao filme lipídico e vortexado para homogeneizar. No balão de fundo redondo foi acrescentada a solução de 5 mL de solução de TE (60 g/L) preparada em PBS. As soluções foram evaporadas em rotavapor nas condições de rotação de 200 rpm, a uma temperatura de 28°C, a 336 mBar, durante 4 horas e 30 minutos.

#### **4.2.1.6 Calibração dos Lip-TE**

As formulações foram submetidas a extrusão através de membranas de policarbonato de 0,4 e 0,2  $\mu\text{m}$ , sendo 10 vezes na membrana de 0,4  $\mu\text{m}$  e cinco vezes na membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.1.7 Purificação dos Lip-TE e Lip-Branco**

Os Lip-TE e Lip-Branco foram purificados por ultracentrifugação (Beckman Coulter, Estados Unidos) nas condições de 150000 g, 4 °C e 90 minutos.

#### **4.2.1.8 Ressuspensão do pellet**

Foi adicionado sobre o pellet obtido um volume de tampão PBS quatro vezes menor do que a quantidade de sobrenadante pesada anteriormente, sendo assim, foram retirados 3,37 mL de sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 0,84 mL de PBS. Essa correção foi feita para a formulação alcançar a dose a ser administrada em camundongos BALB/c de 16 mg/Kg de  $\text{Sb}^{3+}$ .

## 4.2.2 Caracterização química e físico-química dos lipossomas

### 4.2.2.1 Determinações de diâmetro, índice de polidispersão e do potencial zeta

As análises do diâmetro e do índice de polidispersão (IP) das partículas foram realizadas por espectroscopia de correlação de fótons à 25 °C e ângulo de 90°. O potencial zeta foi avaliado por espalhamento dinâmico da luz associado à mobilidade eletroforética, à um ângulo de 90°. As medidas foram efetuadas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nanno ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra). A diluição das amostras seguiu a proporção de 50 µL de Lip-TE : 1 mL de tampão PBS e 50 µL Lip-Branco : 1 mL de tampão PBS.

### 4.2.2.2 Determinações do teor de encapsulação de antimônio trivalente no Lip-TE

O doseamento da quantidade de TE presente nos lipossomas antes e após purificação, assim como na solução padrão foi realizado utilizando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (SpectrAA Zeeman-220, Varian, Austrália). As condições de análise para a determinação do antimônio trivalente nas amostras estão descritas na Tabela 3.

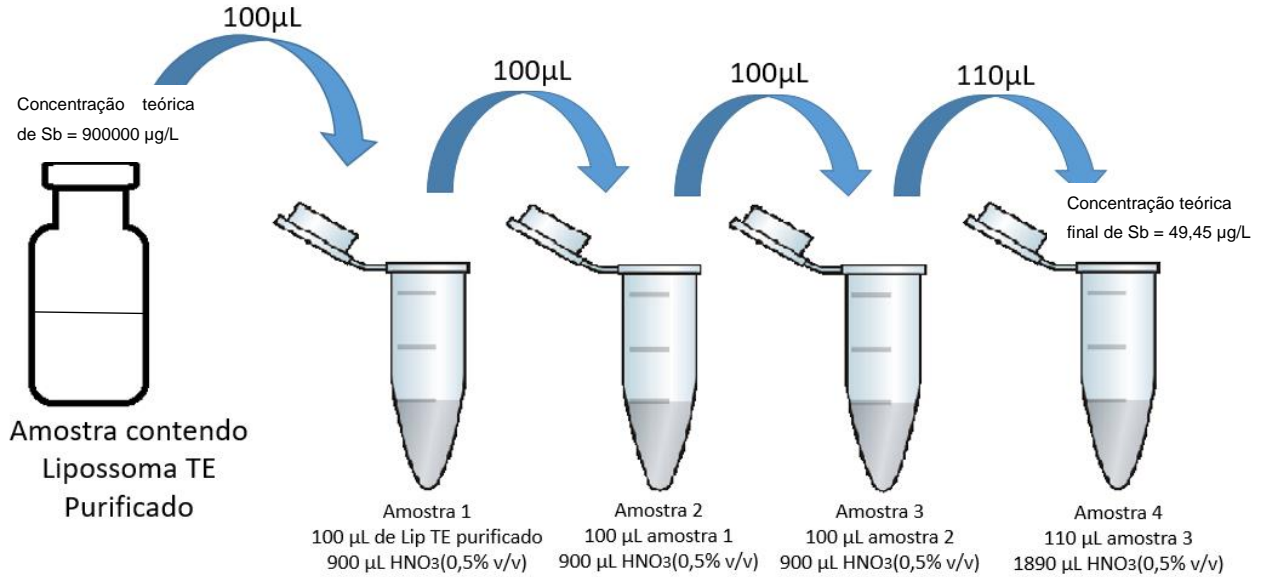
**Tabela 3** - Condições de análise para determinação de antimônio trivalente por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

Temperatura do Forno (°C)	Rampa (s)	Platô (s)	Fluxo de argônio (L/min)
85	5	---	3
95	40	---	3
120	10	---	3
350	15	---	3
700	5	(5; 2)	(3; 0)
2000	0,6	2	0
2300	2	---	3

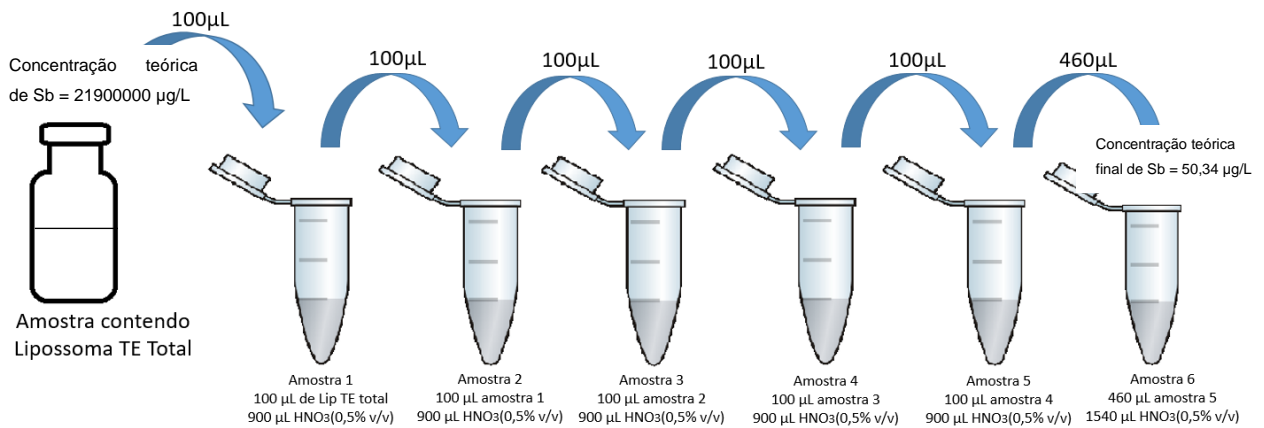


As amostras foram preparadas conforme discriminado nas Figuras 9, 10 e 11.

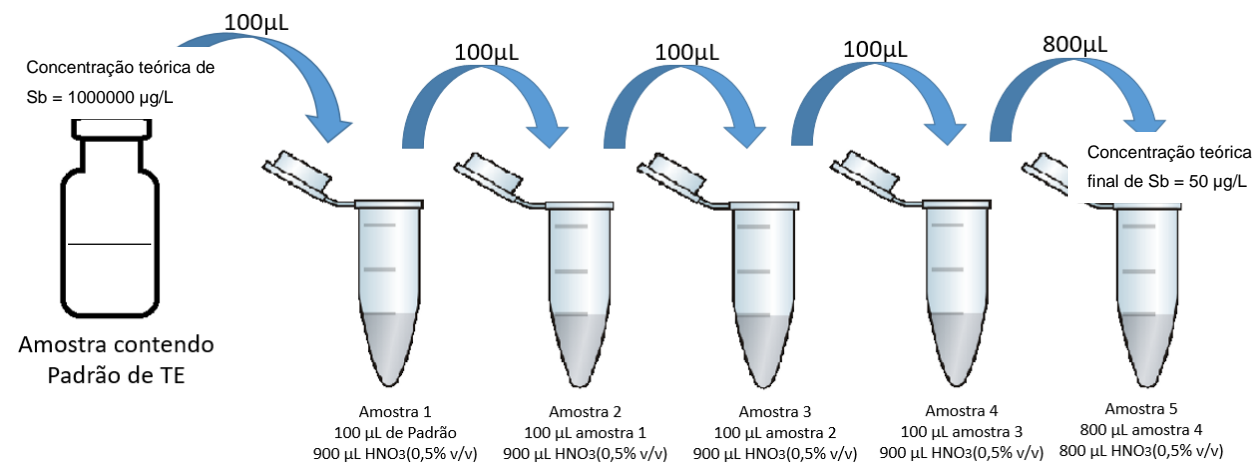
**Figura 9 - Diluição seriada com a amostra de lipossoma TE purificado.**



**Figura 10 - Diluição seriada com a amostra lipossoma TE total.**



**Figura 11 - Diluição seriada da solução padrão de TE.**



Todas as amostras foram feitas em triplicata e cada diluição homogeneizada 3 vezes.

#### 4.2.2.3 Criomicroscopia eletrônica

A morfologia de Lip-TE foi analisada mediante o emprego de criomicroscopia eletrônica. As imagens foram registradas com o emprego de um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 – FEI SpiritBlotwin - 120 kV.

#### 4.2.3 Estudo de toxicidade aguda *in vivo* de lipossomas contendo TE

Para determinação da toxicidade aguda *in vivo* de Lip-TE foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c sadios com idade entre 8 a 10 semanas, com peso aproximado de 20g ± 20%. Antes do início dos experimentos os animais foram ambientados por um período de uma semana.

Para cada grupo foram utilizados seis animais, seguindo adaptação do protocolo preconizado pela OECD 423.

Os grupos de tratamento foram Lip-TE (16 mg/Kg de Sb<sup>3+</sup>), Lip-Branco (dose de lípides equivalente àquela administrada nos animais tratados com Lip-TE 16 mg/Kg de

Sb<sup>3+</sup>), TE livre (16 mg/Kg de Sb<sup>3+</sup>) e PBS (controle). Todos os grupos foram tratados pela via intravenosa (IV) com volume de 100 µL em dose única.

Após os tratamentos, os animais foram observados por 14 dias. Durante o período de observação foram avaliados parâmetros comportamentais, peso corporal, morbidade e mortalidade. A variação de peso foi calculada de acordo com o peso inicial dos animais comparando com o sétimo e décimo quarto dias. A equação utilizada para o cálculo da variação de peso está representada abaixo.

$$\left( \frac{\text{Peso dia 7 ou 14} \times 100}{\text{Peso inicial}} \right) - 100$$

Terminado os 14 dias de observação os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), e o sangue coletado para as análises hematológicas e bioquímicas. Após a eutanásia, os órgãos (coração, fígado, rins e baço) foram coletados para análise histopatológica.

Também foram preparados lipossomas com concentração final para administração de 32 mg/kg Sb<sup>3+</sup>, 24 mg/kg Sb<sup>3+</sup>, 20 mg/kg Sb<sup>3+</sup> e 18 mg/kg Sb<sup>3+</sup>. As doses foram reduzidas de acordo com a adaptação do protocolo da OECD e os dados obtidos estão descritos na Tabela 8.

#### **4.2.3.1 Preparo da solução de tártaro emético livre utilizada no ensaio de toxicidade aguda**

Para o preparo da solução contendo TE livre utilizada no ensaio *in vivo* foram pesados 89 mg de TE, logo após foram transferidos para um frasco de penicilina e adicionados 10 mL de PBS. Sendo assim a concentração final da solução de TE livre foi de aproximadamente 8,9 g/L, para administração final de uma dose na concentração 16 mg/Kg de Sb<sup>3+</sup>.

#### **4.2.3.2 Análise hematológica e bioquímica**

O sangue total foi coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo 50 µL de solução anticoagulante (EDTA 0,1M). Os parâmetros hematológicos avaliados foram: células vermelhas, hemoglobina, células brancas, linfócitos e granulócitos. Os parâmetros foram mensurados utilizando o analisador hematológico Hemovet 2300 (Sinothinker Technology, China).

O sangue total foi centrifugado (3500 rpm, 10 min) e o plasma foi obtido para análise dos parâmetros bioquímicos. Para esse teste foi utilizado o analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) utilizando-se kits comerciais.

A função cardíaca foi avaliada por meio da dosagem de creatino quinase isoforma MB (CK-MB), a função hepática por meio da dosagem de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) e a função renal por meio da dosagem de ureia e creatinina.

#### **4.2.3.3 Análise histopatológica**

Para investigação histopatológica foram coletados coração, fígado, baço e rins. Os órgãos foram então fixados em formol tamponado a 10%, e posteriormente, incluídos em blocos de parafina. Destes blocos, foram obtidas secções de 4 µm e estas foram coradas por hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas por câmera acoplada a microscópio óptico. As lâminas foram avaliadas pelo professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, do departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG,

#### **4.2.3.4 Análise estatística**

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média. A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Os dados foram posteriormente avaliados por análise de variância (ANOVA) e se observada diferença estatística os resultados foram submetidos ao teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

#### **4.2.4 Validação de método analítico de espectrometria de absorção atômica**

##### **4.2.4.1 Equipamentos e instrumentos**

Para realizar as análises o instrumento utilizado foi um espectrômetro de absorção atômica (Agilent Technologies, modelo 240Z AA – 200 Series AA, EUA), possuindo também amostrador automático (Agilent Technologies, modelo PSD 120, EUA) e atomizador de tubo de grafite (Agilent Technologies, GTA 120, EUA) com correção de fundo por Zeeman. O equipamento é operado por microcomputador e pelo software SpectrAA versão 5.2 pro. O volume de amostra pipetado para o tubo foi de 17  $\mu$ L. A lâmpada de cátodo oco (Agilent Technologies, EUA) utilizada foi a de Sb operada em 217,6 nm, com 10 mA de corrente e largura de banda espectral de 0,2 nm. Foram utilizados tubos de grafite pirolíticos (Varian, Austrália) aquecidos de forma longitudinal. O gás de purga utilizado foi o Argônio premier (Air Products, Brasil) com 99,9992% (v/v) de pureza. Todas as soluções foram preparadas utilizando água purificada tipo 1 (18,2  $M\Omega \cdot cm^{-1}$  a 25°C) produzida a partir de um sistema de Direct-Q® (Millipore, França).

Outros equipamentos utilizados foram o concentrador Tecnal TE-019 (Tecnal, Brasil), balança analítica Sartorius TE1245 (Sartorius, Alemanha), homogeneizador Ultra-turrax IKA T25 (IKA Labortechnik, Alemanha) e micropipetas monocal de volume variável (20-200  $\mu$ L – LabMatepro, 100-1000  $\mu$ L – LabMatepro e LM10000 1-10 mL – LabMate+, Polônia).

Todos os materiais utilizados (béquer, ponteiras de 200  $\mu$ L, ponteiras de 1 mL, eppendorfs, vials, copo do amostrador GFAAS, tubos pyrex e balões de 10 mL) foram

descontaminados antes do uso, por meio de incubação em água por 24 horas, contato com solução de ácido nítrico 20% (v/v) por no mínimo 24 horas, enxague com água purificada e secagem à temperatura ambiente em bancada limpa e em vasilhas protegidas de poeira.

#### **4.2.4.2 Eutanásia e coleta de órgãos**

Camundongos fêmeas BALB/c foram anestesiadas com 200  $\mu$ L de solução anestésica ketamina (100 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), o sangue coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo 50  $\mu$ L de solução anticoagulante (EDTA 0,1M). Após a eutanásia, foram coletados coração, fígado, baço e rins em placa de petri contendo papel filtro, sendo utilizado tampão PBS para retirar o excesso de sangue dos órgãos. Todos os órgãos foram pesados para posterior determinação percentual de Sb nas amostras. O sangue foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e após foi retirado o plasma e congelado para posterior análise.

Os tecidos foram pesados em vials com capacidade de 5 mL, adicionou-se 2 mL de PBS e foram triturados com auxílio de ultra-turrax até completa homogeneização. Os vials contendo fígado, baço e rins foram então congelados para posteriormente realizarmos a validação do método de doseamento de Sb por espectrometria de absorção atômica nessas matrizes.

#### **4.2.4.3 Preparo da amostra por digestão ácida**

O preparo da amostra de coração foi realizado como ilustrado na Figura 12. Inicialmente pesou-se em tubo pyrex aproximadamente 1000 mg de coração homogeneizado em PBS, ao tubo foi adicionado 1 mL de HNO<sub>3</sub> 65% (v/v), a mistura foi então aquecida em concentrador a 120°C por 1 hora e 30 minutos, e logo após, foi resfriado a temperatura ambiente. Ao tubo adicionou-se 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v), a mistura foi novamente aquecida em concentrador a 70°C por 1 hora e 30 minutos,

obtendo completa solubilização da amostra. Após o resfriamento, transferiu-se quantitativamente a mistura para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água tipo 1. Homogeneizou-se a solução obtida e transferiu-se uma porção para copo amostrador para análise por GFAAS.

**Figura 12** - Fluxograma do método proposto para a quantificação de Sb em coração de camundongos BALB/c por GFAAS.



#### 4.2.4.4 Otimização do método

O desenvolvimento e a otimização do método analítico por GFAAS foi baseado em estudo prévio realizado por Aguiar e colaboradores (AGUIAR *et al.*, 2018), como descrito na Tabela 4. As amostras passaram por etapas de investigação experimental descritas abaixo utilizando amostra fortificada com o antimônio.

**Tabela 4** - Programa de temperatura utilizado para determinação analítica de Sb em coração da camundongos BALB/c por GFAAS.

Passo	Temperatura	Tempo (s)	Fluxo de argônio	Medição (M) e
-------	-------------	-----------	------------------	---------------

	(°C)		( L/min)	registro (R) dos dados
<b>1 – Pré-secagem</b>	85	10	0,3	
<b>2 – Pré-secagem</b>	95	25	0,3	
<b>3 - Secagem</b>	120	30	0,3	
<b>4 - Pirólise</b>	350	30	0,3	
<b>5 - Pirólise</b>	750	10	0,3	
<b>6 - Pirólise</b>	750	2	0,3	
<b>7 - Pirólise</b>	750	0.5	0,0	<b>R</b>
<b>8 - Atomização</b>	2300	0.7	0,0	<b>M e R</b>
<b>9 - Atomização</b>	2300	2	0,0	<b>M e R</b>
<b>10 - Limpeza</b>	2300	0.1	0,3	<b>R</b>
<b>11 - Limpeza</b>	2300	3	0,3	

Adaptado de AGUIAR *et al.*, 2018.

Com base na literatura e com os dados obtidos anteriormente a faixa de temperatura foi avaliada e a análise foi feita em triplicata da matriz branca fortificada em comparação com o padrão em curva aquosa (HNO<sub>3</sub> 5% v/v) em concentração conhecida de 50 µg/L de Sb. Na concentração de 50 µg/L de Sb o equipamento deve fornecer uma leitura de aproximadamente 0,2 de absorvância em comprimento de onda de 217,6 nm. Nessa etapa do estudo foram observadas a intensidade do sinal analítico, do sinal de fundo e o perfil do sinal analítico.

Após o desenvolvimento do método, o mesmo foi validado de acordo com os critérios analíticos que devem ser observados pelos laboratórios credenciados pelo INMETRO que seguem a ABNT NBR ISO/IEC 17025. Neste trabalho foram avaliados os parâmetros de desempenho correspondentes a seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), tendência/recuperação e precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade).



#### 4.2.4.5 Seletividade (Efeito Matriz)

Como o estudo é conduzido em matriz sem o analito disponível preparou-se duas curvas analíticas, uma contendo a matriz (coração digerido) e a outra somente com solução de ácido nítrico 5% (v/v) com a mesma adição de analito para cada nível de concentração (20, 40, 60, 80 e 100 µg/L). As curvas foram preparadas em triplicata para cada nível e analisadas aplicando o método otimizado.

A avaliação dos resultados obtidos nos 5 níveis de fortificação foi realizada aplicando o teste t de Student (95%) para comparação de médias.

#### 4.2.4.6 Linearidade

Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ICH, 2005).

Na construção da curva de calibração utilizaram-se cinco níveis de concentração de matriz fortificada com três réplicas para cada nível. Os níveis de concentração escolhidos estão mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Níveis de concentração da curva de calibração para determinação de Sb em coração de camundongos BALB/c por GFAAS.

Níveis de calibração	Concentração de Sb (µg/L)
1	0
2	20
3	40
4	60
5	80
6	100

Para a escolha das concentrações da curva de calibração, levou-se em consideração o teor obtido por Azevedo e colaboradores (AZEVEDO *et al.*, 2011). Foram verificados a ausência de valores aberrantes (outliers) para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados. A verificação da ausência de valores aberrantes foi feita com base nos resíduos padronizados Jackknife e a homocedasticidade pelo teste de Cochran. Observou-se um sistema homocedástico e então a equação da regressão linear simples foi calculada usando o método dos mínimos quadrados ordinários não ponderados. Calculou-se os coeficientes do modelo da regressão linear simples, os resíduos e o coeficiente de correlação linear ( $r$ ). A linearidade foi avaliada também por meio do test F (Fischer-Snedecor) na análise da variância (ANOVA) da regressão.

#### 4.2.4.7 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Realizou-se a análise de 10 réplicas de matriz branca e os valores obtidos foram utilizados para calcular (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2020):

$$LD = \bar{X} + t_{(9, 95\%)} \cdot s$$

$$LQ = \bar{X} + 10 \cdot s$$

Onde:  $\bar{X}$  = média dos valores dos brancos da amostra;  $t$  = abscissa da distribuição de Student, com 9 graus de liberdade e 95% de confiança;  $s$  = desvio padrão da resposta do branco.

Realizou-se a confirmação do valor do LQ com 10 réplicas de amostras fortificadas no mesmo nível de concentração determinando a sua recuperação.

#### 4.2.4.8 Tendência/Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela fortificação da amostra antes da digestão com concentrações conhecidas. Fortificou-se a matriz com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa 200 µg/kg, média 600 µg/kg e alta 1000 µg/kg de Sb) da faixa de uso do método e foram realizadas 6 leituras para cada nível. Normalmente, os critérios de aceitação para a recuperação estão atrelados ao nível de concentração. Na Tabela 6, temos o exemplo dos critérios sugeridos pela AOAC 2016.

**Tabela 6 - Critérios de aceitação para recuperação.**

Analito, %	Fração Mássica (C)	Unidade	Recuperação média, %
100	1	100%	98 – 102
10	10 <sup>-1</sup>	10%	98 – 102
1	10 <sup>-2</sup>	1%	97 – 103
0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1%	95 – 105
0,01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm (mg/kg)	90 – 107
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm (mg/kg)	80 – 110
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb (µg/kg)	80 – 110
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb (µg/kg)	60 – 115
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb (µg/kg)	40 – 120

Adaptado de AOAC, 2016

Para a nossa análise foi considerada a recuperação média de 80-110%, pois o analito encontra-se na unidade de 1000 ppb (µg/kg).

#### 4.2.4.9 Precisão

Normalmente, a precisão é determinada para circunstâncias específicas de medição e a forma comum de expressá-la é por meio da determinação da repetibilidade e precisão intermediária (realizada de forma independente em diferentes dias, ou seja, realizada com novo preparo de amostras, padrões e calibrações), sendo usualmente

expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação (CV) também conhecido como desvio padrão relativo (DPR) é calculado da seguinte forma:

$$DPR = (DP / CMD) \times 100$$

Onde: DP é o desvio padrão; CMD é a concentração média determinada.

O valor do DPR que utilizamos para a aceitação da repetibilidade foi de 15%, seguindo os critérios sugeridos pela AOAC 2016.

Portanto, foram preparadas seis replicatas de matriz branca fortificada em três níveis de concentração de 200 µg/kg, 600 µg/kg e 1000 µg/kg de Sb. Realizou-se o experimento por duas vezes em dias diferentes para a avaliação da repetibilidade. Calculou-se, a partir dos resultados obtidos, a concentração de cada réplica, a concentração média para cada nível de adição, o DP e o DPR. O DPR teórico ( $DPR_{Horwitz}$ ) para cada nível de concentração foi calculado utilizando a equação de Horwitz (INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2020):

$$DPR = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Onde: C é a concentração (µg/kg) x 10<sup>-9</sup>

Por fim, calculou-se o valor de HORRAT que é dado por:

$$\frac{DPR_{\text{derivado do estudo colaborativo}}}{DPR_{\text{previsto da equação de Horwitz}}}$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização química e físico-química de Lip-TE

O tamanho das vesículas e IP são parâmetros de fundamental importância na caracterização dos lipossomas, tendo relação não só com a estabilidade, mas com a segurança desses sistemas em administrações parenterais (LOPES *et al.*, 2013).

Foram obtidos lipossomas branco (Lip-branco) com diâmetro médio e índice de polidispersão indicativos de amostras monodispersas e o potencial zeta se manteve positivo decorrente da presença do lípide catiônico 3 $\beta$ -[N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol e podem levar à repulsão entre as vesículas, contribuindo para a manutenção do diâmetro das mesmas, e conseqüentemente, para a sua estabilidade de armazenamento. A eficácia do sistema de liberação lipossomal depende de sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear. Este processo pode ser facilitado pela opsonização dos lipossomas, assim como pela via de administração (MOGHIMI *et al.*, 2012). O processo de encapsulação do TE não alterou os parâmetros físico-químicos da formulação (Tabela 7). A quantidade de TE encapsulada nesses lipossomas catiônicos foi igual a  $8,90 \pm 1,19$  g/L, o que corresponde a aproximadamente 15 % da quantidade de TE inicial utilizada na preparação de Lip-TE. Ao compararmos com estudo de Schettini e colaboradores observamos que os lipossomas obtidos tinham diâmetro médio de  $510 \pm 100$  nm, mostrando assim que os lipossomas utilizados no nosso estudo apresentaram diâmetro menor e mais compatível com a via de administração. Também foi observado que a eficiência de encapsulação de Schettini foi de  $43 \pm 4$ , sendo assim, maior do que a obtida no nosso estudo % (SCHETTINI *et al.*, 2006).

**Tabela 7** - Parâmetros avaliados para caracterização química e físico-química dos Lip-TE e Lip-Branco.

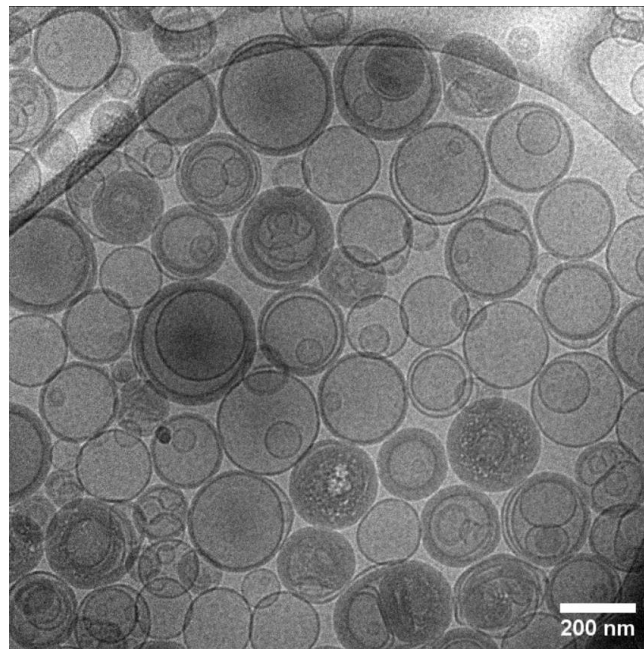
Lote	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)	Teor de encapsulação (g/L)
Lip-TE	$197,5 \pm 2,9$	$0,123 \pm 0,05$	$+21,1 \pm 0,6$	$8,90 \pm 1,19$
Lip-Branco	$141,3 \pm 1,7$	$0,136 \pm 0,05$	$+22,8 \pm 0,35$	Não se aplica

\*O número de amostras foi igual a três. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Atualmente, o uso de nanoestruturas tem sido uma estratégia amplamente empregada no tratamento de várias doenças a fim de, principalmente, diminuir a toxicidade sistêmica de agentes citotóxicos (DAWIDCZYK *et al.*, 2014).

Na Figura 13 podemos observar a foto da criomicroscopia eletrônica dos lipossomas, mostrando que as vesículas apresentam diâmetro médio aproximado de 200 nm. Esse dado vem corroborar com os dados encontrados na avaliação do diâmetro com o emprego da técnica de espalhamento de luz dinâmico Zetasizer. Além disso, em relação à lamelaridade pode-se verificar que a maioria dos lipossomas são do tipo LUV.

**Figura 13** - Fotomicrografia de criomicroscopia eletrônica de transmissão de Lip-TE.



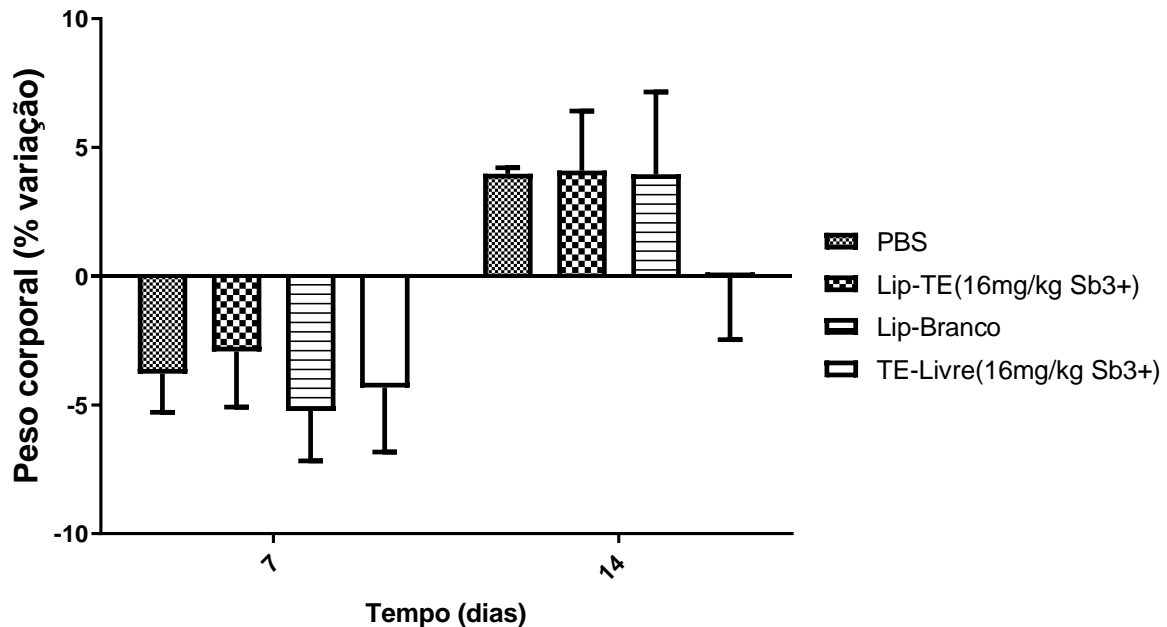
## 5.2 Toxicidade aguda *in vivo* de lipossomas contendo TE

### 5.2.1 Avaliação de peso corporal, sinais clínicos e mortalidade dos animais

A variação do peso corporal é mostrada na Figura 14. Pôde-se observar que não há diferença estatística dos valores de variação de peso entre os grupos de tratamento.

Após 7 dias, observou-se perda de peso em torno de 5% em todos os grupos de tratamento. No entanto, no dia 14, o ganho de peso foi observado nos grupos tratados com PBS, Lip-Branco e Lip-TE, mas no grupo tratado com TE a média não variou ao compararmos com o dia inicial. A mortalidade foi observada apenas no grupo tratado com TE, sendo que dois animais morreram um dia após a administração e os outros apresentaram sinais clínicos de toxicidade pronunciados (prostração, piloereção intensa e diarreia). Nos grupos tratados com Lip-TE e Lip-Branco observou-se discreta piloereção e prostração nas primeiras duas horas após administração.

**Figura 14** - Porcentagem de variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas após 7 e 14 dias de administração intravenosa.



Realizamos também o preparo de lipossomas com concentração final para administração de 32 mg/kg Sb<sup>3+</sup>, 24 mg/kg Sb<sup>3+</sup>, 20 mg/kg Sb<sup>3+</sup> e 18 mg/kg Sb<sup>3+</sup>. Tanto o tratamento com Lip-TE quanto com TE na dose de 32 mg/kg Sb<sup>3+</sup> levou à morte dos animais, e estes apresentaram rigidez cadavérica após uma hora da administração, impossibilitando assim a coleta dos órgãos. Ao reduzirmos a dosagem para 24 mg/kg Sb<sup>3+</sup> os animais não resistiram e também foram encontrados com rigidez cadavérica. Ainda seguindo o que é preconizado pela OECD, administramos também em mais dois

grupos Lip-TE e TE na dose de 20 mg/kg  $Sb^{3+}$ , sendo que um animal do grupo Lip-TE sobreviveu aos 14 dias de tratamento e aqueles tratados com TE morreram. Seguindo o protocolo reduzimos mais uma vez a dose para 18 mg/kg  $Sb^{3+}$  e os animais também não resistiram ao tratamento com Lip-TE ou TE. Os resultados estão compilados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Avaliação da resposta de administração de diferentes doses de Lip-TE e TE em camundongos BALB/c para fins de estudo de toxicidade aguda adaptado do guia da OECD 423.

Dose	Lip-TE (n=3)	TE (n=3)
32 mg/kg $Sb^{3+}$	Os três animais morreram até uma hora após administração.	Os três animais morreram até uma hora após administração.
24 mg/kg $Sb^{3+}$	Os três animais morreram um dia após a administração.	Dois animais morreram no mesmo dia da administração e um animal um dia após administração.
20 mg/kg $Sb^{3+}$	Dois animais morreram um dia após a administração. Um animal sobreviveu os 14 dias.	Um animal morreu após 2h de administração, um animal morreu no dia seguinte e um animal morreu dois dias após a administração.
18 mg/kg $Sb^{3+}$	Os três animais foram encontrados com rigidez cadavérica um dia após administração.	Um animal morreu após 2h de administração, dois animais morreram um dia após a administração.

Portanto, os dados aqui apresentados se referem somente a dose de 16mg/kg  $Sb^{3+}$ , mas outras doses também foram testadas auxiliando na tomada de decisão em relação a dose da substância bioativa a ser administrada.



### 5.2.2 Análise hematológica

Nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) foi observada para todos os grupos de tratamento avaliados com relação aos parâmetros hematológicos como contagem de glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina, glóbulos brancos (WBC), linfócitos e granulócitos (Tabela 9). Ao compararmos o parâmetro hemoglobina, Rodrigues e colaboradores (2018) obtiveram para o grupo controle  $12,8 \pm 0,4$  g/dL, enquanto em nosso estudo o grupo controle (PBS) apresentou um valor de  $12,60 \pm 0,26$  g/dL, assim como todos os outros grupos apresentaram valores próximos ao controle.

**Tabela 9** – Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c tratados com PBS, Lip-TE (16mg/kg  $Sb^{3+}$ ), Lip-Branco e TE (16mg/kg  $Sb^{3+}$ ).

Parâmetro	PBS	Lip-TE (16mg/kg $Sb^{3+}$ )	Lip-Branco	TE (16mg/kg $Sb^{3+}$ )
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	$6,58 \pm 0,08$	$6,69 \pm 0,65$	$6,63 \pm 0,12$	$6,82 \pm 0,83$
Hemoglobina (g/dL)	$12,60 \pm 0,26$	$13,12 \pm 1,68$	$12,93 \pm 0,35$	$14,00 \pm 3,62$
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$4,17 \pm 0,57$	$5,42 \pm 1,41$	$5,27 \pm 0,80$	$4,37 \pm 1,40$
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$1,7 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,8$	$1,8 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,6$
Granulócitos (%)	$53,6 \pm 18,36$	$42,48 \pm 10,02$	$43,93 \pm 1,83$	$31,35 \pm 12,37$

### 5.2.3 Análise bioquímica

A Tabela 10 apresenta parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática (ALT e AST) e cardíaca (CK-MB). Quanto a toxicidade hepática, observou-se aumento significativo de AST (Figura 15) e ALT (Figura 16) nos camundongos tratados com TE (16mg/kg  $Sb^{3+}$ ) em relação aos animais tratados com PBS, Lip-TE (16mg/kg  $Sb^{3+}$ ) e Lip-Branco ( $p < 0,05$ ). No estudo de Rodrigues e colaboradores não foi observada diferença estatística significativa com relação aos parâmetros de ureia e

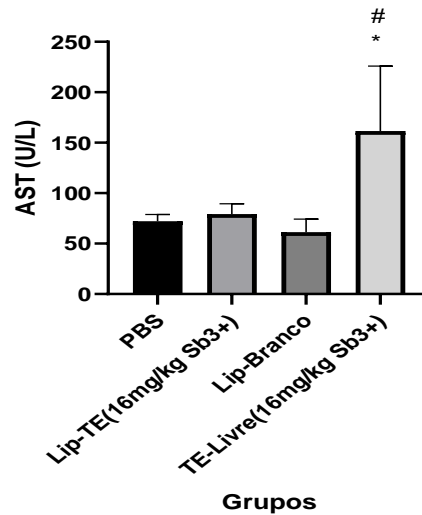
creatinina, os nossos resultados corroboram com os dados e não apresentaram diferença para esses dois parâmetros (RODRIGUES *et al.*, 2018).

**Tabela 10** - Parâmetros bioquímicos de camundongos BALB/c tratados com PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>).

Parâmetro	PBS	Lip-TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> )	Lip-Branco	TE (16mg/kg Sb <sup>3+</sup> )
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,32±0,03	0,28±0,07	0,36±0,06	0,42±0,21
<b>Ureia (mg/dL)</b>	41,32±2,23	35,37±9,74	39,62±1,11	28,44±6,41

A enzima AST é um importante marcador de injúria hepática aguda e que pode indicar também insuficiência cardíaca. O aumento da quantidade de AST no grupo tratado com TE mostra a ocorrência da toxicidade hepática. Essa toxicidade também é observada no estudo de Rodrigues e colaboradores com o tratamento contendo antimoniato de meglumina, onde ocorreu um aumento da atividade de AST chegando a valores de  $129,8 \pm 4,04$  (U/L) (RODRIGUES *et al.*, 2018), enquanto os níveis no grupo TE obtidos em nosso estudo foram  $161.53 \pm 64.38$  (U/L).

**Figura 15** - Avaliação da quantidade de AST em camundongos fêmea BALB/c após 14 dias de administração intravenosa de PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>).

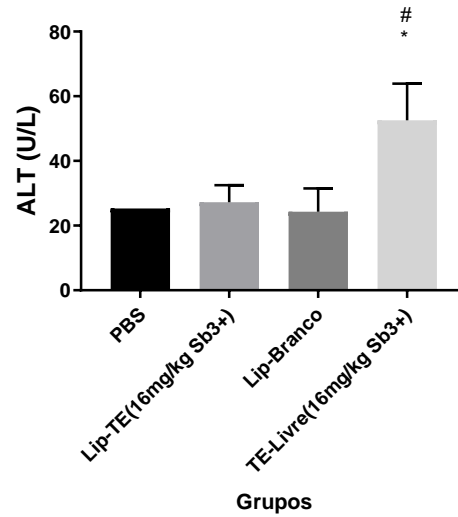


\*Representa diferença significativa entre o grupo PBS e TE ( $p < 0,05$ ).

#Representa diferença estatística significativa entre Lip-TE e TE ( $p < 0,05$ ).

A ALT está presente em altas concentrações no fígado e muito baixa em outros órgãos, tendo assim maior especificidade para indicar injúria hepática (principalmente quando há elevação conjunta da AST). A análise das enzimas aminotransferases séricas (ALT e AST) serve como um importante indicador de lesão de células hepáticas e o aumento das condições patológicas associadas a cirrose, colestase e isquemia hepatocelular (RODRIGUES *et al.*, 2018).

**Figura 16** - Avaliação da quantidade de ALT em camundongos fêmea BALB/c após 14 dias de administração intravenosa de PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>).

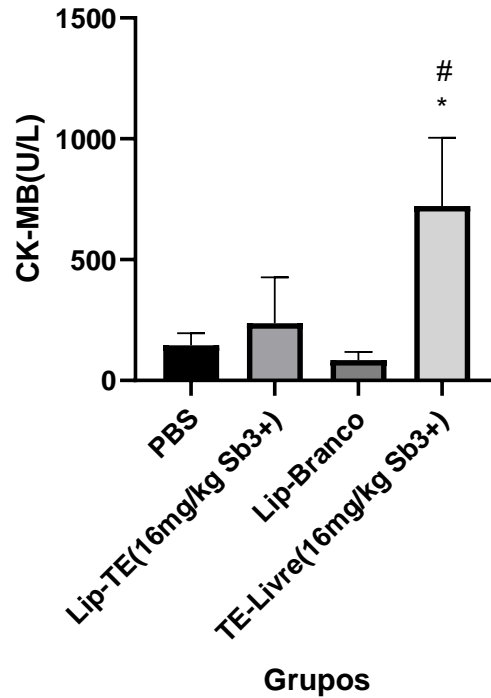


\*Representa diferença significativa entre o grupo PBS e TE ( $p < 0,05$ ).

#Representa diferença estatística significativa entre Lip-TE e TE ( $p < 0,05$ ).

Em relação à toxicidade cardíaca, foi observado aumento significativo de CK-MB nos animais tratados com TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>) em relação aos animais tratados com PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>) e Lip-Branco (Figura 17).

**Figura 17** - Avaliação da quantidade de CK-MB em camundongos fêmea BALB/c após 14 dias de administração intravenosa de PBS, Lip-TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>), Lip-Branco e TE (16mg/kg Sb<sup>3+</sup>).



\*Representa diferença significativa entre o grupo PBS e TE ( $p < 0,05$ ).

#Representa diferença estatística significativa entre Lip-TE e TE ( $p < 0,05$ ).

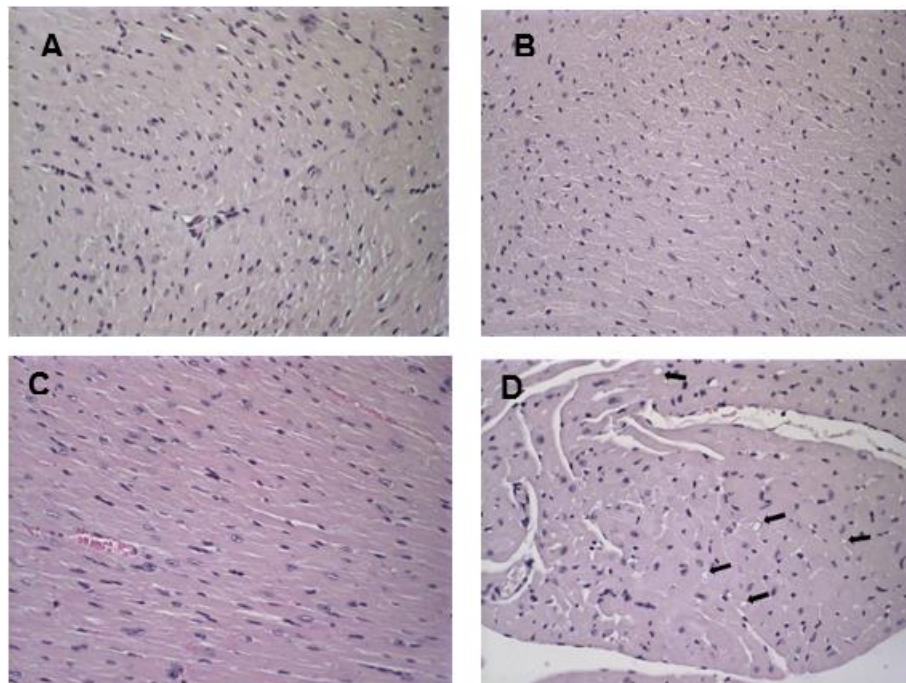
A cardiotoxicidade é o efeito adverso mais conhecido, grave e debilitante após administração de TE, sendo caracterizada por alterações no eletrocardiograma, inversão do segmento ST, prolongamento do intervalo QT, e conseqüentemente, aparecimento de arritmias e parada cardíaca súbita (MACIEL *et al.*, 2010). No presente estudo, observou-se aumento nos níveis séricos de CK-MB (isoenzima liberada na circulação em casos de lesão cardíaca) em animais tratados com TE ao compararmos com os outros grupos de tratamento vale destacar que a encapsulação de TE em lipossomas permitiu reduzir a hepatotoxicidade e cardiotoxicidade induzidas pelo tratamento com TE.

### 5.2.4 Análise histopatológica

Nesse estudo, os camundongos tratados com PBS, Lip-Branco, Lip-TE e TE apresentaram o mesmo perfil histopatológico dos rins e fígado analisados, alterações ocasionais nos tecidos foram observadas, porém não apresentavam diferença entre os grupos de tratamento (dados não apresentados).

As fotomicrografias do músculo cardíaco estão ilustradas na Figura 18. Mudanças morfológicas foram observadas em todos os animais que receberam TE (16 mg/kg  $\text{Sb}^{3+}$ ). Essas fotomicrografias apresentam área focal com discreta vacuolização de cardiomiócitos, compatível com esteatose (Figura 18D). Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos PBS, Lip-Branco e Lip-TE (Figuras 18A, 18B e 18C).

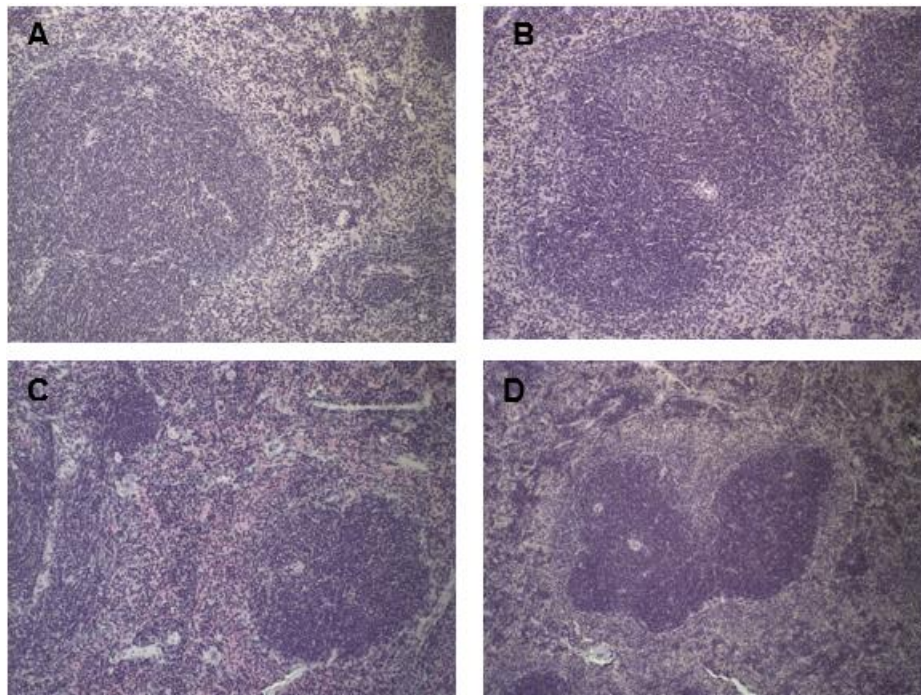
**Figura 18** - Cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c fêmea corados com hematoxilina & eosina. (A) PBS (B) Lip-TE 16 mg/kg  $\text{Sb}^{3+}$  (C) Lip-Branco e (D) TE 16 mg/kg  $\text{Sb}^{3+}$ . As setas pretas indicam vacúolos nos cardiomiócitos.



As fotomicrografias confirmam os dados bioquímicos encontrados, indicando que ocorreu lesão no músculo cardíaco dos animais tratados com TE, porém não foi observada nenhuma mudança nos outros grupos de tratamento.

As fotomicrografias do baço estão ilustradas na Figura 19. Mudanças morfológicas foram observadas em todos os animais que receberam TE (16 mg/kg  $\text{Sb}^{3+}$ ). Essas fotomicrografias apresentam discreta hiperplasia de polpa vermelha (Figura 19D). Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos PBS, Lip-Branco e Lip-TE (Figuras 19A, 19B e 19C).

**Figura 19** - Cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c fêmea corados com hematoxilina & eosina. (A) PBS (B) Lip-TE 16 mg/kg  $\text{Sb}^{3+}$  (C) Lip-Branco e (D) TE 16 mg/kg  $\text{Sb}^{3+}$ .



Conclui-se neste estudo que a encapsulação do TE reduziu significativamente sua toxicidade, observando que efeitos tóxicos cardíacos e hepáticos foram menores para os animais tratados com Lip-TE, portanto, o uso desses lipossomas pode ser um tratamento promissor para LV.

### 5.3 Validação de método analítico de espectrometria de absorção atômica

Em estudos anteriores verificamos que Azevedo e colaboradores (2013) utilizaram a digestão ácida com ácido nítrico 65% (v/v) para análise de Sb por GFAAS em tecidos de cães com LV e tratados com antimônio. A partir disso, propusemos um método para quantificação de Sb em coração de camundongos por GFAAS. A Figura 12 ilustra as etapas do método otimizado.

#### 5.3.1 Efeito Matriz

O primeiro parâmetro a ser avaliado foi o efeito de matriz, pois a partir dele determinou-se a forma de calibração que utilizamos. Quando há efeito de matriz as curvas de calibração matrizadas devem ser utilizadas para compensar a variação do sinal analítico na presença e ausência de matriz.

Foram preparadas soluções para essa avaliação (com e sem matriz – coração de camundongo) e essas foram analisadas utilizando curva de calibração com cinco níveis de concentração (Tabela 5), usando solução padrão de Sb em solução aquosa de ácido nítrico 5% v/v. Os resultados estão mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Avaliação de efeito matriz em amostra de coração de camundongo BALB/c fortificado com Sb para doseamento por espectrometria de absorção atômica\* (n=3).

Nível de fortificação (µg/L)	Com matriz?	Valor médio encontrado (µg/L)	Valor médio encontrado (Abs)	Variância dos resíduos
0	Sim	0	0,07	-
	Não	0	0,03	
20	Sim	17,51±2,64	0,15	1,23E-04
	Não	19,17±0,53	0,14	
40	Sim	42,24±0,31	0,25	1,72E-06
	Não	42,13±1,47	0,28	
60	Sim	59,29±3,43	0,32	2,08E-04
	Não	59,45±1,93	0,39	
80	Sim	81,44±2,58	0,42	1,18E-04
	Não	81,41±1,54	0,52	



100	Sim	96,41±1,94	0,48	6,79E-05
	Não	100,23±1,23	0,64	

\*O número de amostras foi igual a três para cada nível de fortificação.

O teste F (Fischer-Snedecor) indicou que a média das variâncias dos resíduos tanto na curva com solvente quanto na curva matrizada são homocedásticas ( $F_{cal} < F_{tab}$ ) a 95% de confiança. O teste t para comparação das médias indicou que a matriz afeta o ensaio nos níveis de fortificação estudados ( $t_{cal} > t_{tab}$ ) para o nível de confiança de 95% (Tabela 12). Assim, as curvas de calibração foram feitas em meio contendo matriz para determinação analítica.

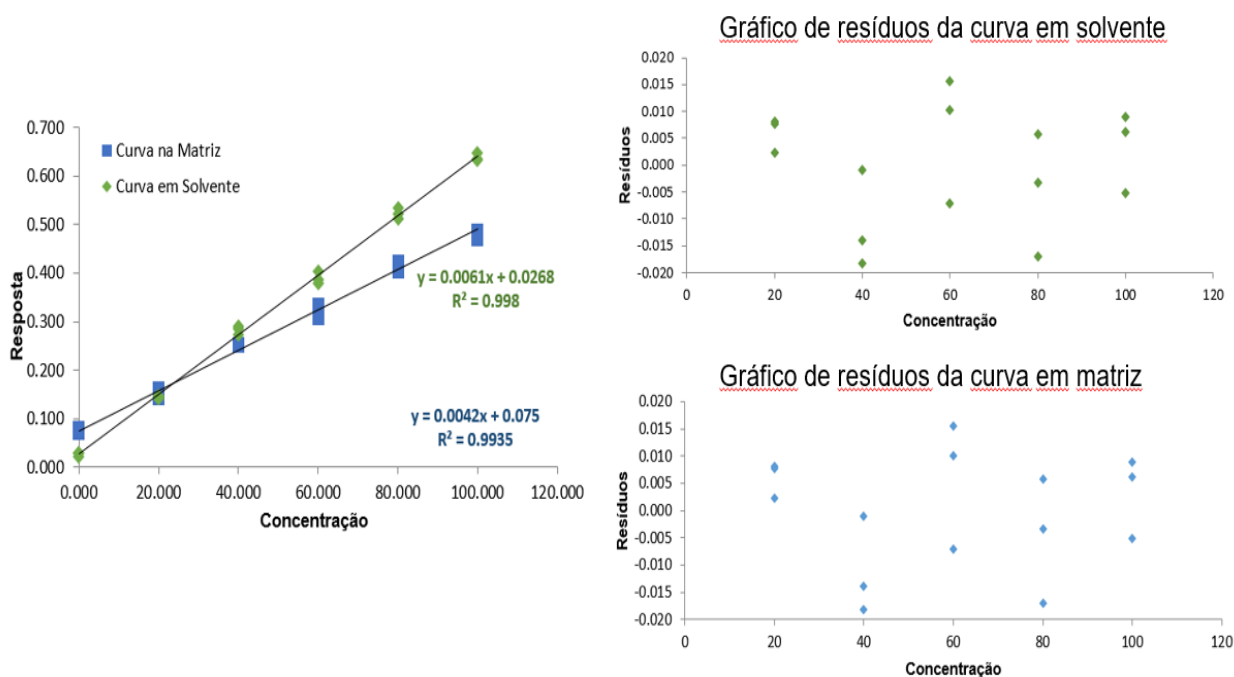
**Tabela 12** - Teste F de média das variâncias dos resíduos e teste t de comparação de médias.

Teste F		
Média variâncias dos resíduos (Curva em solvente)	Média das variâncias dos resíduos (Curva na matriz)	
8.37E-05	7.40E-05	
<b>F calculado</b>	1.131	
<b>F tabelado - unicaudal (95 %, n-2,n-2)</b>	2.084	
<b>Conclusão</b>	<b>Há homocedasticidade</b>	
Teste t (variâncias combinadas)		
<b>Número de pontos da curva</b>	<b>em solvente</b>	15
	<b>na matriz</b>	15
$s^2_p$	0.00008	
<b>Sxx1</b>	12000.00	
<b>Sxx2</b>	12000.00	
Quando houver homocedasticidade		
<b>t calculado</b>	17.389	
<b>t tabelado (95 %, n1+n2-4)</b>	2.056	
<b>Conclusão</b>	<b>Há efeito matriz</b>	

### 5.3.2 Linearidade

Para verificarmos a linearidade a mesma foi avaliada pela inspeção visual dos gráficos gerados pela regressão linear (tanto na curva em solvente quanto na matrizada), pela avaliação estatística dos resíduos (Tabela 12) e o coeficiente de correlação ( $r$ ). As curvas analíticas e os gráficos de resíduos estão apresentados na Figura 20.

**Figura 20** - Curvas de calibração analítica para doseamento de Sb por espectrometria de absorção atômica e gráficos de resíduos das curvas.



A equação da reta considerou o ponto 0. A distribuição dos resíduos sugere que há homogeneidade das variâncias, podemos confirmar pelo teste F ( $F_{cal} < F_{tab}$ ) da Tabela 12. A verificação da ausência de valores aberrantes foi feita com base nos resíduos padronizados Jackknife e a homocedasticidade pelo teste de Cochran. O valor do  $C_{tab}$  considerando 6 graus de liberdade e 95% de confiança é igual a 0.6160 e o  $C_{calc}$  para curva matrizada e para a curva em solvente foi igual a 0.4019 e 0.3329, respectivamente. Desta forma, pode-se constatar que  $C_{calc} < C_{tab}$ . O coeficiente de

correlação linear ( $r$ ) foi maior que 0,99, tanto para curva matrizada quanto para a curva com solvente.

### 5.3.3 LD e LQ

Os LD e LQ foram determinados como descrito no item 4.6.2.7 e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Limite de detecção e quantificação obtidos pelo método de espectrometria de absorção atômica otimizado.

<b>Média das concentrações (<math>\mu\text{g/L}</math>) n = 10</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>LQ (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Recuperação na confirmação do LQ (%)</b>
16.79	1,48	20,13	31,56	96

A confirmação do valor do LQ foi realizada com 10 replicatas, a partir da matriz branca fortificada com 30  $\mu\text{g/L}$ . Podemos observar que os resultados alcançaram os valores de recuperação estabelecidos pela AOAC 2016 entre 80% e 110% para concentrações acima de 10  $\mu\text{g/kg}$ . No estudo de Azevedo e colaboradores (2013), relatam o método utilizado para a determinação de Sb em tecidos de cães e os testes mostraram que o limite de quantificação para a pele dos animais teve como recuperação 94% o que corrobora com o valor encontrado em nosso trabalho de 96%.

### 5.3.4 Tendência/recuperação

Como não temos um material de referência certificado (MRC) para esse tipo de análise realizamos a adição do analito à amostra, mas ela não se encontra quimicamente ligada à matriz o que nos forneceria um resultado mais confiável. Para esse ensaio foram utilizados os dados obtidos no ensaio de repetibilidade, determinou-se a recuperação utilizando matriz branca fortificada nas concentrações de 200  $\mu\text{g/kg}$ ,

600 µg/kg e 1000 µg/kg. Para o nível baixo a média da recuperação foi de 105%, para o nível médio a média da recuperação foi de 94% e para o alto foi de 92%. Como podemos observar na Tabela 6 da AOAC 2016 os valores estão entre a faixa de 80-110%. Ao compararmos com os órgãos utilizados (sangue, fígado, baço, medula óssea e pele) no estudo de Azevedo e colaboradores (2013) eles relatam que na curva matrizada contendo sangue a recuperação ficou entre 99-105% e na curva matrizada contendo pele de cão a recuperação ficou entre 94-101%.

### 5.3.5 Precisão

Os resultados apresentados na Tabela 14 permitem constatar a precisão do método, avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, para a análise de réplicas de matrizes brancas fortificadas (n=6) em dias diferentes e os três níveis de concentração estudados (200 µg/kg, 600 µg/kg e 1000 µg/kg). Calculou-se, a partir dos resultados obtidos, a concentração de cada réplica, a concentração média para cada nível de adição, o DP e o DPR em condições de repetibilidade e de precisão intermediária. O  $DPR_{Horwitz}$  para cada nível de concentração foi calculado utilizando a equação de Horwitz. O DPR se manteve abaixo dos 15% como recomendado pela AOAC 2016.

**Tabela 14** - Repetibilidade e precisão intermediária obtidas utilizando matriz branca fortificada.

[µg/L]	$DPR_{Horwitz}$	1 dia (Repetibilidade)				2 dia (Precisão intermediária)			
		Média µg/L	DP	DPR	HORRAT	Média µg/L	DP	DPR	HORRAT
20	28,83	20,94	2,32	11,08	0,38	18,89	2,75	14,56	0,50
60	24,44	56,68	2,92	5,15	0,21	54,73	3,59	6,56	0,27
100	22,63	91,62	3,14	3,42	0,15	92,97	3,02	3,25	0,14

No estudo realizado por Azevedo e colaboradores (2013) o DPR para avaliação da precisão do método de espectrometria de absorção atômica para análise de Sb em pele de cão variou entre 3-20%, sendo o valor maior do que o encontrado em nosso estudo (3-15%). Já em condições de precisão intermediária, como mostrado na Tabela 14, as réplicas de análises apresentaram desvio-padrão relativo menor que o valor de  $DPR_{Horwitz}$  e os valores de HORRAT também foram inferiores a 1,0. Esses dados indicam que os resultados de ensaios independentes, repetidos da mesma amostra, apresentam alto grau de concordância e atendem aos critérios estabelecidos pelo INMETRO (DOQ-Cgcre-008).

## 5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este trabalho que os lipossomas apresentaram tamanho, IP e potencial zeta condizentes com a proposta de administração IV. A encapsulação do TE em lipossomas contribuiu de forma efetiva para diminuição da toxicidade sistêmica do TE devido a diminuição significativa da toxicidade hepática e cardíaca. Estes fatores sugerem que Lip-TE é uma formulação promissora para a entrega do fármaco no tratamento da LV.

Um método para a quantificação dos teores de Sb em matriz de coração de camundongo foi desenvolvido, otimizado e validado, empregando-se a digestão com ácido nítrico como estratégia de preparo de amostra e a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite para a quantificação.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. G. *et al.* Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1234–1240, 1 dez. 2009.
- AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 102, dez. 2013.
- ALMEIDA SILVA, L. *et al.* Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75(4): 739-743, 2006.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. 2012;7:e35671.
- AL-GHAZALY, J. *et al.* Pattern of haematological diseases diagnosed by bone marrow examination in Yemen: a developing country experience. **Clinical and Laboratory Haematology**, 28(6): 376-381, 2006.
- ANDRADE, T. M.; CARVALHO, E. M. & ROCHA, H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, 162(6): 1.354-1.359, 1990.
- AOAC International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.
- ASHKAN, M. M. & RAHIM, K. M. Visceral leishmaniasis in paediatrics: a study of 367 cases in southwest Iran. **Tropical Doctor**, 38(3): 186-188, 2008.
- AZEVEDO, E. G. **Lipossomas de circulação prolongada contendo antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral**. 2013. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- BADARÓ, R. *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, 154(6): 1.003-1.011, 1986.
- BANGHAM, A.D., HORNE, R.W., 1964. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 8, 660–668.
- BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife, v. 43, n. 2, p.167-179, jun. 2007.
- BELTRÁN-GRACIA, E., *et al.*, A.A., 2019. Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications. **Cancer Nanotechnol.**

- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, 24(4): 684-703, 1997.
- BLACK, C.D.V.; WATSON, G.J.; WARD, R.J. The use of pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. **Trans. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, i. 6, p. 550,1977.
- BOGGILD, A. K. *et al.* Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 79(6): 847-852, 2008.
- BOZZUTO, G., MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **Int. J. Nanomedicine**, 10:975-99, 2015.
- BRASIL, Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, Brasília, 2010, pp. 546.
- CASTRO, R.A. *et al.* Association of liposome-encapsulated trivalent antimonial with ascorbic acid: an effective and safe strategy in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**. 2014.
- CDC Centers For Disease Control And Prevention. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 22 abril 2021.
- COLLIN, S. *et al.* Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. **Clinical Infectious Diseases**, 38(5): 612-619, 2004.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F., ALVES, C. R. Leishmanioses do continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, 511 p. ISBN 978-85-7541-568-9.
- COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F. & ARAUJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil (1980-1986). *Revista de Saúde Pública*, 24: 361-372, 1990.
- COSTA, C. H. *et al.* Kala-azar is a slow-motion systemic inflammatory response syndrome: lessons from death. In: ANNALS OF THE 13<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 21-25 ago. 2007, Rio de Janeiro.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.111-126, 1 jan. 2006. American Society for Microbiology.
- DAWIDCZYK, C. M. *et al.* State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 133–144, ago. 2014.
- DE OLIVEIRA SILVA, J. *et al.* Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 352, p. 162–169, ago. 2018.
- EURACHEM: Guide to quality in analytical chemistry – An aid to accreditation (3<sup>rd</sup> edition, 2016).



FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry – Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals**. 2010. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/73161/download>>. Acesso em: 12/06/2021.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry – Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals**. 1996. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/72288/download>>. Acesso em: 12/06/2021.

FRÉZARD, F. *et al.* Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Rev Inorg Chem**, 33(1): 1-12, 2013.

FRÉZARD, F. *et al.* Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GOLENSER, J.; DOMB, A. New Formulations and Derivatives of Amphotericin B for Treatment of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 153–162, 1 fev. 2006.

GUPTA, V. *et al.* A study of clinico-haematological profiles of pancytopenia in children. **Tropical Doctor**, 38(4): 241-243, 2008.

HAYAT, F. *et al.* Antimony(III) dithiocarbamates: Crystal structures, supramolecular aggregations, DNA binding, antioxidant and antileishmanial activities. *Polyhedron* v.194, 2021.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, 354(9.185): 1.191-1.199, 1999.

HIDE, M. *et al.* A microculture technique for isolating live Leishmania parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, 102(3): 197-200, 2007.

HOLLER, F.J., SKOOG, D.A., CROUCH, S.R., *Princípios de Análise Instrumental*, 6ª ed., Porto Alegre, 2009.

ICH: *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, in Q2(R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 1995.

INGLUT, C.T., *et al.* Immunological and toxicological considerations for the design of liposomes. **Nanomaterials**, 10(2):190, 2020.

INMETRO: Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-Cgcre-008 ver.09, 2020.

KATO, K. C. *et al.* Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrob. Agents Chemother.** January 2014 vol. 58 no. 1 481-488.

KARN, P.R., CHO, W., HWANG, S.J. Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes. **Nanomedicine**, 8(9):1529-48, 2013.

- KAYE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.604-615, 11 jul. 2011.
- KHLEBTSOV, N.; DYKMAN, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 1647–1671, 2011.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, 4(1): 1-24, 1990.
- LEE, S.C., *et al.* 2005. The effect of cholesterol in the liposome bilayer on the stabilization of incorporated retinol. **J. Liposome Res.** 15, 157–166.
- LOMBARDO, D., *et al.* 2016. Soft interaction in liposome nanocarriers for therapeutic drug delivery. **Nanomaterials**, 6(7), 125, 2016.
- LOPES, S.C.A. *et al.* Liposomes as carriers of anticancer drugs. In: Leticia Rangel. (Org.). **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches**. 1ed.Rijeka, Croácia: InTech, v. 1, p. 85-124, 2013.
- LU, R.M., *et al.* 2013. Targeted Drug Delivery Systems Mediated by a Novel Peptide in Breast Cancer Therapy and Imaging. **PLoS ONE** 8.
- MACIEL, N. R. *et al.* Reduced cardiovascular alterations of tartar emetic administered in long-circulating liposomes in rats. **Toxicology Letters**, [s.l.], v. 199, n. 3, p.234-238, dez. 2010.
- MAHAJAN, V. & MARWAHA, R. K. Immune mediated hemolysis in visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Pediatrics**, 53(4): 284-286, 2007.
- MALTEZOU, H.C. Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2010, p.1-8, 2010. Hindawi Limited.
- MARANHÃO, R.C. *et al.* 2017. Clinical experience with drug delivery systems as tools to decrease the toxicity of anticancer chemotherapeutic agents. *Expert Opin. Drug Deliv.*
- MEURE, L.A., FOSTER, N.R., DEGHANI, F., 2008. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review. **AAPS PharmSciTech**. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9097-x>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Brasil, 1ª ed., 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV*. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Brasil, 1ª ed., 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose visceral**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leishmaniose-visceral>>. Acesso em: 27 abril 2021.

MINODIER, P. & PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, p. 150-158, 2007.

MOGHIMI, S.M. *et al.* Particulate Systems for Targeting of Macrophages: Basic and Therapeutic Concepts. **Journal Of Innate Immunity**, [s.l.], v. 4, n. 5-6, p.509-528, 2012. S. Karger AG.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – acute toxic class method**. 2001. Disponível em: <[http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced\\_gl423.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf)>. Acesso em: junho 2021.

OLLIARO, P. *et al.* What is a typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa and South Asia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 84(4):543-550, 2011.

OMS - World Health Organization. *Leishmaniasis disease burden*. Disponível em: [www.who.int/leishmaniasis/en](http://www.who.int/leishmaniasis/en). Acesso em: junho de 2021.

QUELLETTE, M; DRUMMEL, S. J; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, [s.l.], v. 7, n. 4-5, p.257-266, out. 2004. Elsevier BV

PASTORINO, A. C. *et al.* Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), 78(2): 120-127, 2002.

PATTNI, B.S., CHUPIN, V.V., TORCHILIN, V.P., 2015. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem. Rev.* 115, 10938–10966. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>.

PEARSON, R. D. *et al.* Circulating immune complexes and rheumatoid factors in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, 147(6): 1.102, 1983

PEREIRA, L. DE A. *et al.* Solubilização alcalina de peixes e otimização multivariada para determinação de chumbo e manganês usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1167–1172, 2011.

POLLACK, S. *et al.* Immunological studies of pancytopenia in visceral leishmaniasis. **Israel Journal of Medical Sciences**, 24(2): 70-74, 1988.

PRATA, A. R. Treatment of kala-azar with amphotericin B. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 57: 266-268, 1963.

QUEIROZ, M. J.; ALVES, J. G. & CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), 80(2): 141-146, 2004

RAHMAN, K. M. & ISLAM, N. Resurgence of visceral leishmaniasis in Bangladesh. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(1): 113-116, 1983.

- RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.550-555, ago. 2003. FapUNIFESP (SciELO).
- RIDLEY, R.G. The need for new approaches to tropical disease: drug discovery and development for improved control strategies. In: **Drug against parasitic diseases**, 3 (1): 13-21, 2003.
- ROBERTS, W.L.; MCMURRAY, W.J.; RAINEY, P.M. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 1998;42(5):1076-1082.
- RODRIGUES, K. A. DA F. *et al.* SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1670–1678, dez. 2018. SAHA, S. *et al.* Immune responses in kala-azar. **The Indian Journal of Medical Research**, 123(3): 245-266, 2006.
- SERENO, D. *et al.* “Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania Infantum* Used as an In Vitro Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of Action.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 42.12 (1998): 3097–3102.
- SILVA, M. R.; STEWART, J. M. & COSTA, C. H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72(6): 811-814, 2005.
- SKOOG, D.A. *et al.* Fundamentos de Química Analítica, São Paulo - SP, Brasil., 2007.
- STEVEDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, p. 1-10, 2017.
- SUNDAR, S. & RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 9(5): 951-958, 2002.
- TATENG, A.N. *et al.* Inventory and taxonomy of phlebotomine sand flies of the Mokolo leishmaniasis focus, northern Cameroon, with description of new *Sergentomyia* taxa (Diptera: Psychodidae). **Acta Tropica**, v.194, p.172-180, 2019.
- TEIXEIRA, M. J. *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, 22(1): 32-40, 2006.
- THAKUR, C. P. Epidemiological, clinical and therapeutic features of Bihar kala-azar (including post kala-azar dermal leishmaniasis). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 78(3): 391-398, 1984.
- U.S. Center for Disease Control and Prevention, Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis>>. Acesso em: junho de 2021.
- WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D. H. & BIRLEY, M. H. Deforestation: effects on vector-borne disease. **Parasitology**, 106, supl.: S55-S75, 1993.
- ZIJLSTRA, E. E. *et al.* Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 86(5): 505-507, 1992.