

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas

**UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FOSFATADAS COMO  
CARREADORES DE ANTIMÔNIO: POSSÍVEIS APLICAÇÕES  
PARA O TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES**

BETÂNIA MARA ALVARENGA

Belo Horizonte  
Janeiro - 2016

Betânia Mara Alvarenga

**Utilização de nanopartículas fosfatadas como carreadores de antimônio: Possíveis aplicações para o tratamento das leishmanioses**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular.

**Orientador: Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior**

Belo Horizonte  
Janeiro - 2016



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE**

**BETÂNIA MARA ALVARENGA**

150/2016  
entrada  
1º/2012  
2012664932

As quatorze horas do dia 29 de janeiro de 2016, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS FOSFATADAS COMO CARREADORES DE ANTIMÔNIO: POSSÍVEIS APLICAÇÕES PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. José Dias Corrêa Júnior**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. José Dias Corrêa Júnior	UFMG	APROVADA
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dr. Dawidson Assis Gomes	UFMG	Aprovado
Dr. José Carlos Nogueira	FASEH	Aprovado
Dr. Rubens Lima do Monte Neto	CPqRR	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de janeiro de 2016.**

Dr. José Dias Corrêa Júnior (Orientador) [Assinatura]  
Dra. Gleide Fernandes de Avelar [Assinatura]  
Dr. Dawidson Assis Gomes [Assinatura]  
Dr. José Carlos Nogueira [Assinatura]  
Dr. Rubens Lima do Monte Neto [Assinatura]

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Luciana de Oliveira Andrade  
Sub-Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular / UFMG  
[Assinatura]

*“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância,  
mas a ilusão do conhecimento.”*

Stephen Hawking



## Desiderata

Siga tranqüilamente entre a inquietude e a pressa, lembrando-se de que há sempre paz no silêncio.

Tanto quanto possível sem humilhar-se, mantenha-se em harmonia com todos que o cercam.

Fale a sua verdade, clara e mansamente.

Escute a verdade dos outros, pois eles também têm a sua própria história.

Evite as pessoas agitadas e agressivas: elas afligem o nosso espírito.

Não se compare aos demais, olhando as pessoas como superiores ou inferiores a você: isso o tornaria superficial e amargo.

Viva intensamente os seus ideais e o que você já conseguiu realizar.

Mantenha o interesse no seu trabalho, por mais humilde que seja ele é um verdadeiro tesouro na contínua mudança dos tempos.

Seja prudente em tudo o que fizer, porque o mundo está cheio de armadilhas.

Mas não fique cego para o bem que sempre existe.

Em toda parte, a vida está cheia de heroísmo.

Seja você mesmo.

Sobretudo, não simule afeição e não transforme o amor numa brincadeira, pois, no meio de tanta aridez, ele é perene como a relva.

Aceite, com carinho, o conselho dos mais velhos e seja compreensivo com os impulsos inovadores da juventude.

Cultive a força do espírito e você estará preparado para enfrentar as surpresas da sorte adversa.

Não se desespere com perigos imaginários: muitos temores têm sua origem no cansaço e na solidão.

Ao lado de uma sadia disciplina conserve, para consigo mesmo, uma imensa bondade.

Você é filho do universo, irmão das estrelas e árvores, você merece estar aqui e, mesmo se você não pode perceber, a terra e o universo vão cumprindo o seu destino.

Procure, pois, estar em paz com Deus, seja qual for o nome que você lhe der.

No meio do seu trabalho e nas aspirações, na fatigante jornada pela vida, conserve, no mais profundo do seu ser, a harmonia e a paz.

Acima de toda mesquinhez, falsidade e desengano, o mundo ainda é bonito.

Caminhe com cuidado, faça tudo para ser feliz e partilhe com os outros a sua felicidade”.

Desiderata, do latim, *Desideratu* - aquilo que se deseja.

Texto encontrado na velha igreja de Saint Paul, Baltimore, de Max Ehrmann (1872-1945).

*Dedico este trabalho à minha mãe, Graça, ao meu pai Sebastião e às minhas  
irmãs: Vanessa, Mary e Lu.*

## **Agradecimentos**

Independentemente de religião, agradeço ao Deus que tenho certeza que me ouviu e que me dá forças todos os dias.

Agradeço ao meu orientador, Professor José Dias Corrêa Júnior, que desde os tempos do mestrado me acolheu e me ajudou muito. Obrigada pela paciência, por estar presente sempre, pelas boas ideias e pela criatividade!

Aos meus colegas do lab: Juliana Gomes, Marcela, Heder, Juliana Soares, Mariana e, principalmente, à Priscila "Tótara", pelos seus conselhos, suas tiradas, seu humor, suas risadas e por me alugar para tirar fotos suas!

Aos colegas de outros labs que sempre me ajudaram: Diego, Karine, Nat, Kátia, e a tantos outros que provavelmente não conseguirei lembrar a tempo!

Aos meus colaboradores, Professora Maria Norma Melo e Professor Frédéric Jean Georges Frezard, por toda a ajuda, os conselhos, os empréstimos dos laboratórios e por serem pessoas especiais e exemplares!

Aos técnicos: Soraia, Nayara e Alexandre por toda a ajuda!

Ao Professor Antônio Carlos Santana pelos momentos agradáveis, pelas piadas, pelas imitações e por fazer o clima do lab sempre muito bom. Estamos sentindo sua falta!

Ao Professor Emérito (maravilhoso) José Carlos Nogueira que nos presenteia todos os dias com a sua presença, sua sabedoria, suas marchinhas de carnaval, seu livro fascinante (já quero o meu exemplar!), seus abraços apertados, seu carinho e principalmente, seu exemplo pelo amor ao que faz!

Ao Professor José Bento e Professora Cynthia Demicheli, do departamento de Química; Professor Nivaldo e Professor Cristiano do departamento de Física, por toda a ajuda, paciência e disponibilidade.

Ao Professor Anderson, ao (agora) Professor Marcos, Grazielle, Vanessa e todos do laboratório de Biologia Cardíaca por toda a ajuda de sempre!

A Professora Virgínila Lemos e ao Thiago Diniz por toda a ajuda com os experimentos envolvendo a produção de óxido nítrico.

A cada colaborador do departamento de Morfologia, técnicos, alunos, professores. É tanta gente que com certeza vou me esquecer de alguém, então melhor fazer um agradecimento geral: Obrigada!

A oportunidade de ter sido bolsista REUNI pela UFMG e de descobrir o amor por ensinar e aprender com os alunos todos os dias. Agradeço a cada um deles, seja nas Ciências Biológicas, Farmácia, Biomedicina ou Medicina Veterinária, por me mostrarem que nasci pra isso!

Aos meus amigos de BH, Paola e Gustavo, pelos momentos extra-UFMG tão valiosos para aliviar as tensões. Vocês me matam de rir, “Cabritos”! Agradeço também aos amigos que consegui como “agregada”.

Aos amigos de Itabira, o grupinho do Churrácool: Susan, Henrique, Gabriel, Vanessa, Diego, Thais, Rafaela, Ramon, Carlos, Eulinho, Paulo e Carol, pelas risadas, os churrascos e biritas de fim de ano e pelas alegrias diárias mesmo pela distância.

Aos outros amigos de Itabira, como a Elaine, que mesmo distante sei que podemos contar uma com a outra!

As minhas queridas amigas lá de Belém do Pará Carol e Marcela e suas famílias, por me abrigarem naquela época do mestrado e por serem amigas até hoje, mesmo à distância. A Marcela jura que vem na minha defesa! Espero

poder vê-las por aqui em BH, mas também voltar à terrinha que adoro tanto e que sinto falta!

A minha mãe, meu pai, minhas irmãs e o povo doido da minha família pelo incentivo, pela ajuda, pelos dinheiros emprestados, pelo carinho, pela força e por acreditar em mim, por entender a minha escolha e ter paciência junto comigo!

Agradeço ao lindo do Welton, meu namorado! Pela paciência, pelos conselhos, pelo carinho, amor e cuidado comigo! Agradeço também a toda família dele, por me ajudar muito aqui em BH. Amo vocês e sou muito grata por tudo!

A todos que torceram por mim, que rezaram por mim quando me viram chorar de alegria ou de tristeza. O que importa é a força que cada um me deu e que eu mesma aprendi a ter a cada dia! Eu cresci muito!

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios:

- Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e Reprodução Animal, vinculado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, vinculado ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Biologia de Leishmania, vinculado ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- Laboratório de Cristalografia, vinculado ao Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas (ICEX), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);
- Laboratório de Química Analítica, vinculado ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas (ICEX), da Universidade Federal de Minas Gerais.

Conta com o auxílio das seguintes agências de fomento:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Resumo

Antimoniais pentavalentes (SbV) como o Glucantime são utilizados para o tratamento das leishmanioses, mas causam efeitos colaterais, tais como cardiotoxicidade e hepatotoxicidade. Neste estudo, caracterizamos as propriedades físico-químicas de quatro compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT) como carreadores de Sb com alvo específico em macrófagos. Os CNFs foram sintetizados em meio líquido e esterilizados a 25 kGy antes do uso. As caracterizações físico-químicas através do potencial zeta, condutividade, diâmetro, conteúdo de Sb e cristalinidade foram determinadas para cada CNF. A viabilidade celular dos macrófagos e a toxicidade dos CNFs, independente da internalização de Sb, foram avaliadas para verificar a segurança dos CNFs no tratamento contra as leishmanioses. A taxa de infecção dos macrófagos infectados com *L. infantum* foi realizada *in vitro* e comparada com o Glucantime usado como droga de referência. Os CNFs apresentaram potencial zeta negativo (-14,7 a -19,5 mV), a média dos diâmetros foi cerca de 180 nm, com baixa dissolução em água Mili-Q (abaixo de 0,02 mS cm<sup>-1</sup> para CNF0, CNF3 e CNF5). Os CNFs apresentaram predominantemente padrões amorfos exceto CNF5 e CNFT que também apresentaram fases cristalinas. CNFT apresentou a maior incorporação de Sb, 46,69 µg mL<sup>-1</sup>. A viabilidade celular não foi afetada em nenhuma das concentrações testadas. Técnicas associadas de microscopia eletrônica de varredura, microanálise de raios-X e EAAFG revelaram a internalização dos CNFs e a retenção celular de Sb. A infecção por amastigotas foi reduzida por todos CNFs incluindo CNF0 (sem Sb), onde CNF3 foi o mais efetivo. O grupo de macrófagos infectados desafiado com CNF3 apresentou quase 2 vezes mais óxido nítrico do que os macrófagos somente infectados. Estes dados indicam o potencial uso dos CNFs como nanocarreadores de Sb para macrófagos, com dosagem de Sb reduzida, sem reduzir a atividade leishmanicida.

Palavras-chave: nanopartículas biodegradáveis, *Leishmania infantum*, nanocarreador de Sb.

## Abstract

Pentavalent antimonials such as a Glucantime are used for treating leishmaniasis, but produce side effects, including cardiotoxicity and hepatotoxicity. In this work, we characterized the physicochemical properties of 4 phosphate-based composites (CNF0, CNF3, CNF5 and CNFT) as Sb (V) carriers for targeting macrophages. CNFs were synthesized in a liquid media and sterilized at 25 kGy before use. The physicochemical characterizations are determinate with zeta potential, conductivity, diameter, Sb content and crystallinity for each CNF. Macrophage viability and CNFs toxicity, independent of the Sb uptake, were evaluated to assess CNFs safety in visceral leishmaniasis treatment. The rate of macrophages infection caused by *L. infantum* was assayed *in vitro* by using Glucantime as a reference drug. CNFs featured negative zeta potentials (-14.7 to -19.5 mV), mean diameter was around 180 nm and a low dissolution constant in Milli-Q water (less than  $0.02 \text{ mS cm}^{-1}$  for CNF0, CNF3 and CNF5). CNF5 and CNFT showed crystalline characteristics and the peaks present in CNF5 resembling Mopungita, but other CNFs exhibited predominantly amorphous structures. CNFT had the highest concentration of Sb,  $46.69 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Cell viability was not affected at any CNFs concentrations tested. The associated scanning electron microscopy techniques, x-ray microanalysis and GFASS revealed the internalization of CNFs and Sb cell retention. Amastigote infection was reduced by all CNFs more efficiently than glucantime, including CNF0 (without Sb), but CNF3 was more effective. The group of infected macrophages challenged with CNF3 nitric oxide increase 2 times more than the infected macrophages only. These data indicate the potential of NPCs as Sb nanocarriers for specifically targeting macrophages and lowering Sb dosage without reducing leishmanicidal activity.

Keywords: biodegradable nanoparticles, *Leishmania infantum*, Sb nanocarrier.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparação estrutural entre uma substância cristalina (A) e uma substância amorfa (B).....	5
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. ....	11
<b>Figura 3.</b> Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> sp.....	13
<b>Figura 4.</b> Distribuição geográfica da incidência da leishmaniose visceral (A) e leishmaniose tegumentar (B) no mundo.....	15
<b>Figura 5.</b> Modelo proposto para o mecanismo de ação do antimônio (Sb) contra <i>Leishmania</i> . ....	21
<b>Figura 6.</b> Micrografias eletrônicas por elétrons secundários acompanhadas de gráfico da distribuição de diâmetro do CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT. ....	33
<b>Figura 7.</b> Difratoograma dos CNFs, Mopungita e $\text{KSb(OH)}_6$ . ....	34
<b>Figura 8.</b> Difratoograma dos CNFT e $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$ . ....	35
<b>Figura 9.</b> Viabilidade celular dos CNFs.. ....	36
<b>Figura 10.</b> Micrografia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados e elétrons secundários mostrando macrófagos murinos com internalização de CNFs e os respectivos espectros de raio-X da região elétron-densa.....	37
<b>Figura 11.</b> Percentual de redução da infecção em 24, 48 e 72 horas após exposição ao Glucantime, CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT.....	40
<b>Figura 12.</b> Gráfico da taxa de infecção em macrófagos em log da concentração de CNF0 e Glucantime mostrando efeito em amastigotas de <i>L. infantum</i> , após 24 horas de interação.....	42
<b>Figura 13.</b> Gráfico da taxa de infecção em macrófagos em log da concentração de CNF3, CNF5 e CNFT mostrando efeito em amastigotas de <i>L. infantum</i> , após 24, 48 e 72 horas de exposição.....	43
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografia de macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> .....	44
<b>Figura 15.</b> Imagens de microscopia de fluorescência com a intensidade de fluorescência de promastigotas de <i>L. infantum</i> , macrófagos infectados ou não após interação com os CNF3 e CNFT.....	45
<b>Figura 16.</b> Gráfico da intensidade média de fluorescência em unidades arbitrárias nos diferentes tratamentos após 24 horas de interação. ....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação dos diferentes sistemas de nanopartículas. ....	3
<b>Tabela 2.</b> Características desejáveis a uma nanopartícula. ....	7
<b>Tabela 3.</b> Custo do tratamento da leishmaniose. ....	19
<b>Tabela 4.</b> Caracterização dos CNFs em relação ao potencial zeta e condutividade. ....	32
<b>Tabela 5.</b> Quantificação de Sb nas nanopartículas. ....	35
<b>Tabela 6.</b> Quantificação de Sb em macrófagos expostos aos CNF no período de 24 e 48 horas .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	adenosina monofosfato
ATP	adenosina trifosfato
Au	ouro
Ca	cálcio
Cd	cádmio
CNF	Compósitos Nanoestruturados Fosfatados
Co	cobalto
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
Cu	cobre
DMSO	dimetilsulfóxido
Fe	ferro
GSH	glutathiona
Hg	mercúrio
HNO <sub>3</sub>	ácido nítrico
INF- $\gamma$	interferon gama
K	potássio
KGy	Kilogray
KSb(OH) <sub>6</sub>	hexahidroxiantimoniato de potássio
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
Log	logaritmo
mBar	milibar

Mg	magnésio
mg	miligrama
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	cloreto de magnésio hexahidratado
mL	mililitro
Mn	manganês
mS cm <sup>-1</sup>	miliSiemens por centímetro
mV	milivolt
Na	sódio
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 10H <sub>2</sub> O	pirofosfato de sódio decahidratado
NaSb(OH) <sub>6</sub>	mopungita
ng	nanograma
Ni	níquel
nm	nanômetros
°C	graus Celsius
pDNA	plasmídeo
PEG	polietilenoglicol
PMMA	polimetilmetacrilato
Sb	antimônio
Sb (III)	antimônio trivalente
Sb (V)	antimônio pentavalente
Sc	escândio
Ti	titânio
TryR	trianotona redutase

(T[SH] <sub>2</sub> )	trianotona
μg	micrograma
μL	microlitro
V	vanádio
Zn	zinco

## Sumário

<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1. Histórico das nanopartículas.....	1
2. Nanopartículas recentes.....	2
3. Minerais amorfos fosfatados como nanocarreadores.....	5
4. Aplicações de nanopartículas fosfatadas.....	8
5. Aspectos gerais das leishmanioses.....	9
5.1. Ciclo biológico .....	10
5.2. Epidemiologia das Leishmanioses .....	14
5.3. Patologia.....	16
5.4. Tratamento .....	17
5.5. Mecanismos de ação dos fármacos contendo Sb .....	19
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
1. Objetivo geral .....	24
2. Objetivos específicos.....	24
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
1. Síntese de compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF).....	25
2. Caracterização dos compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF).....	25
2.1. Potencial Zeta .....	25
2.2. Distribuição de diâmetro e morfologia.....	26
2.3. Difração de raios-X (DRX).....	26
2.4. Dosagem de Sb nas nanopartículas .....	26
3. Ensaios <i>in vitro</i> .....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Obtenção de macrófagos .....	27
3.3. Ensaio de citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos (MTT) .....	27
3.4. Ensaio de internalização dos CNFs utilizando microscopia eletrônica de varredura e microscopia analítica.....	28
3.5. Determinação de Sb intracelular em macrófagos .....	29
3.6. Atividade anti-amastigota de CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT .....	29
3.7. Produção de óxido nítrico em macrófagos infectados ou não tratados com CNF3 e CNFT.....	30
4. Análise Estatística.....	31
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
1. Caracterização físico-química dos CNF.....	32
1.1. Potencia zeta e condutividade .....	32
1.2. Distribuição de diâmetro e morfologia dos CNFs por MEV .....	32
1.3. Padrões de difração de raios-X dos CNFs.....	34
1.4. Concentração de Sb nas nanopartículas.....	35
2. Ensaios <i>in vitro</i> .....	36
2.1. CNFs não apresentam toxicidade para macrófagos murinos .....	36
2.2. Ensaio de internalização das nanopartículas.....	37
2.3. Concentração de Sb intracelular em macrófagos murinos .....	38
2.4. Efeito de Glucantime, CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT no modelo de infecção por <i>Leishmania infantum</i> .....	39
2.4.1 Percentual total de infecção .....	39
2.4.2 Redução do número de amastigotas por macrófago quando expostos aos CNFs .....	41
2.5. Determinação de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados ou não com <i>L. infantum</i> e expostos ao CNF3 e CNFT. ....	44
<b>VI. DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>VII. CONCLUSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	<b>56</b>
A) Depósito de patente: BR 10 2012032493 8 .....	56
B) Depósito de patente: BR 10 2013032731 0 .....	57
C) Depósito de patente: BR 13 2015031111 6 .....	58
D) Protocolo CEUA 132/2012 .....	59
E) Publicação no Journal of Materials Chemistry B .....	60
<b>IX. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Histórico das nanopartículas

Os primeiros registros envolvendo a utilização de nanopartículas datam de meados do século XIX e início do século XX e estavam relacionados inicialmente a ciência dos coloides (dispersões de partículas detentoras de tamanho insuficiente para se depositar pela ação da gravidade) e a engenharia molecular (Jones, 2011).

O termo nanopartícula é utilizado para partículas com tamanho menor que 1  $\mu\text{m}$ , e, no caso das micropartículas, com tamanho até 100  $\mu\text{m}$  (Birnbau e Brannon-Peppas, 2003; Durán e Azevedo, 2003). Lubben e colaboradores, (2001) salientam que as nano e micropartículas não podem exceder 10  $\mu\text{m}$  de tamanho quando testadas *in vivo* em função da sua relativa hidrofobicidade e perda das características coloidais e dinâmicas de suas matrizes (Lubben et al, 2001).

Muitas aplicações e diferentes nanomateriais foram utilizados pela humanidade sem, entretanto, terem sido caracterizados como materiais inovadores. Nowack e colaboradores, (2011) classicamente exemplificam este fato, relatando o trabalho de 1889 no qual já se sintetizava nanopartículas de diâmetro entre 7 e 9 nm, mas a primeira patente de “nanoprata” foi conferida apenas em 1954, ainda que a diversidade de aplicações de nanopartículas de prata (utilizadas em pigmentos, fotografia, compósitos condutores, tratamento de feridas, catalisadores e germicidas) já tivesse utilidade há mais de 100 anos (Nowack et al, 2011).

Em 1956, o físico Arthur Von Hippel descreveu a necessidade de direcionar a síntese de determinado nanomaterial de acordo com as aplicações desejadas, criando assim materiais com características específicas pré-estabelecidas. Este pesquisador contribuiu para o que podemos considerar como o primeiro conceito de nanotecnologia (Arthur Von Hippel apud Fernandes, 2011). A palestra de Richard Feynman, que em 1958 discutiu a diversidade da utilização dos nanomateriais é considerada também como um dos marcos iniciais da nanotecnologia (Feynman, 1960).

Até o início da década de 1980 não haviam muitos estudos divulgados neste assunto. A popularização do tema foi amplificada por Eric Drexler, após a publicação do seu livro: *Engines of creation: the coming era of nanotechnology*, de 1986, onde ele sugere a construção de máquinas nanométricas, tais como, motores, braços de robôs, computadores inteiros, muito menores do que uma célula (Drexler apud Fernandes, 2011).

Geralmente as nanopartículas são obtidas por meio de sínteses químicas, porém algumas foram obtidas ocasionalmente, como no caso dos fulerenos, moléculas formadas por átomos de carbono, identificadas pela primeira vez em 1985 (Santos et al, 2010). Posteriormente, em 1991, foram sintetizados os primeiros nanotubos de carbono (Iijima, 1991). Além dos nanotubos de carbono, as nanopartículas de prata sintetizadas por Durán e colaboradores, (2005), também merecem destaque por apresentar forte ação bactericida, com ampla aplicação na área de saúde.

Portando, a nanotecnologia tem ampliado a diversidade de produtos em sua trajetória ao longo do tempo e estes produtos têm sido utilizados em larga escala nos dias de hoje.

## **2. Nanopartículas recentes**

Atualmente vários estudos têm evidenciado a utilização de nanopartículas também como carreadores de fármacos, focados principalmente na síntese e elaboração de novas nanopartículas utilizando diferentes materiais, visando suas múltiplas aplicações (Cheng e Kuhn, 2007; Motskin et al, 2009; Epple et al, 2010; Uskokovic e Uskokovic, 2011; Dorozhkin, 2012; Mu et al, 2013). Estas nanopartículas frequentemente apresentam vantagens e desvantagens, como exemplificadas na tabela 1.



**Tabela 1.** Comparação dos diferentes sistemas de nanopartículas. Adaptado de Yih e Al-Fandi, 2006; Adair et al, 2010 e Tabakovic et al, 2012.

<b>Sistema Nanocarreado</b>	<b>Tamanho (nm)</b>	<b>Agentes carreados</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Polímeros Biodegradáveis	10-100	Proteínas, plasmídeos, DNA, pequenas moléculas	Entrega localizada por semanas	Exocitose de nanopartículas não dissolvidas
Cerâmicas	<100	Proteínas, agentes quimioterápicos, DNA, compostos orgânicos com alto peso molecular	Facilmente preparadas, dispersíveis em água, estáveis em ambientes biológicos,	Toxicidade de materiais, exocitose de nanopartículas não dissolvidas
Metais	<50	Proteínas, DNA, agentes quimioterápicos	Pequenas partículas com grande área de superfície	Toxicidade de materiais, exocitose de nanopartículas não dissolvidas, síntese demorada
Micelas poliméricas	<100	Proteínas, DNA, agentes quimioterápicos	Adequadas para drogas insolúveis	Toxicidade de materiais, funcionalidade fixada após síntese
Dendrímeros	<10	Agentes anti-virais e anti-bacterianos, DNA, compostos orgânicos com alto peso molecular	Adequados para drogas hidrofóbicas e hidrofílicas	Síntese demorada, pode usar materiais tóxicos
Lipossomos	50-100	Agentes quimioterápicos, DNA, proteínas	Reduz toxicidade sistêmica, aumenta tempo de circulação	Funcionalidade fixa após a síntese, falta de estabilidade coloidal
PRINT	20-2000	Agentes de imagem, quimioterápicos, DNA	Controle preciso do tamanho, forma e funcionalização de superfície	Toxicidade dos materiais

---

Fosfosilicato de Cálcio	20-60	RNA, agentes de imagem, quimioterápicos	Preparação simples, estabilidade coloidal em ambientes fisiológicos, adequados para drogas hidrofílicas e hidrofóbicas, pH dependentes	Materias encapsulados se limitam a solubilidade em água ou solventes orgânicos
-------------------------	-------	---	--	--

---

PRINT, particle replication in nonwetting templates.

Os sistemas de liberação controlada, descritos como “drug delivery systems” frequentemente apresentam a utilização de nanopartículas que oferecem inúmeras vantagens quando comparados aos sistemas de dosagem convencional. Há uma maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco; diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação; natureza e composição dos veículos variada; administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (diminuição do número de doses); direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas (Kumar, 2000; Yih e Al-Fandi, 2006; Gao et al, 2010; Tiwari et al, 2012).

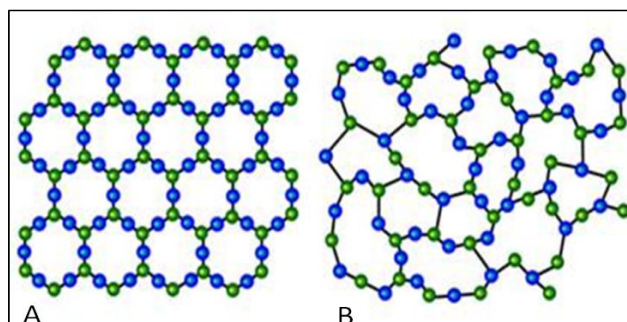
Para a área de saúde, muitas das características desejáveis das nanopartículas são enumeradas para a elaboração de novos fármacos e seus mecanismos de administração. Partículas biodegradáveis, anfifílicas, atóxicas, pH dependentes, com baixa reatividade imunológica, estáveis sob condições fisiológicas, com potencial de funcionalização e eventualmente rastreáveis são características importantes que têm sido relatadas recentemente para grânulos ricos em fosfato. (Yih e Al-Fandi, 2006; Jiang, et al, 2008; Adair, et al 2010; Tiwari et al, 2012) Ainda assim não há uma matriz nanométrica que possua todas essas características.

Em relação às formulações injetáveis por via intravenosa, um grande número de estudos é dedicado atualmente à utilização de lipossomas, polímeros, nanopartículas lipídicas sólidas e materiais cerâmicos como partículas de hidroxiapatita. Ainda que lipossomas possam amplificar a eficácia

em até 300 a 700 vezes (Frezard et al, 2005) deve-se ter atenção quanto à estabilidade do fármaco. Além disso, a esterilização de lipossomos constitui grande problema devido às degradações ocorridas, características de substâncias orgânicas, onde mesmo a filtração não elimina os pirogênios. Sistemas com lipídios sólidos geralmente são limitados à natureza hidrofílica das drogas a serem utilizadas. Poucos estudos têm sido realizados com minerais amorfos nanométricos, onde materiais cristalinos de mesma ordem geralmente falham no processo de eliminação pelo organismo além de frequentemente apresentarem toxicidade (Sharma e Sharma, 1997; García et al, 2005; Wan et al, 2008).

### 3. Minerais amorfos fosfatados como nanocarreadores

Substâncias amorfas são sólidos que apresentam uma estrutura atômica altamente desordenada e irregular, ao contrário de uma rede cristalina (Fig.1). Essa irregularidade de ordem translacional e orientacional (em dimensões superiores a 10 ângströms) permite a absorção, adsorção ou incorporação de diversas substâncias em sua matriz (Posner e Betts 1975; Troop et al, 1983; Lowenstam & Weiner, 1985; Stricker & Weiner, 1985; Taylor & Simkiss, 1989).



**Figura 1.** Comparação estrutural entre uma substância cristalina (A) e uma substância amorfa (B). Substâncias cristalinas possuem seus átomos ou moléculas dispostos de forma organizada e periódica, diferindo de substâncias amorfas que apresentam uma estrutura atômica desordenada e irregular.

Alguns tipos de minerais amorfos ricos em fosfatos podem se dissolver em seus constituintes iônicos (Oyane et al, 2003; Dorozhkin, 2012; Tas, 2013). Foram descritos inicialmente como partículas eletron densas em diversos

grupos filéticos e compõem 25 % dos minerais biogênicos (produzidos pelas próprias células). Diversos trabalhos mostraram (devido à sua principal propriedade de facilmente remobilizar seus componentes sob condições biológicas), a participação destes minerais em processos de manutenção da homeostase celular. As funções relatadas incluem armazenagem intra e extracelular de fosfatos, cátions diversos, detoxificação de compostos nitrogenados e metais pesados, imobilização e retenção de diversas substâncias orgânicas (citocromo C, superóxido dismutase, adenilatos, Glicose-6-fosfato) com a manutenção de suas atividades específicas. Além disso, apresentam-se quimicamente estabilizados com cátions que se interagem principalmente através de ligações químicas eletrostáticas (como observadas para Na, Mg, K e Ca) ou por ligações covalentes (descritas para Cu, Zn, Ag, Cd, Au, Hg). Alguns outros elementos são considerados ambivalentes por possuírem a propriedade de ligação transiente entre as descritas anteriormente (Sc, Ti, V, Mn, Fe, Co e Ni) (Simkiss, 1981; Simkiss e Taylor, 1989; Lowenstam & Weiner, 1989; Not & Nicolaidou, 1990).

Recentes revisões bibliográficas mostraram que é possível sintetizar nanopartículas ricas em fosfatos com algumas características desejáveis à sua aplicação, como as mostradas na Tabela 2. Portanto, esses materiais são potencialmente úteis como veículos de distribuição de fármacos *in vivo* e *in vitro*. (Chander & Fuerstenau, 1982; Roy et al, 2002; Yih e Al-Fandi, 2006; Gao et al, 2010; Giger, 2011; Tabakovic et al, 2012; Sokolova, 2013).

**Tabela 2.** Características desejáveis a uma nanopartícula. Adaptado de Adair et al, 2010.

<b>Característica desejada</b>	<b>Comentários</b>
Materiais atóxicos e sem produto de degradação	A escolha do material inicial deve ser com base em materiais não tóxicos, especialmente porque são direcionados à saúde humana/animal.
Tamanho pequeno (10-200nm)	Não há um tamanho específico que parece mais eficaz, com base em estudos <i>in vivo</i> . De 10 a 200nm são os diâmetros de partículas que provaram ser mais eficazes para uma ampla variedade de sistemas de entrega.
Encapsulação do agente ativo	Para ser eficaz, o agente ativo deve ser encapsulado dentro do veículo da nanopartícula. A adsorção, muitas vezes, é eficaz <i>in vitro</i> , mas não é eficaz para estudos <i>in vivo</i> por causa do sistema retículo-endotelial (RES).
Estabilidade coloidal em condições fisiológicas	O veículo das nanopartículas e de funcionalização de superfície deve ser resistente à aglomeração, para os valores de pH, força iônica da solução, interações macromoleculares e temperatura, verificados no ambiente fisiológico.
Mecanismo de eliminação	O veículo das nanopartículas deve ter um mecanismo de depuração pronto para evitar os efeitos cumulativos e/ou sistêmicos no organismo.
Tempo longo de eliminação	A resistência à aglomeração e outros efeitos que removem o fármaco encapsulado do paciente devem ser evitados para promover longos períodos dentro do sistema circulatório.
Liberação biológica ou extrinsecamente controlada de agentes terapêuticos	Deve haver um mecanismo de gatilho, tais como o pH ácido dentro do tumor ou durante a maturação do endossoma, concebido para a plataforma de nanopartículas para assegurar a liberação do fármaco encapsulado para o tecido alvo.
Podem ser direcionados para células ou tecidos de escolha	As nanopartículas precisam ter superfície bioconjugada (funcionalizadas) a moléculas alvo para um câncer específico e promover a maior captação no interior das lesões cancerosas, eliminando efeitos colaterais para os tecidos saudáveis.

#### 4. Aplicações de nanopartículas fosfatadas

As nanopartículas fosfatadas têm sido efetivamente utilizadas em várias abordagens. Zhang e colaboradores, (2009), estudaram nanopartículas de fosfato de cálcio com conjugados do antígeno promotor do gene carcinoembrionário (CEA) fundido com um gene pró-apoptótico citosina deaminase de *Escherichia coli* (CD) para direcionamento *in vivo* de tratamento de câncer de cólon. Já Li et al, (2010) utilizaram uma formulação de nanopartículas à base de fosfato de cálcio revestidas com lipídio e PEG contendo anisamida ligada ao receptor para demonstrar a distribuição *in vivo* de pequenos RNAs interferentes (siRNA) em xenoenxerto de tumores de pulmão. Ainda trabalhando com ácidos nucleicos, Bisht e colaboradores (2005), sintetizaram nanopartículas de fosfato de cálcio carreando DNA e aperfeiçoaram um método de preparação que envolvia a precipitação dos fosfatos de cálcio na presença de plasmídeos de DNA (pDNA) em um núcleo aquoso com gotículas de microemulsão. Os pDNA foram bem protegidos contra degradação e facilmente dissolvidos em meio ácido, liberando o DNA. Estudos de transfecção *in vitro* indicaram que a eficiência na transfecção destes transportadores era tão elevada quanto à do Polyfect, um reagente de transfecção disponível comercialmente. Os autores concluíram que as nanopartículas de fosfato de cálcio possuem um papel bem definido no carregamento de DNA, provavelmente por escape endossomal, podendo então ser utilizadas como vetor não viral eficaz em terapia gênica. Tonelli e colaboradores, (2015), utilizaram nanodiamantes, nanotubos de carbono de paredes múltiplas, nanorods de ouro e uma nanopartícula fosfatada contendo cromo (NPC) em células de difícil transfecção. A NPC se destacou pela eficiência no carregamento associada à baixa citotoxicidade quando comparada às demais nanopartículas (Tonelli et al, 2015).

Barth e colaboradores, (2010), investigaram bioconjugados de nanopartículas à base de fosfato de cálcio como marcador de imagem *in vivo* e direcionamento para câncer de mama e pâncreas. As nanopartículas foram marcadas com fluoresceína e corantes com holotransferina humana e anticorpo anti CD71 via avidina-biotina e utilizaram estratégias de acoplamento para direcionamento de xenoenxerto de tumor de mama através da utilização de PEG maleimida.

Fosfatos de cálcio nanométricos estudados como sistemas de distribuição de fármacos são altamente compatíveis com drogas e hormônios, tais como insulina, antibióticos e, como descrito, são passíveis de serem funcionalizados. Paul e Sharma, em 2012, estudaram nanopartículas de fosfato de cálcio com zinco, como carreadores de insulina no intestino. As nanopartículas carregadas com insulina foram revestidas por alginato sensível ao pH, que libera a insulina no meio intestinal, mantendo a sua conformação estável. Os autores concluíram que o nível de glicose no sangue dos ratos diabéticos ficou normal após a administração da formulação, sendo mantido por mais de 12 horas e, com o efeito benéfico do zinco já demonstrado em pacientes diabéticos, este sistema demonstrou ser um excelente veículo para carregamento de insulina no intestino.

Radin e colaboradores, (1997), sintetizaram cerâmicas à base de fosfato de cálcio como carreadores de Vancomicina, para a prevenção de infecções decorrentes de artroplastia total do joelho. A Vancomicina foi carregada pelas cerâmicas à base de fosfato de cálcio em um substrato de ligas de titânio. O carregamento foi feito através da imersão de discos de cerâmica com Vancomicina em solução fisiológica. A cinética de liberação da Vancomicina e a eficácia de inibição de *Staphylococcus aureus* foram determinadas *in vitro* e comparadas com a liberação a partir do antibiótico normalmente utilizado, carregado com PMMA-polimetilmetacrilato. Este estudo indicou que os revestimentos osteocondutores de fosfato de cálcio apresentaram grande potencial para o transporte de drogas para a prevenção de infecções consequentes da artroplastia total de joelho.

Apesar de sua segurança e grande número de características biocompatíveis desejáveis, nenhum relato sobre a síntese de compostos nanométricos sólidos ricos em fosfatos para o tratamento das leishmanioses foi relatado, até o momento, na literatura.

## **5. Aspectos gerais das leishmanioses**

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), que fazem parte da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae. O

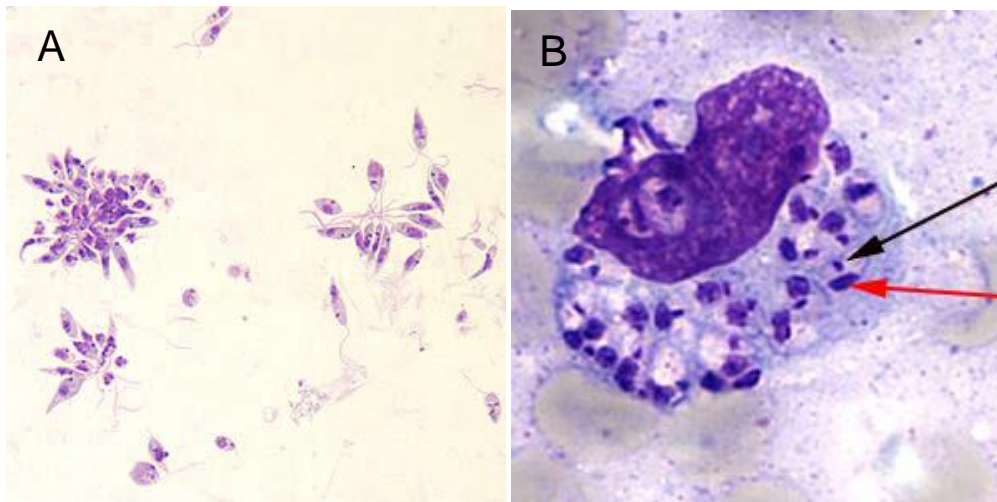
gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* e essa divisão é baseada no desenvolvimento dos parasitos no tubo digestório do inseto vetor. Existem mais de 20 espécies e subespécies que infectam o homem, além das espécies de reservatórios da doença (WHO, 2014).

No subgênero *Leishmania*, as espécies do complexo *donovani*, como *L.(L.) donovani*, *L.(L.) infantum* e *L.(L.) infantum chagasi* são responsáveis pela leishmaniose visceral no Velho Mundo (continentes: europeu, africano, asiático e ilhas adjacentes) e Novo mundo (inclusão das Américas) e as espécies do complexo *L. mexicana* incluem as que causam leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea no Novo Mundo, tais como *L.(L.) amazonensis* e *L.(L.) mexicana* e do Velho Mundo, *L.(L.) major*, *L.(L.) tropica* e *L.(L.) aethiopica*. No subgênero *Viannia* são classificadas as espécies do complexo *L. brasiliensis*, agentes etiológicos da leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea no Novo Mundo. No Brasil, as leishmanioses tegumentares são causadas principalmente por *L.(V.) brasiliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*, e a leishmaniose visceral ou calazar (Kala-azar) é causada por uma única espécie, *L.(L.) infantum chagasi*. (Grimaldi Jr et al, 1989; Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Shaw, 2006; Marcili et al, 2014).

### 5.1. Ciclo biológico

O gênero *Leishmania* possui duas principais formas evolutivas: promastigotas e amastigotas. As promastigotas são formas flageladas, extracelulares, encontradas no tubo digestório do inseto vetor e, as amastigotas, são aflageladas, intracelulares obrigatórias, sendo observadas nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figura 2).





**Figura 2.** Fotomicrografia das formas evolutivas de *Leishmania* sp.: (A) promastigota, flagelada e extracelular e (B) amastigota, aflagelada e intracelular. (Fonte CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*).

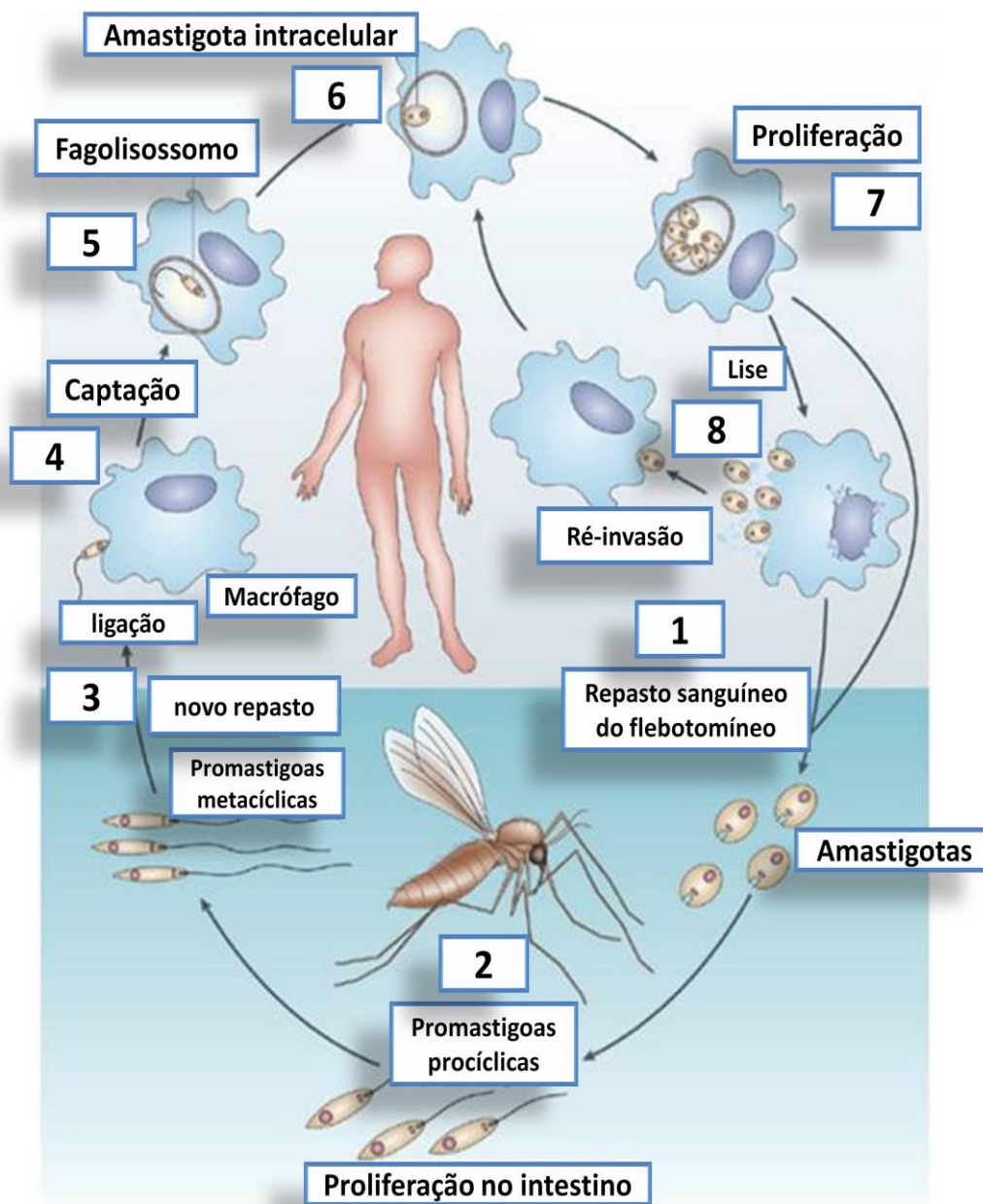
O ciclo biológico da *Leishmania* sp se inicia quando a fêmea do inseto vetor, um flebotomíneo, realiza o repasto sanguíneo em um mamífero infectado com as formas amastigotas da leishmania. No intestino médio de *Lutzomyia longipalpis* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo), as amastigotas permanecem junto com o sangue ingerido e após 12 a 18 horas, se transformam em formas flageladas pequenas, ovóides, de pouco movimento, chamadas promastigotas procíclicas (Sacks e Kamhawi, 2001; Chappuis et al, 2007).

Essas formas se multiplicam por divisão binária e são capazes de se aderir ao epitélio intestinal do flebotomíneo devido a um conjunto de glicoproteínas de membrana (lipofosfoglicanos - LPG) e a adesão propiciada por essas moléculas impede que o parasito seja expelido juntamente com as excretas do flebotomíneo, após a digestão do sangue (Sacks e Kamhawi, 2001).

As promastigotas procíclicas passam por mudanças morfológicas e fisiológicas no tubo digestivo do vetor e parte dessa população se diferencia em formas metacíclicas, onde há uma mudança do perfil de moléculas citoplasmáticas e de membrana do parasito, o que garante sua liberação do tubo digestivo do inseto vetor, tornando-as mais infectantes ao hospedeiro mamífero (Sacks e Sher, 2002; Chappuis et al, 2007; Handman e Bullen, 2002).

Ao realizar um novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado susceptível, as formas infectantes de *Leishmania* são inoculadas diretamente da probóscide, junto com a saliva do inseto. Esta saliva apresenta uma capacidade anticoagulante, por conter peptídeos de grande poder vasodilatador, exercendo, portanto, importante papel na transmissão do protozoário. (Schlein, 1993; Sacks e Kamhawi, 2001; Killick-Kendrick e Rioux, 2002; Bates, 2008; Araújo-Santos et al, 2010).

As promastigotas metacíclicas, uma vez no interior do hospedeiro vertebrado, podem ser fagocitadas por neutrófilos, células dendríticas ou macrófagos. Após a internalização, as promastigotas estão vulneráveis à acidez e a ação de enzimas líticas do fagolisossoma e se diferenciam em formas amastigotas. Estas formas podem evadir a resposta imunológica dos macrófagos e multiplicar por divisão binária até a morte e ruptura dos macrófagos infectados, permitindo a liberação das amastigotas e favorecendo a fagocitose das amastigotas por outras células do sistema mononuclear fagocitário. Quando o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo neste hospedeiro, ingere macrófagos infectados, perpetuando o ciclo do parasito (Vannier-Santos et al, 2002; Olivier et al, 2005; Chappuis et al, 2007; Rodriguez et al, 2011)



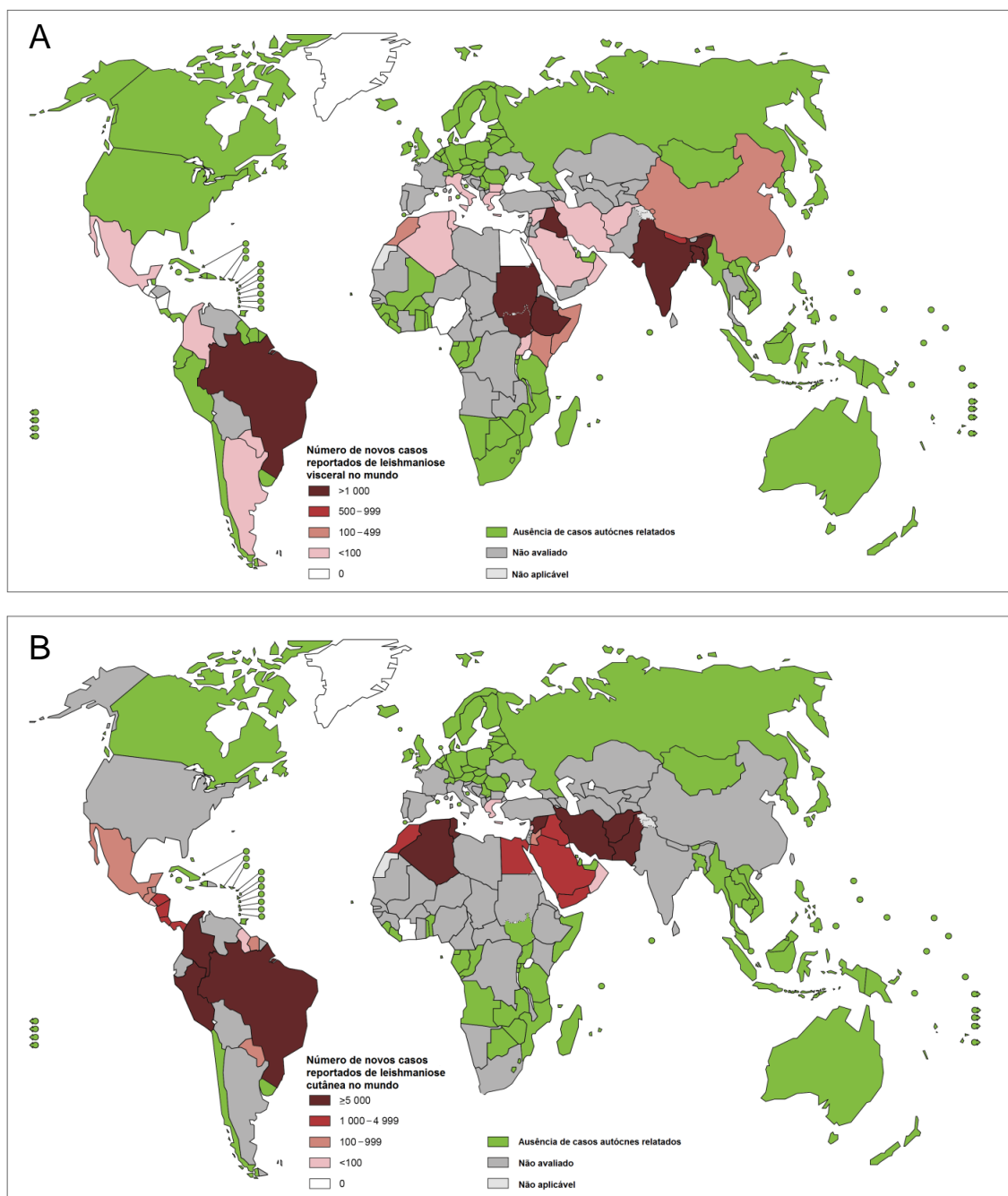
**Figura 3.** Ciclo Biológico de *Leishmania* sp. (Fonte: adaptado de Chappuis et al, 2007).

Dependendo da espécie de *Leishmania* e das interações com o hospedeiro vertebrado, os parasitos apresentam diferentes tropismos, tais como: pele, mucosas, fígado, baço e medula óssea, caracterizando a manifestação clínica. A patogênese, suas manifestações clínicas e o curso da infecção dependerão das interações complexas relacionadas à virulência das diferentes espécies do gênero e da resposta imunológica mediada pelas células do hospedeiro (Harhay et al, 2011).

## 5.2. Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses ocorrem nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo. A prevalência mundial é de cerca de 12 milhões de pessoas, com uma estimativa de incidência anual de 0,4 milhões de novos casos de leishmaniose visceral e 1,2 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (WHO, 2014). Esta doença afeta principalmente as pessoas de mais baixa renda na África, Ásia e América Latina e o aumento progressivo de sua incidência está associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e sistema imunológico comprometido (Desjeux, 2001). Na leishmaniose visceral, mais de 90% dos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão e, se não tratada, pode chegar a taxas de letalidade de 100 % após dois anos em países em desenvolvimento (Alvar et al, 2012; WHO, 2014).

As taxas de mortalidade por leishmaniose são imprecisas e geralmente representam apenas as mortes registradas em hospitais. A ocorrência de subnotificações é gerada principalmente pela dificuldade de acesso ao sistema de saúde, representativo número de mortes (ocorrendo fora dos postos de saúde com causa provável não reconhecida), falha na vigilância epidemiológica e relatos de casos incompletos. A estimativa preliminar, considerando todos os impedimentos na coleta de dados é de 20.000 a 40.000 mortes por ano no mundo, principalmente por leishmaniose visceral (Alvar et al, 2012; WHO, 2014). A figura 4, a seguir, mostra a distribuição geográfica e a incidência das leishmanioses visceral e tegumentar.



**Figura 4.** Distribuição geográfica da incidência da leishmaniose visceral (A) e leishmaniose tegumentar ou cutânea (B) no mundo. Dados do ano de 2012.

Fonte: WHO Global Health Observatory Map Gallery, modificado (<http://gamapserver.who.int/mapLibrary>).

No Brasil, as ações de controle estão relacionadas ao diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução da população de flebotomíneos e eliminação dos reservatórios. Ainda assim, o número de casos cresceu substancialmente na última década, envolvendo tanto a forma visceral quanto a

tegumentar. Esse aumento pode estar relacionado com a melhoria no diagnóstico e notificação dos casos, controle inadequado do inseto vetor, aumento da leishmaniose tegumentar associada a infecções oportunistas e o aparecimento de resistência aos medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses (Reithinger et al, 2007; Brasil, 2014).

### 5.3. Patologia

A infecção por leishmania se dá através do parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear de órgãos como fígado, baço, medula óssea e sistema linfóide. A fagocitose dos parasitos pelos macrófagos ativados por INF- $\gamma$  é a primeira barreira contra a infecção, no entanto, são dotados de mecanismos que lhes permitem escapar dessas defesas (Wright e Silverstein, 1983; Bogdan e Röllinghoff, 1999; Brittingham et al, 1999; Handman e Bulen, 2002; Horikawa e Peña, 2011).

Além da provável recombinação de seu glicocálix que limita o reconhecimento e opsonização por anticorpos, a mimetização do processo apoptótico expressa pela exteriorização de fosfatidilserina também faz com que estes parasitos sejam internalizados por macrófagos, alterando a resposta pró-inflamatória adequada, sendo um mecanismo utilizado como forma de evadir o sistema imunológico (Bogdan e Röllinghoff, 1999; Brittingham et al, 1999; Heussler et. al, 2001; Handman e Bulen, 2002). Relatos de indução de apoptose (fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos, padrão de fragmentação de DNA, etc) durante infecções já foram descritos e relacionados com uma imunorregulação no hospedeiro onde os parasitos são diretamente beneficiados por este controle que pode ser visto como um bem sucedido mecanismo de escape, uma vez que, tanto a indução quanto a inibição de apoptose são exercidas pelo parasita. A destruição do parasito pelo sistema complemento é impedida por não ocorrer a formação do complexo lítico de ataque a membrana uma vez que sua montagem pode ser inibida pela presença de lipofosfoglicanas (LPG) e proteases (gp63) nas membranas dos promastigotas (Bogdan e Röllinghoff, 1990, 1999; Horikawa e Peña, 2011).

Dentro do vacúolo, as leishmanias ficam susceptíveis às espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO), induzidas pelo macrófago

sob forma de subprodutos do pico respiratório. Estes são suprimidos pelo protozoário quando a fagocitose ocorre pela associação dos receptores do complemento CR3 e CR1 aos ligantes C3b e C3bi presentes na superfície do parasito, acompanhados da síntese de tripanotiona (ditiol que atua no metabolismo de peróxido). Dessa forma, infectam a célula-alvo com segurança, caso contrário o poder oxidante desses radicais livres atuaria na destruição dos parasitos (Wright e Silverstein, 1983; Babior et al, 2000; Horikawa e Peña, 2011). A forma infectante promastigota, uma vez no interior do fagossomo, necessita da associação com lisossomos apresentando pH ácido para que tenha sucesso na sua transferência ao citoplasma da célula infectada, a fim de proliferar no compartimento citosólico sob a forma amastigota. Por serem as formas responsáveis pela manutenção da infecção, as amastigotas tornam-se os principais alvos terapêuticos (Wright e Silverstein, 1983; Brittingham et al, 1999; Bogdan e Rölinghoff, 1999; Cunningham et al, 2002; Horikawa e Peña, 2011; Real e Mortara, 2012).

#### 5.4. Tratamento

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2012), os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose humana são a anfotericina B (desoxicolato e lipossomal), antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), miltefosina, paromomicina e pentamidina (WHO/PAHO, 2012).

Antimoniais orgânicos, em sua forma trivalente (Sb III), foram utilizados na quimioterapia das leishmanioses pela primeira vez em 1912, pelo médico e cientista brasileiro Gaspar Vianna, logo após o reconhecimento, em 1904, de que as espécies de *Leishmania* eram a causa da leishmaniose. Somente a partir da década de 40 o uso do Sb (III) foi interrompido devido aos graves efeitos adversos provocados. Em decorrência disso, medicamentos à base de antimoniais pentavalentes Sb (V) foram desenvolvidos na forma de complexos com ácido glucônico e meglumina (Franco et al, 1995).

Os complexos de Sb (V) antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis) e estibogluconato de Sódio (Pentostam®, GlaxoSmithKline) são utilizados contra todas as formas de leishmaniose na África, América do Sul,

Bangladesh, Nepal e Índia (exceto no estado de Bihar, devido ao alto índice de resistência ao antimônio) (Berman, 1997; WHO, 2014). Sua baixa absorção oral e sua elevada depuração plasmática determinam que seja administrado diariamente por via parenteral (endovenosa ou intramuscular) por um período de no máximo 40 dias (Chulay et al, 1988, WHO, 2010).

A resposta terapêutica é consideravelmente variável ao tratamento com os antimoniais dependendo da cepa do parasito envolvida, do estado imunológico do paciente e da forma clínica e estágio da doença, o que acarreta falhas no tratamento (Grimaldi Jr e Tesh, 1993; Sundar et al, 2000; Lawn et al, 2003).

Os efeitos colaterais representam um problema importante no uso dos antimoniais pentavalentes. Estes efeitos aparecem principalmente no final do tratamento e incluem náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, convulsões, pancreatite química, nefrotoxicidade, alterações eletrocardiográficas e desordens hepáticas, que se manifestam pelo aumento dos níveis séricos de transaminases e fosfatases alcalinas (Ballou et al, 1987; Alkhawajah et al, 1992; Berman 1997; Sing e Sivakumar, 2004; Croft et al, 2006; Ikeda-Garcia et al, 2007; Santos et al, 2008; Mitropoulos et al, 2010).

No Brasil, além da toxicidade, outro problema da terapia das leishmanioses é a grande ocorrência da doença em zonas rurais, o que dificulta a assistência aos pacientes, que necessitam se deslocar até um centro de saúde para receber tratamento, mediante assistência hospitalar. Conseqüentemente, os casos de interrupção do tratamento se tornam mais frequentes, o que pode resultar também no aparecimento de resistência ao medicamento (Berman, 1997). Além disso, existem ainda outros fatores de risco responsáveis pela propagação da leishmaniose no mundo como nos casos de pacientes com leishmaniose cutânea difusa e os de co-infecção de HIV e leishmaniose visceral, onde há ausência da resposta imune celular e agravamento da infecção (Berhe et al, 1999; Convit et al, 1989; Desjeux e Alvar, 2003).

Nos últimos anos, alternativas terapêuticas aos antimoniais foram desenvolvidas para o tratamento das leishmanioses, como o desoxicolato de Anfotericina B (AmB), a AmB lipossomal, pentamidina e miltefosina (Santos et al, 2008). Apesar da disponibilidade de drogas alternativas, devido à toxicidade,



longos períodos de tratamento, variabilidade geográfica quanto à eficácia, taxas de recidivas, necessidade de internação e alto custo, esses tratamentos são cada vez mais inviáveis e há a necessidade de desenvolvimento de estratégias para reverter esse quadro. Além disso, devido às leishmanioses serem doenças ligadas às regiões mais pobres e apresentarem alta incidência em países em desenvolvimento, o custo de tratamento é um fator limitante nas políticas de erradicação e controle. A tabela 3 mostra uma projeção dos custos relacionados a todo tratamento da leishmaniose.

**Tabela 3.** Custo do tratamento da leishmaniose. Adaptada de Olliaro et al, 2009.

Dose total mg/Kg	Internação						Ambulatorial			1 dia
	AB 20	AB 15	AB 10	AB 5	PM	MF	PM	MF (preço marcado)	MF (preço WHO)	AB 5
Cronograma	dia sim/não	dia sim/não	dia sim/não	1 vez	1 vez/d	50 mg 2 vezes/d	1 vez/d	50 mg 2 vezes/d	50 mg 2 vezes/d	1 vez
Permanência hospitalar (dias)	10	10	10	1	21	28	0	0	0	1
Rota de administração	IV	IV	IV	IV	IM	PO	IM	PO	PO	IV
Taxa de cura (%)	94	94	94	91	94	94	90	85	85	90
Custo cuidados	\$14400	\$11400	\$8400	\$2000	\$16440	\$20200	\$3210	\$2800	\$2800	\$700
Custo droga	\$28600	\$22950	\$16360	\$6892	\$745	\$11925	\$745	\$11925	\$7513	\$6892
Custo total	\$43000	\$34350	\$24760	\$8892	\$17185	\$32125	\$3955	\$14725	\$10313	\$7592

AB, anfotericina B lipossomal AmBisome®; PM, paromomicina; MF, miltefosina.

IV, injeção intravenosa; IM, injeção intramuscular; PO, via oral

Custo em dólares.

Há, portanto, a necessidade do desenvolvimento de fármacos que causem menos efeitos colaterais e que apresentem um custo mais adequado às necessidades dos pacientes.

### 5.5. Mecanismos de ação dos fármacos contendo Sb

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes em *Leishmania* não está totalmente elucidado (Duffin e Renné, 1991; Frezard et al, 2009). O modelo mais aceito seria que o Sb (V) agiria como uma pró-droga e seria

reduzido no organismo à forma mais tóxica e ativa, Sb (III) (Frezard et al, 2009).

Essa teoria é reforçada após um estudo que analisou o antimoniato de meglumina comercial e indicou que o conteúdo de Sb se encontrava na forma trivalente em até 30 % (contaminante), sugerindo que o modo de ação desta droga poderia ser mediado por este valor “residual”. E, também, que a disponibilidade da forma trivalente aumenta nos valores de pH reduzidos, como encontrado especificamente no vacúolo parasitóforo, onde a *Leishmania* reside no organismo (Salun e Frezard, 2013).

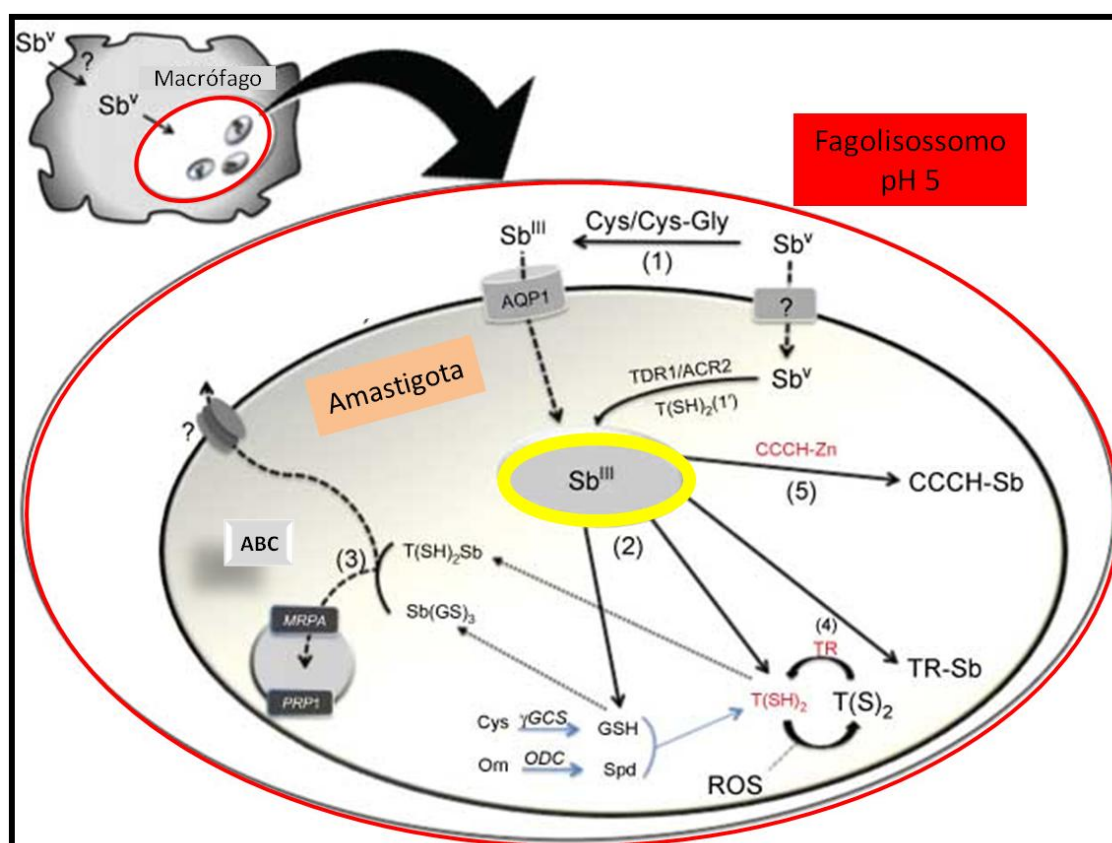
Estudos demonstram que esta reação poderia ocorrer tanto no hospedeiro vertebrado quanto no parasito (Goodwin e Page, 1943; Burguera et al, 1993; Ferreira et al, 2003; Wyllie e Fairlamb, 2006; Hansen et al, 2011; Shaked-Mishan et al, 2011;) e os potenciais agentes relatados como responsáveis por essa reação de redução seriam os tióis: glutatona (GSH), que é o principal tiol no citosol de células de mamíferos; cisteína (Cis) e cisteína-glicina (Gli-Cis), que são encontrados dentro dos lisossomos; tripanotona ( $T(SH)_2$ ), que é o principal tiol do parasito (Fairlamb e Cerami, 1992; Yan et al, 2003).

As observações de que a Cis, Cis-Gli e ( $T(SH)_2$ ) são agentes de redução mais eficazes do que GSH e que esta redução é favorecida em pH ácido (Ferreira et al, 2003), direcionou a hipótese de que Sb(V) seria reduzido *in vivo* por  $T(SH)_2$  nos parasitos e por Cis ou Cis-Gli no interior dos compartimentos ácidos de células de mamíferos. Outros estudos reforçam a hipótese da participação de enzimas específicas do parasito no processo de redução de Sb(III) a Sb(V) através da redutase dependente de Thiol tipo 1 (TDR1) (Denton et al, 2004) e a antimoniato redutase tipo 2 (ACR2) (Yan et al, 2002; Zhou et al, 2004).

O mecanismo do Sb (III) em *Leishmania* pode estar relacionado com sua afinidade com biomoléculas contendo sulfidrilas (tióis, enzimas, peptídeos, enzimas). Sb (III) é capaz de formar complexos estáveis com os tióis GSH e  $T(SH)_2$  (Sun et al, 2000; Yan et al, 2003). Estes complexos são substratos de transportadores do tipo (ABC), que são dependentes de ATP e sofreriam efluxo a partir da célula ou seriam sequestrados por vesículas intracelulares (Legare et al, 2001; Manzano et al, 2013). O transporte de Sb (III) nas células de

*Leishmania* ocorre por meio de uma proteína de membrana, a aquagliceroporina, AQP1 (Gourbal et al, 2004) e é independente de energia (Brochu et al, 2003).

Sb (III) pode promover sua ação leishmanicida por meio da indução do estresse oxidativo, pela inibição da tripanotona redutase (TryR) e o aumento do efluxo de tióis reduzidos (Wyllie et al, 2004). Sua ação estaria também relacionada à ativação da cadeia de morte celular por interferência na estruturação e reparação de material genético, evidenciada por estudos nos quais o Sb (III) associa-se a resíduos de cisteína e histidina de “peptídeos dedo de zinco” promovendo o desacoplamento de Zn (II) (Demicheli et al, 2008; Frézard et al, 2012). A Figura 5 indica os principais mecanismos sugeridos para o Sb.



**Figura 5.** Modelo proposto para o mecanismo de ação do antimônio (Sb) contra *Leishmania*. Fonte: modificado de Frézard et al, 2013.

## II. JUSTIFICATIVA

A descoberta de novas drogas é um processo longo e dispendioso. O total gasto para pesquisa e desenvolvimento nas indústrias farmacêuticas dos Estados Unidos foi mais de 20 bilhões ao ano até o fim dos anos 90 e, a cada ano, esse custo se eleva. Por isso, procura-se minimizar o tempo de desenvolvimento de uma nova droga. A utilização de nanocarreadores na elaboração de drogas mais eficientes tem sido considerada promissora, pois age também como uma via na tentativa de diminuição dos custos (Krogsgaard-Larsen et al, 1996; Yih e Al-Fandi, 2006; Jiang, et al, 2008; Adair, et al 2010).

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas e o tratamento com antimoniato de meglumina tem gerado baixa adesão em função da sua alta toxicidade, gerando efeitos colaterais indesejados. Além disso, já existem relatos de resistência na utilização deste medicamento (Henderson, 1985; Franke et al., 1990; Hepburn, 1993; Ashford, 1996; Faraut-Gambarelli et al, 1997; Delgado et al, 1999; Magill, 2000; Ferreira et al, 2003; Henao et al, 2004; Frezard et al., 2005; Sharma e Singh, 2008; WHO, 2008). Ainda que a utilização de drogas encapsuladas (ex: lipossomas - AmBisome®) e emulsões lipídicas (ex. Anfotericina B) tenha apresentado resultados satisfatórios, o alto custo ainda os mantém fora dos programas de Saúde Pública (Kumar, 2000). Alguns estudos que utilizam o antimoniato de meglumina em lipossomas ainda se encontram na fase de testes pré-clínicos (Gabizon et al., 2003; Frézard et al., 2005).

Ensaio preliminares conduzidos em nosso laboratório (LIQBRA) demonstraram a possibilidade de sintetizar minerais amorfos ricos em fosfatos que poderiam ser utilizados como nanocarreadores de antimônio, pois apresentariam dissolução sob condições intracelulares, baixa reatividade imunológica, diâmetro inferior a 10  $\mu\text{m}$  e superfície carregada (Simkiss, 1981; Simkiss e Taylor, 1994, Corrêa Jr et al., 2009), o que pode contribuir para a diminuição das doses sistêmicas do fármaco e também reduzir a concentração de Sb utilizado, reduzindo assim os efeitos colaterais atuais observados no tratamento com Glucantime.

Neste estudo, foi proposta a síntese e caracterização físico-química de compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF) contendo ou não antimônio

como sistemas de liberação controlada de fármacos em modelo de infecção experimental em macrófagos murinos com *Leishmania infantum* como alvo biológico, sob diferentes condições de ensaio.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo geral

Síntese, caracterização físico-química e avaliação da atividade antileishmanial de compósitos nanoestruturados fosfatados como matriz carreadora de Sb em modelo de estudo *in vitro*.

#### 2. Objetivos específicos

Sintetizar CNFs contendo diferentes concentrações de antimônio pelo método desenvolvido por nosso grupo de pesquisa.

Caracterizar os CNFs sintetizadas física e quimicamente.

Realizar ensaios *in vitro* em macrófagos não expostos à *Leishmania infantum*, para avaliar a viabilidade celular após interação com os CNFs.

Verificar a internalização dos CNFs bem como avaliar a incorporação de antimônio em macrófagos não infectados.

Avaliar a taxa de infecção de amastigotas de *Leishmania infantum* em macrófagos murinos.

Avaliar a ativação de macrófagos, pela liberação de óxido nítrico (NO), quando infectados com *L. infantum* e expostos aos CNFs.

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. Síntese de compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF)**

Os compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF) foram sintetizados no Laboratório do Estudo da Interação Físico-Química e Reprodução Animal, no Departamento de Morfologia, ICB-UFMG, em meio líquido com pH controlado, utilizando-se soluções contendo sais fosfatados e ânions de reconhecida atividade biológica associados a modificadores do estado cristalino ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  - Cromoline;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - Cromoline;  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  - Sigma,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - Synth), em um sistema de membranas semipermeáveis (Spectrum Medical Industries, Inc). Foram obtidos quatro tipos de CNF: CNF0 (sem Sb na formulação), CNF3, CNF5 (contendo Sb na forma pentavalente) e CNFT (contendo Sb na forma trivalente), diferenciados entre si pela adição de concentrações crescentes de Sb durante as sínteses. As condições experimentais e metodológicas constam em pedido de patente e encontram-se protegidas nos depósitos registrados sob os números BR 10 2012032493-8, BR 10 2013032731-0 e BR 13 2015031111-6 (Anexos A, B e C).

Após a síntese, os CNFs foram isolados por centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado resultante foi lavado três vezes com etanol absoluto (Merck) e após nova série de centrifugação, foram secos em estufa a 60° C por 48 horas. Alíquotas de 1 mg por frasco de cada CNF foram inseridas em microtubos cônicos de polipropileno e esterilizadas por irradiação gama, na dose de 25 kGy, no Laboratório de Irradiação Gama - LIG, CDTN-UFMG.

Para todas as análises subsequentes, uma solução estoque contendo 1 mg de CNF foi eluída em 100  $\mu\text{L}$  de líquido (água milli-Q, etanol ou meio de cultura RPMI 1640), imediatamente antes da utilização.

### **2. Caracterização dos compósitos nanoestruturados fosfatados (CNF)**

#### **2.1. Potencial Zeta**

Para obter o potencial zeta dos CNFs foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern), do Laboratório de Biofísica Molecular, ICB-UFMG. Foi utilizado 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque (1 mg de cada CNF diluídos em 100  $\mu\text{L}$  de água milli-Q) e adicionados a 2 mL de água destilada, inserindo nas

cubetas do equipamento, para efetuar as leituras. As leituras foram registradas após a homogeneização seguidas da estabilização das amostras.

## **2.2. Distribuição de diâmetro e morfologia**

Amostras dos CNFs (1 mg diluídos em 100  $\mu$ l de água milli-Q) foram hidratadas e depositadas sobre lamínula de carbono (Thermanox®), secas ao ar, metalizadas a vácuo ( $10^{-5}$  mBar) com carbono no evaporador Hitachi modelo HUS4G e analisadas nos microscópios de varredura FEG Quanta 200 (FEI) e JEOL JSEM 6340 do Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG, onde foram adquiridas as imagens por elétrons secundários utilizando-se ampliações entre 30.000 e 50.000x. Os diâmetros dos CNFs foram medidos através da técnica de Morfometria, de acordo com as micrografias eletrônicas capturadas, utilizando o programa ImagePro Plus 4.0. As distribuições de diâmetro foram geradas no programa GraphPad Prism 5.0.

## **2.3. Difração de raios-X (DRX)**

Amostras secas (3 mg de cada CNF) foram depositadas sobre suportes de silício e analisadas no Difratorômetro de Policristais (Geigerflex-RIGAKU), composto por bomba de Cu, com ângulo de leitura de  $2\theta$ , aproximadamente 70 graus, com passo de  $0,1^\circ$  e tempo de acumulação médio de 1 hora. As medidas foram realizadas no Laboratório de Cristalografia, do Departamento de Física da UFMG. Os difratogramas contendo a distribuição de intensidade do feixe difratado pelos diferentes planos cristalinos ou o padrão amorfo foram obtidos para todos os CNF sintetizados. Os difratogramas foram comparados com padrões localizados nas bibliotecas cristalográficas: ICSD-Inorganic Crystal Structure Database (disponível em: <http://icsd.fiz-karlsruhe.de.fisica.dotlib.com.br/search/basic.xhtml>) e CRYSTMET (disponível em: [http://bdec.dotlib.com.br/go\\_global/index?direct=true&embed=false&app=crystmet](http://bdec.dotlib.com.br/go_global/index?direct=true&embed=false&app=crystmet)), a fim de identificar os possíveis planos cristalinos conhecidos.

## **2.4. Dosagem de Sb nas nanopartículas**

Para a dosagem de Sb nas nanopartículas, foram utilizados 1 mg de cada uma, diluídos em HNO<sub>3</sub> 0,2 % e posteriormente lidas em um



espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 600, Perkin Elmer), em um comprimento de onda de 217.6 nm. As dosagens de antimônio foram realizadas utilizando uma curva de calibração, com Antimony 1000 PPM A/S Standard II (PerkinElmer Pure – Atomic Spectroscopy Standard) estabelecida com um padrão de antimônio. As leituras foram realizadas no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG.

### **3. Ensaio *in vitro***

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos BALB/c, com idade entre 4 a 6 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO), do ICB-UFMG. Os experimentos foram realizados em conformidade com as orientações para o uso de animais de laboratório e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (Protocolo número: 131/2012) (Anexo D).

#### **3.2. Obtenção de macrófagos**

Para a retirada de macrófagos peritoneais, camundongos BALB/c foram inoculados via intraperitoneal com 2,5 mL de tioglicolato a 3% (Gordon, 2003). Após 3 dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em cada um, injetou-se na cavidade peritoneal 10 mL de meio de RPMI 1640 não suplementado, gelado e estéril. Posteriormente, foi feita uma massagem abdominal com a retirada do meio contendo os macrófagos, com auxílio de seringas, mantidas no gelo até a centrifugação. As células foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos e posteriormente contadas em câmara de Neubauer para serem plaqueadas. Todos os ensaios de obtenção de macrófagos, MTT, e infecção de macrófagos com *L. infantum* foram realizados no Laboratório de Biologia de Leishmania, do Departamento de Parasitologia, ICB-UFMG.

#### **3.3. Ensaio de citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos (MTT)**

Foram realizados ensaios da citotoxicidade *in vitro* dos CNFs contendo antimônio (CNF3, CNF5 e CNFT) e sem antimônio (CNF0) em sua formulação,

em macrófagos murinos, por meio da técnica de (MTT (brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium) (Mosmann, 1983). Para isto, foram incubados  $5 \times 10^5$  macrófagos por poço, em meio RPMI 1640. Após as lavagens para retirada das células não aderidas, os macrófagos aderidos à placa foram incubados com a solução de CNF0, 3, 5 e T, (estoque de 1 mg) em diluições de: 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 mg mL<sup>-1</sup>, em volume final de 100 µL de meio RPMI 1640 completo. Como controle positivo do experimento, macrófagos aderidos foram incubados na presença apenas do meio de cultura.

As culturas permaneceram expostas aos compostos durante 24 horas, incubadas a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, adicionou-se aos poços 10 µL da solução MTT (Sigma® Co-USA) a 5 mg mL<sup>-1</sup> (50 µg/poço). As placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan gerados, e posteriormente as placas foram lidas em espectrofotômetro, com densidade óptica lida em comprimento de onda de 570 nm (Tempone et al, 2004). Os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes em triplicatas.

### **3.4. Ensaio de internalização dos CNFs utilizando microscopia eletrônica de varredura e microscopia analítica**

Para este experimento, macrófagos murinos peritoneais ( $5 \times 10^5$ ) foram plaqueados em placa de 24 poços, em triplicata, utilizando lamínulas (Thermanox) para a aderência dos mesmos, sendo mantidos em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de exposição às CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT, na concentração de 60 µg mL<sup>-1</sup>, as células aderidas às lamínulas foram fixadas em glutaraldeído 4 % em tampão cacodilato, 0,1 M, pH 7,4. Após uma hora, as células foram lavadas no mesmo tampão e foram metalizadas com carbono utilizando em um evaporador (Hitachi modelo HUS4G) e analisadas por MEV, com elétrons secundários, elétrons retroespalhados e por microanálise de raios-X em um microscópio FEG Quanta 200 (FEI) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG.

### 3.5. Determinação de Sb intracelular em macrófagos

A incorporação de Sb intracelular em macrófagos foi determinada pela técnica de espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (Roberts e Rainey, 1993). Macrófagos foram contados em câmara de Neubauer e o volume ajustado para  $5 \times 10^5$  células/mL. As células, em um volume final de 1 mL, foram mantidas em placas de 24 poços, em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Duas horas após a adesão dos macrófagos os CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT foram adicionados à cultura, utilizando a concentração de 60 µg mL<sup>-1</sup> e incubados por 24 e 48 horas.

Após a exposição, as células foram lavadas 3x em meio RPMI 1640 a fim de remover todos CNF e Sb em torno das células. As amostras foram digeridas em ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65 % (Merck) e diluídas 100 vezes, em (HNO<sub>3</sub>) 0,2 %, posteriormente lidas em um espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 600, Perkin Elmer), em um comprimento de onda de 217,6 nm. As dosagens de antimônio foram realizadas utilizando uma curva de calibração, com Antimônio 1000 PPM A/S Standard II (PerkinElmer Pure – Atomic Spectroscopy Standard) estabelecida com um padrão de antimônio. As leituras foram realizadas no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG.

### 3.6. Atividade anti-amastigota de CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT

Para a infecção dos macrófagos aderidos em placas e lamínulas, foram utilizados promastigotas de *L. infantum*, durante a fase estacionária de crescimento. Os parasitas ( $1 \times 10^7$ ) foram incubados juntamente com os macrófagos ( $5 \times 10^5$ ), “overnight”, a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub> para permitir a infecção. As placas foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 à temperatura ambiente para remover os parasitas não internalizados. Este tempo foi considerado o “tempo zero” de infecção. As células foram então incubadas com os CNF0, CNF3 (Sb(V)), CNF5 (Sb (V)) e CNFT (Sb (III)) utilizando diluições a partir da solução estoque (1 mg diluído em volume final de 100 µL de meio), nas concentrações de 20, 60 e 180 µg mL<sup>-1</sup> e com Glucantime, nas concentrações de 50, 150 e 450 ng mL<sup>-1</sup>, por 24, 48 e 72 horas a 37° C, na presença de 5 % de CO<sub>2</sub> até ao fim do experimento.

O antimoniato de meglumina utilizado no experimento foi proveniente da droga comercial Glucantime® (apresentado em ampolas de 5 mL a 300mg/mL, lote 3680, Sanofi-Aventis, São Paulo), obtidas pelo Ministério da Saúde. A partir desse material soluções estoque a 3 mM e 30 mM foram feitas visando a obtenção de concentrações finais de uso.

A taxa de infecção assim como o número de amastigotas por macrófago foi avaliada pela contagem do número de macrófagos infectados e pelo número de parasitas (na forma amastigota) no interior dessas células, após os tempos variados de incubação. Este experimento foi realizado em duplicata. A taxa de infecção do controle deste teste foi > 90 %.

A atividade do Glucantime e dos CNFs foi avaliada, após utilizar a coloração de Panótico nas lamínulas, através da contagem de 200 macrófagos em cada tratamento e a taxa de infecção das células foi calculada por meio do percentual (%) de células infectadas em todos os tratamentos (Gebre-Hiwot et al, 1992; Bogdan et al, 1990). O número de parasitas internalizados foi demonstrado de acordo com a taxa de infecção categorizada por: macrófagos não infectados, 1-5, 6-10 ou >10 amastigotas/macrófago, adaptado de Gebre-Hiwot et al, 1992.

### **3.7. Produção de óxido nítrico em macrófagos infectados ou não tratados com CNF3 e CNFT**

Com o objetivo de avaliar a produção de NO em estímulo à co-cultura dos macrófagos juntamente com as leishmanias, bem como se os compostos utilizados exerciam aumento da produção de NO, foi utilizada a microscopia de epifluorescência. Para tal, os macrófagos foram plaqueados ( $5 \times 10^5$  céls/poço) em placas de 24 poços com lamínulas de vidro estéreis, infectados com  $10^7$  promastigotas de *L. infantum* em cada poço. Após 24 horas de cultura, os diferentes tratamentos (amastigotas de *L. infantum* axênicas, macrófagos não infectados, macrófagos infectados, não infectados CNFT, macrófago não infectado com CNF3, macrófago infectado com CNFT e com macrófago infectado com CNF3) foram incubados com  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  da sonda fluorescente intracelular para o NO, 4-amino,5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate (DAF-FM DA), por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após duas lavagens com solução de PBS para remoção do excesso de sonda do

meio extracelular, as lamínulas foram montadas com PBS em lâminas para microscopia. As preparações foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Axio Apo Tome, Zeiss, Alemanha). A sonda foi excitada a 480 nm com uma lâmpada de xenônio e a emissão de fluorescência foi filtrada a 490-530nm. A aquisição de dados foi realizada na modalidade de *snap* com o tempo de exposição fixo em 500 mili-segundos. A intensidade de fluorescência foi calculada a partir das imagens obtidas por meio do programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Foram selecionadas células (regiões de interesse) e por fim o valor absoluto de fluorescência foi demonstrado por meio de uma média das u.a. (unidades arbitrárias) de fluorescência gerada. Os dados foram estatisticamente analisados por meio do teste *one way ANOVA*, seguido do pós-teste de *Bonferroni*.

#### **4. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA) utilizando-se análises de variância (two way ANOVA) seguidas de pós teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média seguidos de erro padrão, com intervalo de confiança de 95 %. Resultados onde  $p < 0,05$ , foram considerados estatisticamente significativos.

## V. RESULTADOS

### 1. Caracterização físico-química dos CNF

#### 1.1. Potencia zeta e condutividade

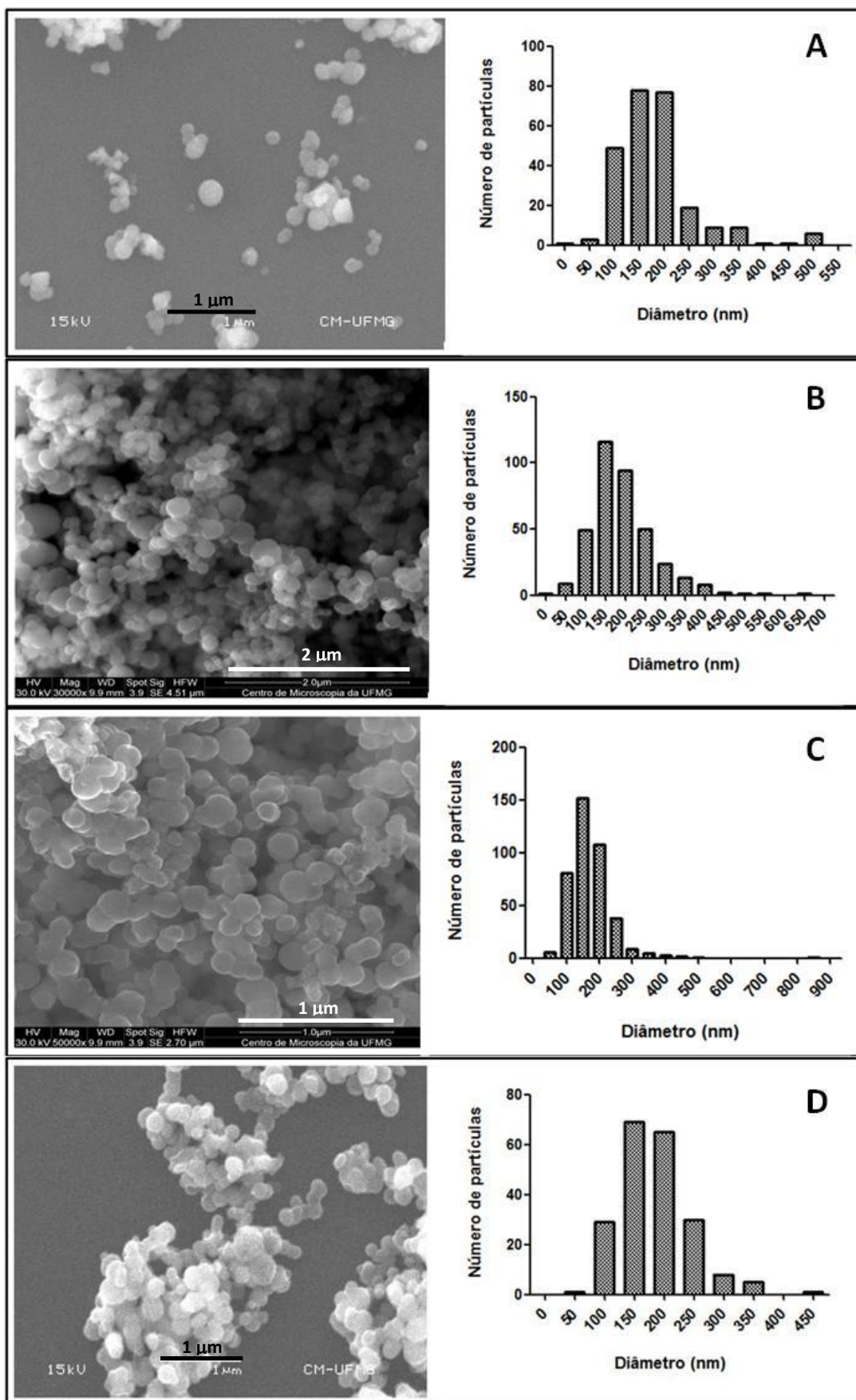
O Potencial zeta e condutividade dos CNFs são apresentados na Tabela 4. Todos os valores de potencial zeta se mantiveram negativos, entre -14,7 e -19,5 mV. A condutividade apresentou valores próximos a 0,02 mS cm<sup>-1</sup> no CNF0, CNF3, CNF5.

**Tabela 4.** Caracterização dos CNFs em relação ao potencial zeta e condutividade.

<b>CNF</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>Condutividade (mS cm<sup>-1</sup>)</b>
CNF0	-19,5	0,0082
CNF3	-17,8	0,0136
CNF5	-15,5	0,0197
CNFT	-14,7	0,1620

#### 1.2. Distribuição de diâmetro e morfologia dos CNFs por Microscopia Eletrônica de Varredura

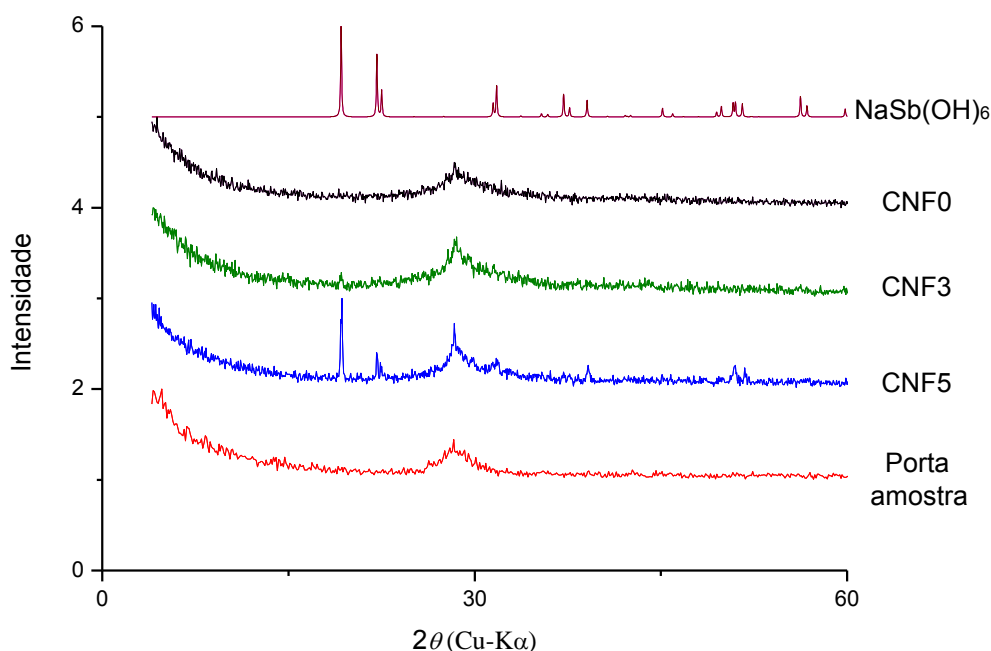
Todos os CNFs sintetizados apresentaram forma esférica, como mostrado pelas eletromicrografias (Figura 6). A distribuição de diâmetro obtida para o CNF0 apresentou média de 183,2 nm e o intervalo de confiança de 95 % foi entre 173,1 e 193,3 nm. Para o CNF3, a média obtida foi 193,5 nm, com intervalo de confiança de 95% entre 185,2 e 201,8 nm. Para o CNF5, a média obtida foi 172,8 nm, com intervalo de confiança de 95 % entre 166 e 179,6 nm. Para o CNFT, a média obtida foi 186,4 nm, com intervalo de confiança de 95 % entre 178,2 e 194,4 nm.



**Figura 6.** Micrografias eletrônicas por elétrons secundários acompanhadas de gráfico da distribuição de diâmetro do CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT (A, B, C e D).

### 1.3. Padrões de difração de raios-X dos CNFs

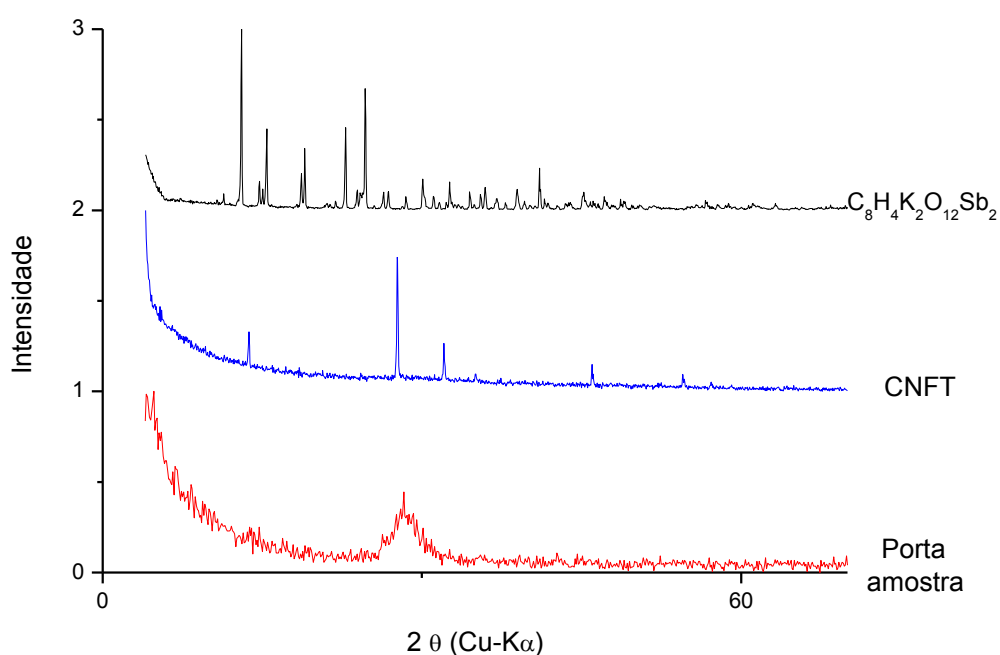
Os padrões de difração de raios-X são mostrados nas figuras 7 e 8. O difratograma da figura 7 mostra um único pico largo que está presente em  $2\theta = 28,3^\circ$  para todas as nanopartículas sintetizadas, similar ao do porta amostras de silício, indicando um padrão predominantemente amorfo. O CNF5 também apresentou picos cristalinos (19,1 e 22,1). Após análise nos bancos de dados cristalográficos identificamos a similaridade com a Mopungita, mineral de fórmula  $\text{NaSb}(\text{OH})_6$ .



**Figura 7.** Difratograma dos CNFs, Mopungita e  $\text{KSb}(\text{OH})_6$ . Em relação ao porta amostras, que é amorfo, pode-se notar que CNF0 e CNF3 apresentaram um perfil amorfo. O CNF5 apresenta-se amorfo com alguns picos cristalinos.

A figura 8 mostra o difratograma do CNFT (SbIII) que contém o composto tartarato de antimônio e potássio ( $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$ ) em sua síntese, bem como o difratograma deste composto. Em relação ao porta amostras, que é amorfo, o CNFT apresenta um perfil predominantemente cristalino. Os planos cristalinos formados são diferentes dos picos encontrados em  $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2$ , demonstrando sua diferença estrutural.





**Figura 8.** Difractograma dos CNFT e  $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2$ . Os picos encontrados no CNFT não se assemelham aos picos presentes em  $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2$ .

#### 1.4. Concentração de Sb nas nanopartículas

A tabela 5 mostra os valores de Sb encontrados para cada nanopartícula. Observa-se que o CNF que possui maior concentração de Sb foi o CNFT, e o que possui a menor concentração, CNF3. O CNF0 apresenta um valor abaixo do limite de detecção do aparelho, sendo que esta nanopartícula não apresenta Sb em sua estrutura.

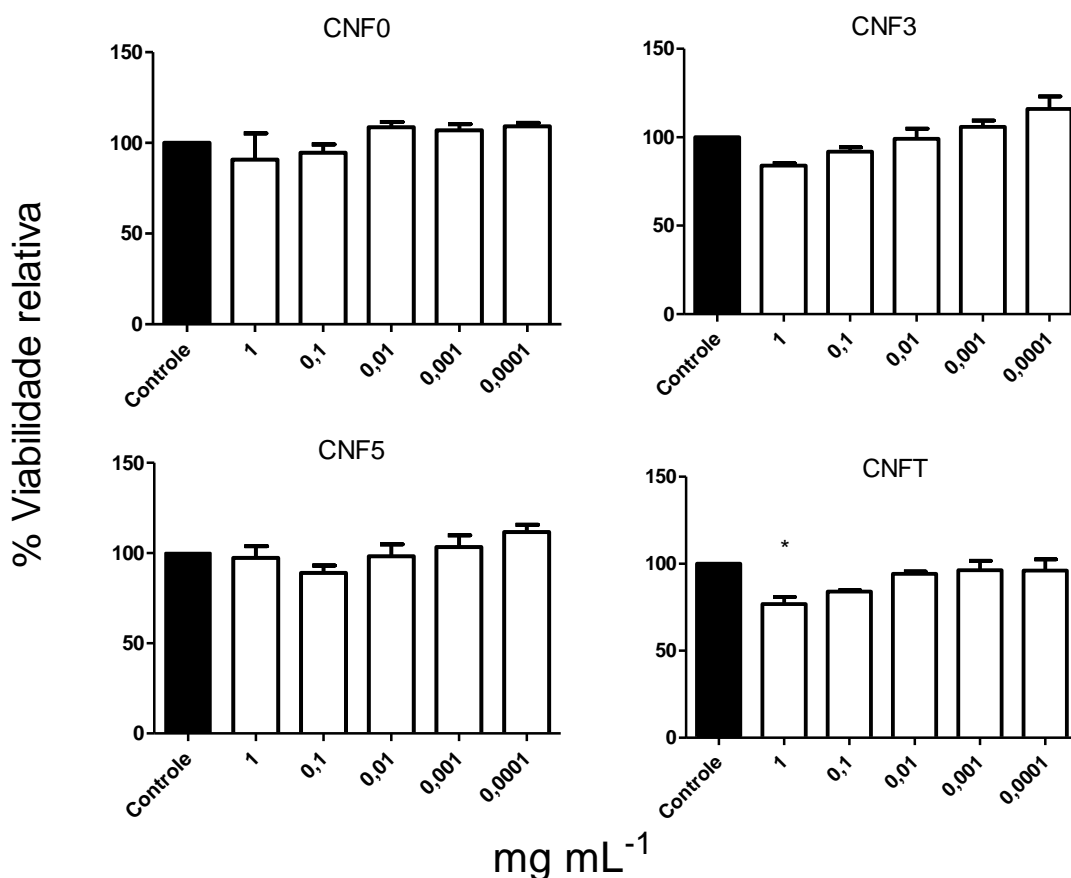
**Tabela 5.** Quantificação de Sb nas nanopartículas.

CNF	Concentração de Sb ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
CNF0	0,063
CNF3	6,948
CNF5	36,243
CNFT	46,697

## 2. Ensaios *in vitro*

### 2.1. CNFs não apresentam toxicidade para macrófagos murinos

A toxicidade dos CNFs foi testada em cultura de macrófagos murinos. A figura 9 mostra os gráficos de viabilidade celular encontrada nas diferentes diluições das nanopartículas (1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001 mg mL<sup>-1</sup>). Não foi observada qualquer redução significativa na viabilidade das células frente às diferentes diluições testadas para cada CNF. O CNFT apresentou uma diferença significativa na viabilidade de macrófagos (diluição 1 mg mL<sup>-1</sup>) em relação ao controle, mas a viabilidade celular foi pouco comprometida, em cerca de 24 %, percentual que inviabiliza traçar o IC50 desta nanopartícula.

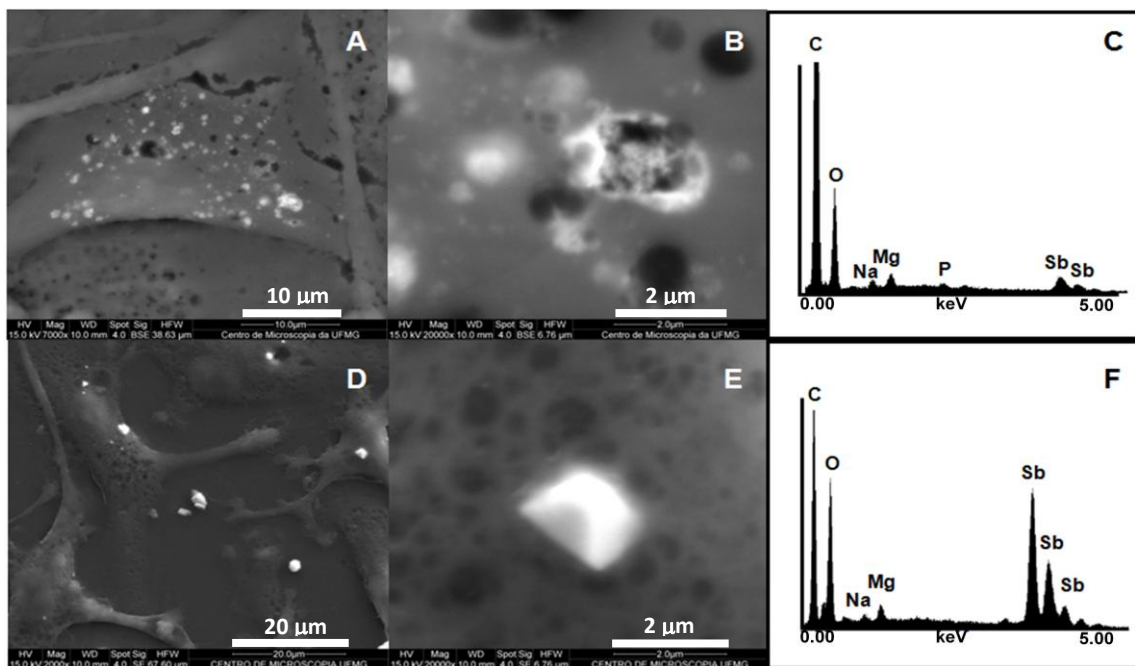


**Figura 9.** Viabilidade celular dos CNFs. Conforme observado, após aplicação de teste estatístico (two way ANOVA), estas nanopartículas não apresentaram toxicidade aos macrófagos murinos, exceto no CNFT na diluição de 1 mg mL<sup>-1</sup> onde houve diferença significativa quando comparado ao controle.

## 2.2. Ensaio de internalização das nanopartículas

Utilizamos CNF3 e CNFT para demonstrar a internalização por macrófagos murinos utilizando técnicas microscopia de eletrônica de varredura (Fig.10). Pode-se observar os CNF3 e CNFT em no período de 72 horas, como mostrado na figura 10 A, B, D e E, respectivamente. No ensaio com CNF3 a distribuição de áreas claras de diferentes diâmetros abaixo da membrana plasmática evidenciam agregados de CNF que diferem do aspecto observado com após interação com o CNFT, o qual apresentaram menor número de inclusões citoplasmáticas com peculiar aspecto romboédrico de tamanho próximo a 2  $\mu\text{m}$ .

Em C e F, estão representados os gráficos referentes à composição elementar das inclusões citoplasmáticas através da microanálise de raios-X, evidenciando nas amostras com CNF3 picos característicos de C, O, Na, Mg, P, Sb, de forma similar, mas não idêntica ao observado para os expostos ao CNFT que apresenta C, O, Na, Mg, e Sb.



**Figura 10.** Micrografia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados mostrando macrófagos murinos com internalização de CNF3 (A e B) e em (C), o respectivo espectro de raio-X da região elétron-densa contendo picos característicos de C, O, Na, Mg, P e Sb. Micrografia eletrônica de varredura por elétrons secundários mostrando macrófagos murinos com CNFT internalizado (D e E), e respectivo espectro de raio-X da região elétron-lucente apresentando picos característicos de C, O, Na, Mg e Sb.

### 2.3. Concentração de Sb intracelular em macrófagos murinos

A tabela 6 mostra a quantificação de Sb em macrófagos expostos aos CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT, nos intervalos de interação de 24 e 48 horas. Todos os macrófagos expostos aos CNF contendo Sb apresentaram aumento em sua concentração no mínimo de 24 vezes (para CNF3 em 48 horas) e no máximo de 304 vezes (CNFT em 48 horas) sendo que para CNF0 em 48hs os valores são similares aos obtidos nos controles.

No período de 24 horas, macrófagos tratados com CNF3 apresentaram valores inferiores aos obtidos para CNF5 e CNFT. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com CNF3 e CNF5 após 48 horas, apenas com o CNFT.

Os macrófagos apresentaram redução nas concentrações de Sb entre os períodos de 24 e 48 horas nos tratamentos com CNF3 (redução de 9%) e CNF5 (redução de 56%). Diferentemente, para o CNFT houve aumento de 19% ainda que não tenha sido evidenciado no teste estatístico.

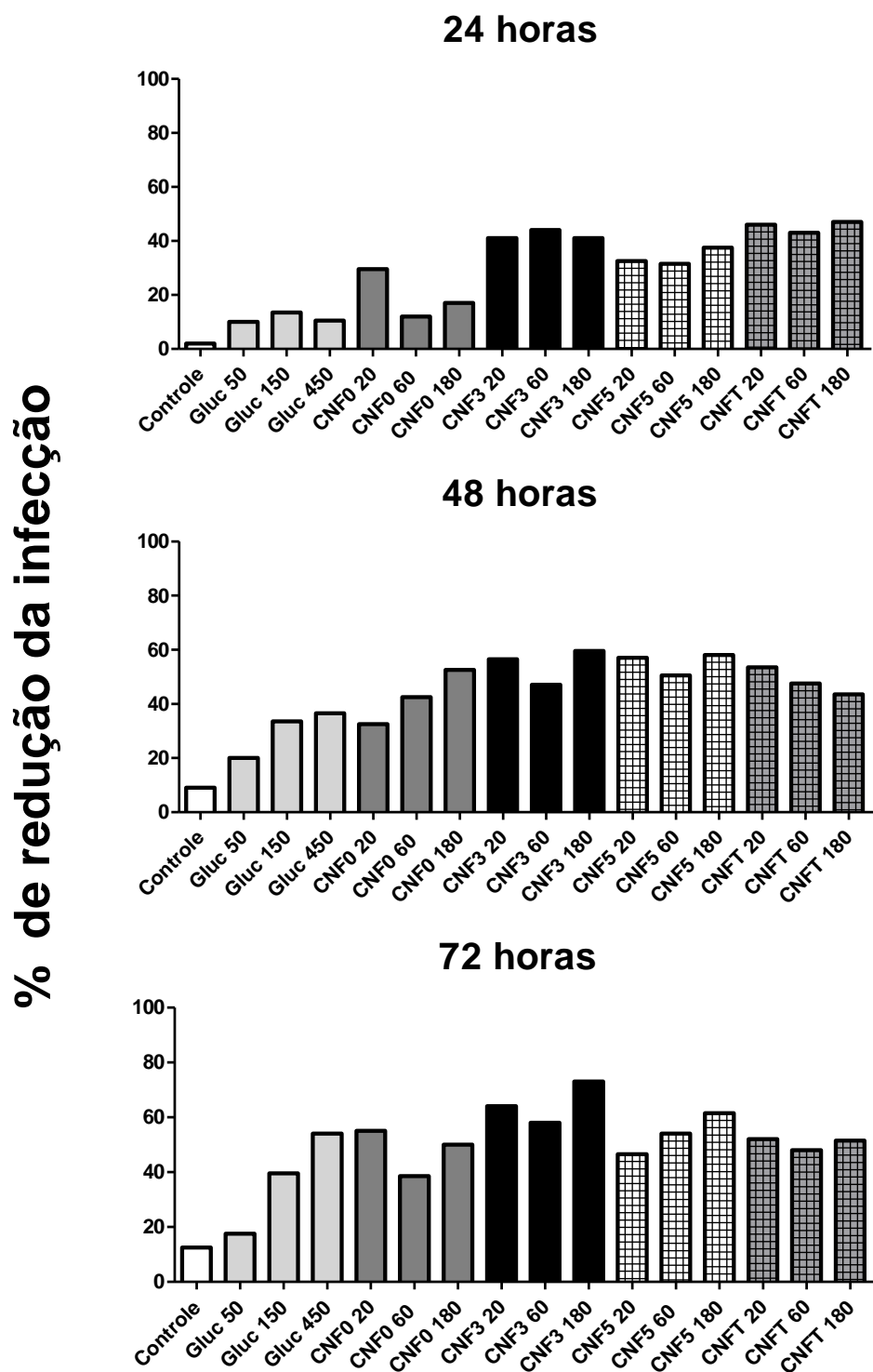
**Tabela 6.** Quantificação de Sb em macrófagos expostos aos CNF no período de 24 e 48 horas. Análises estatísticas foram realizadas em dados transformados  $Y=\text{Log}(Y)$ .

Tratamento	Sb adicionado 0h	24h	48h	% internalização Sb 24h	% internalização Sb 48h
Controle	Nd	33 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	Nd	Nd
CNF0	37 <sup>a</sup>	nd	28 <sup>a</sup>	Nd	Nd
CNF3	4168 <sup>c</sup>	919 <sup>b</sup>	750 <sup>b</sup>	22	18
CNF5	21745 <sup>e</sup>	3596 <sup>c</sup>	1912 <sup>b</sup>	16	9
CNFT	28018 <sup>e</sup>	7815 <sup>d</sup>	9345 <sup>d</sup>	27	33

## **2.4. Efeito de Glucantime, CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT no modelo de infecção por *Leishmania infantum*.**

### **2.4.1 Percentual total de infecção**

Os gráficos mostrados na figura 11 indicam o percentual da infecção dos macrófagos após exposição ao Glucantime e CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT, em 24, 48 e 72 horas. Em 24 horas, houve redução da infecção quando tratados com Glucantime, CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT (cerca de 10, 20, 42, 34 e 45% respectivamente) em todas as concentrações. Em 48 horas, a redução da infecção prossegue (cerca de 30% no Glucantime, 45% no CNF0, 55% no CNF3, 58% no CNF5 e 50% no CNFT), bem como em 72 horas (cerca de 40% no Glucantime, 50% no CNF0, 61% no CNF3, 37% no CNF5 e 50% no CNFT).



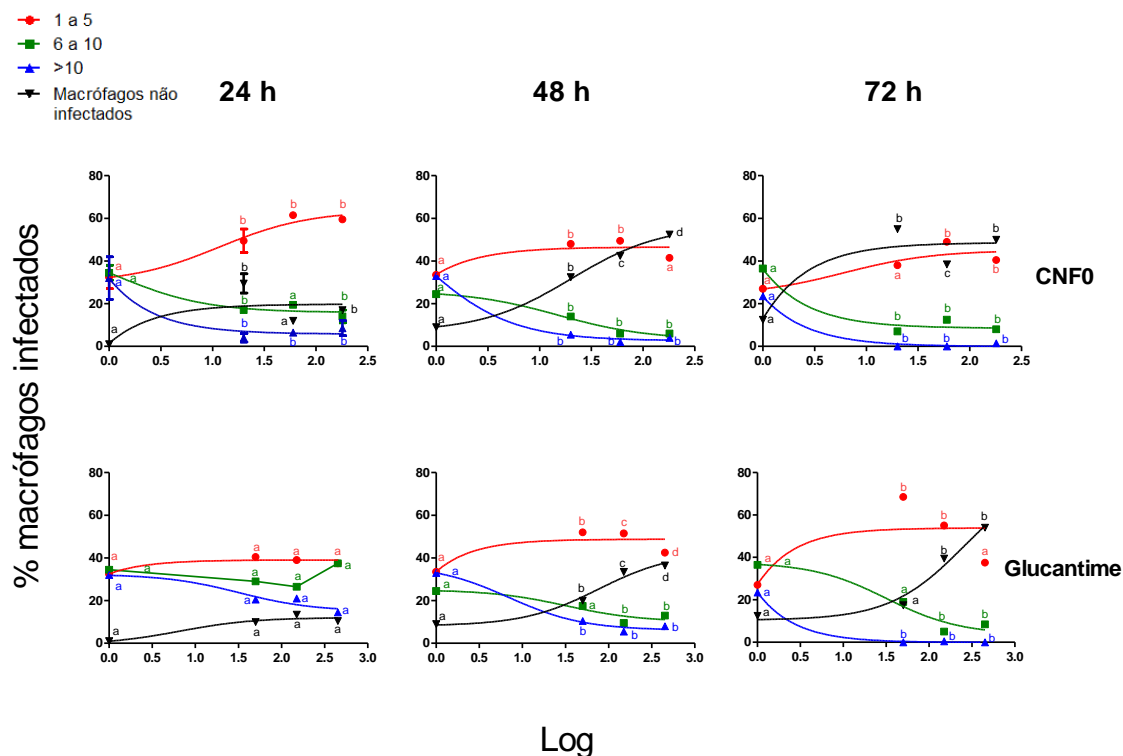
**Figura 11.** Percentual de redução da infecção em 24, 48 e 72 horas após exposição ao Glucantime (50, 150 e 450 ng mL<sup>-1</sup>) e CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT (20, 60 e 180 µg mL<sup>-1</sup>).

#### **2.4.2 Redução do número de amastigotas por macrófago quando expostos aos CNFs**

A figura 12 mostra o efeito de Glucantime e CNF0, nas concentrações de 50, 150 e 450 ng mL<sup>-1</sup> e 20, 60 e 180 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente sobre amastigotas de *L. infantum*, após os períodos de 24, 48 e 72 horas.

As taxas de infecção dos macrófagos controle (sem adição de Glucantime e CNF) a cada tempo analisado estão na concentração 0 (zero). No tratamento com CNF0 em 24 horas, houve a redução do percentual de macrófagos infectados por *L. infantum* contendo >10 amastigotas e o aumento do percentual de macrófagos não infectados. Após 48 horas, o percentual de macrófagos contendo 6-10 e >10 amastigotas foi reduzido e o percentual de macrófagos não infectados aumentou aproximadamente 60%. Resultados similares foram vistos em 72 horas.

Quando o Glucantime foi testado utilizando a mais alta concentração (450 ng mL<sup>-1</sup>), o percentual de células infectadas reduziu em todo o período de exposição a droga, de 10% em 24 horas até 60% em 72 horas.



**Figura 12.** Gráfico da taxa de infecção em macrófagos em log da concentração de CNF0 e Glucantime mostrando efeito em amastigotas de *L. infantum*, após 24 horas de interação. Em vermelho: 1 a 5 amastigotas por macrófago; em verde: 6 a 10 amastigotas por macrófago; em azul: >10 amastigotas por macrófago; em preto: macrófagos não infectados.

A figura 13 mostra o efeito do CNF3, CNF5 e CNF7, ambos nas concentrações de 20, 60 e 180  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sobre amastigotas de *L. infantum*, após os períodos de 24, 48 e 72 horas.

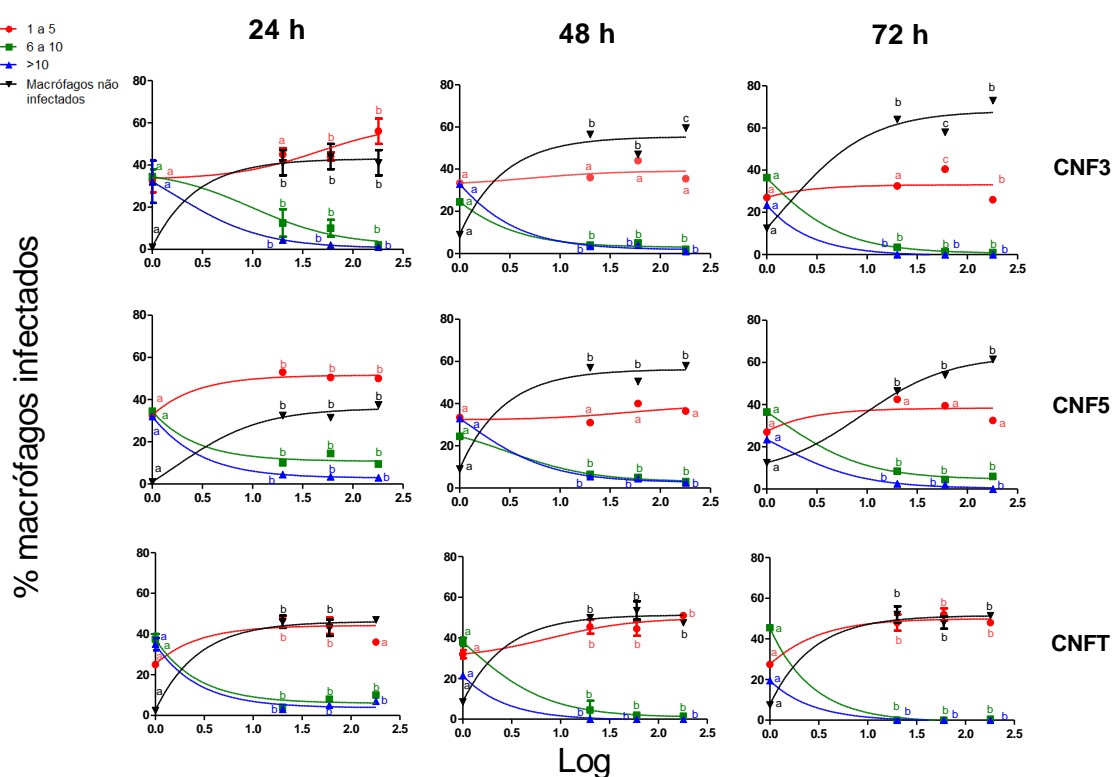
No tratamento com CNF3 em 24 horas, houve a redução do percentual de macrófagos infectados contendo 6-10 e >10 amastigotas e houve aumento do número de macrófagos não infectados em aproximadamente em 40% (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 24 horas. Após 48 horas, o percentual de macrófagos contendo 1-5, 6-10 e >10 reduziu e o percentual de macrófagos não infectados aumentou cerca de 55% (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após 72 horas, o percentual de macrófagos contendo 1-5, 6-10 e >10 reduziu (60 e 180  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e o percentual de macrófagos não infectados aumentou cerca de 70% (180  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

No tratamento com CNF5 em 24 horas, observou-se uma diminuição no número de macrófagos com 6-10 e >10 amastigotas e o número de macrófagos não infectados foi cerca de 35%. Em 48 horas, observou-se uma



diminuição no número de macrófagos com 1-5, 6-10 e >10 amastigotas e o número de macrófagos não infectados foi cerca de 57%. Em 72 horas, observou-se uma diminuição no número de macrófagos com 1-5, 6-10 e >10 amastigotas e o número de macrófagos não infectados foi cerca de 61%.

No tratamento com o CNFT, independentemente da concentração utilizada, observou-se redução no número de macrófagos infectados em 24, 48 e 72 horas, com a redução dos macrófagos contendo 6-10 e <10 amastigotas. Os macrófagos não infectados (40% em 24 horas) apresentaram pequena variação chegando a cerca de 50% após 72 horas.



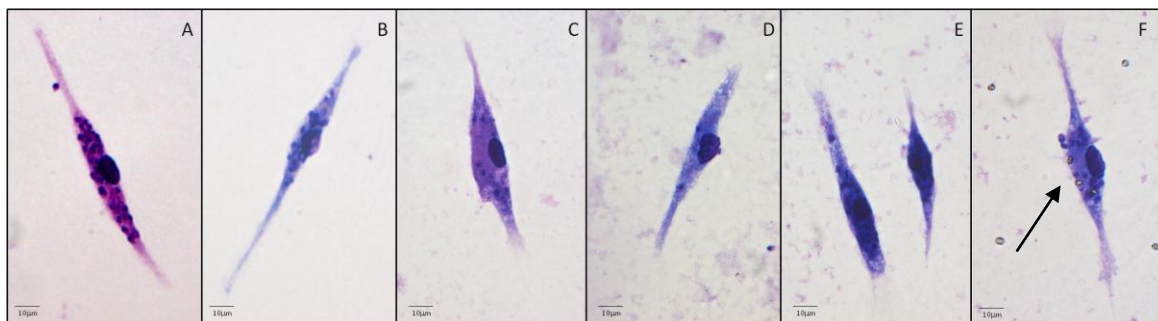
**Figura 13.** Gráfico da taxa de infecção em macrófagos em log da concentração de CNF3, CNF5 e CNFT mostrando efeito em amastigotas de *L. infantum*, após 24, 48 e 72 horas de exposição. Em vermelho: 1 a 5 amastigotas por macrófago; em verde: 6 a 10 amastigotas por macrófago; em azul: >10 amastigotas por macrófago; em preto: macrófagos não infectados.

#### 2.4.3 Aspecto morfológico dos macrófagos após exposição aos CNFs

O aspecto morfológico, por microscopia de luz, dos macrófagos infectados com *L. infantum* e expostos ao Glucantime, CNF0, CNF3, CNF5 e

CNFT em relação ao controle não tratado, nos tempos de exposição de 24 horas é apresentado abaixo, na figura 14.

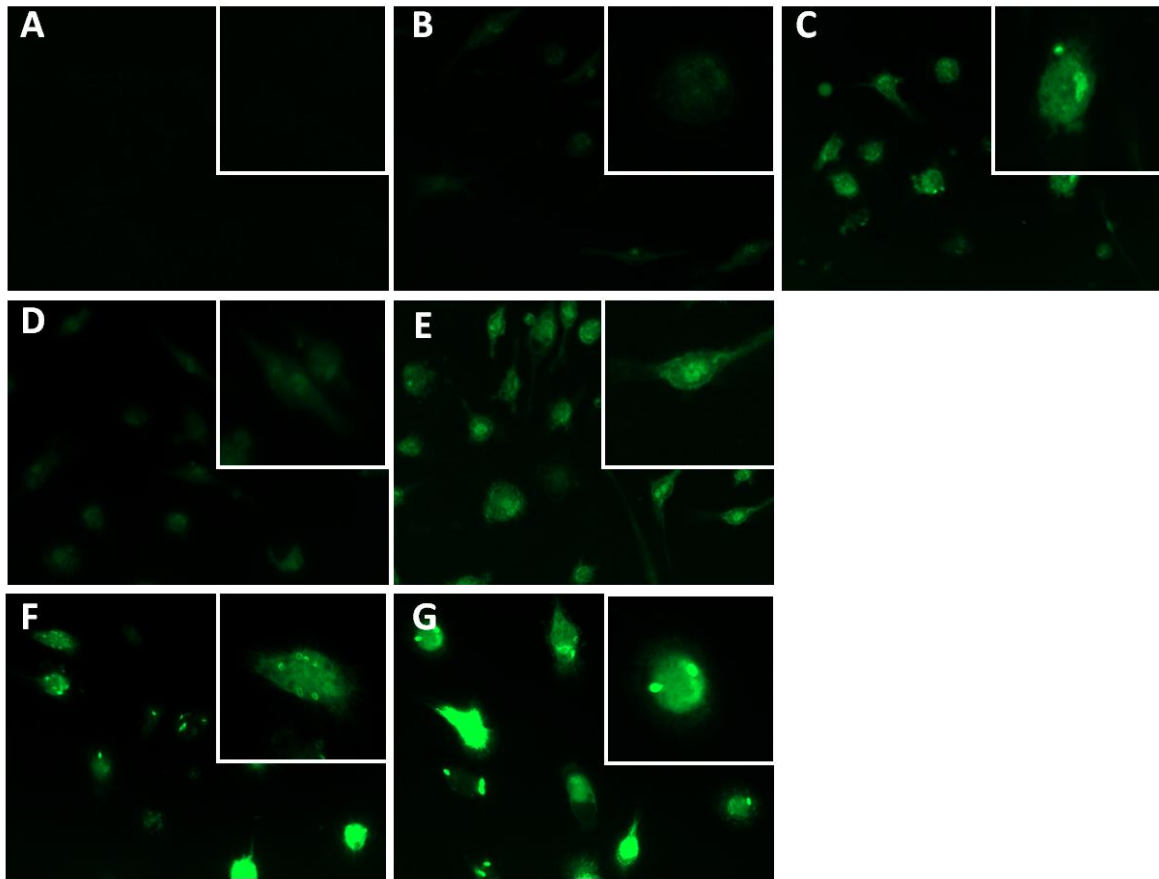
No controle (A), observam-se macrófagos com aspecto fusiforme com grande quantidade de amastigotas intracelulares. Em todos os outros tratamentos também se observa macrófagos com aspecto fusiforme e há, ainda, grande quantidade de amastigotas internalizadas no tratamento com o Glucantime (B). Observa-se redução no número de amastigotas intracelulares nos tratamentos com CNF0 (C), CNF3 (D), CNF5 (E) e CNFT (F). Além disso, nos macrófagos mostrados em F, é visível a presença de material resultante da interação com o CNFT.



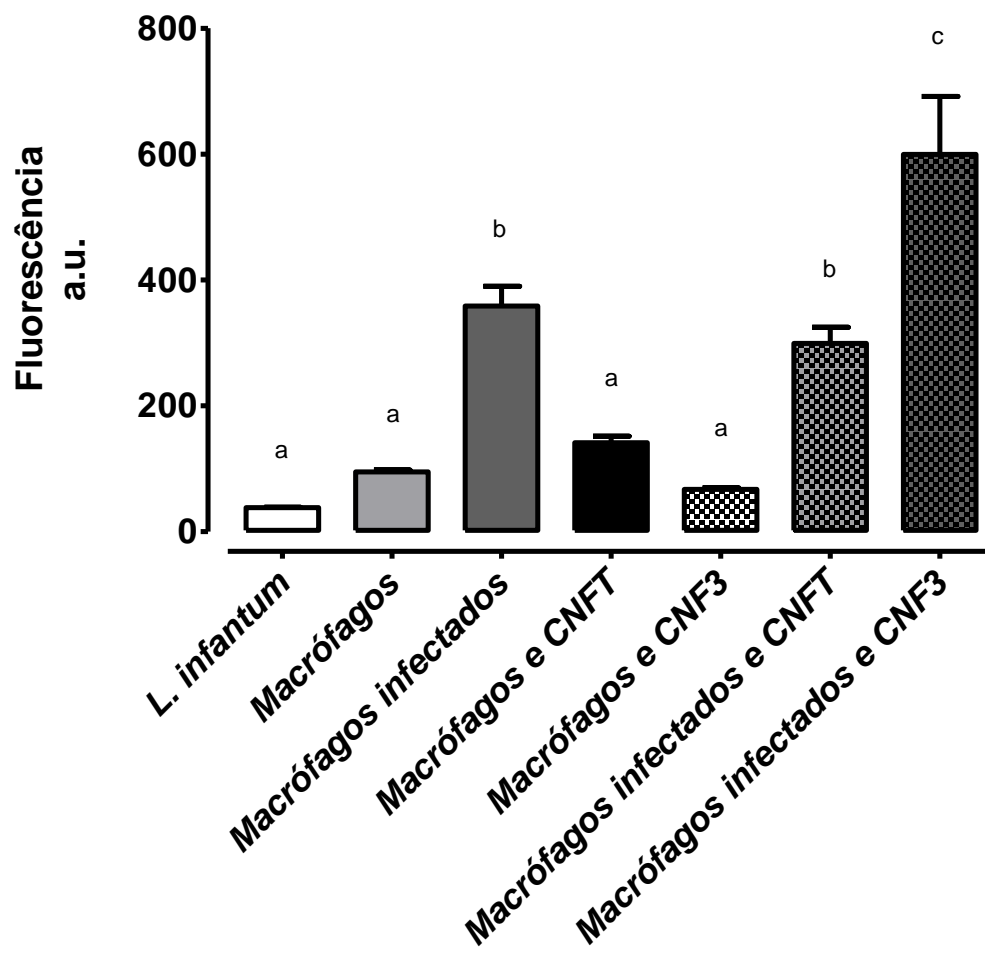
**Figura 14.** Fotomicrografia de macrófagos infectados com *L. infantum* na forma amastigota (A) controle (não tratados), B glucantime, C CNF0, D CNF3, E CNF5 e F CNFT. Notar aspecto basofílico intracitoplasmático das amastigotas nos macrófagos corados com Panótico e resíduo de CNFT internalizado (seta em F).

### 2.5. Determinação de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados ou não com *L. infantum* e expostos ao CNF3 e CNFT.

A figura 15 mostra a fluorescência resultante após interação com DAF-FM DA em (A) promastigotas de *L. infantum* axênicas, (B) macrófagos não infectados, (C) macrófagos infectados, (D) macrófagos não infectados e expostos ao CNFT, (E) macrófagos não infectados expostos ao CNF3, (F) macrófagos infectados expostos ao CNFT e (G) macrófagos infectados expostos ao CNF3. Após análise por intensidade média de fluorescência, os valores dos grupos contendo de macrófagos infectados apresentaram valores superiores aos dos demais tratamentos, indicando maior produção de NO (Fig. 16). Adicionalmente o grupo com macrófagos infectados desafiados com CNF3 apresentou valor 1,7 vezes maior do que os macrófagos somente infectados.



**Figura 15.** Imagens de microscopia de fluorescência mostrando a intensidade de fluorescência em (A) promastigotas de *L. infantum* axênicas, (B) macrófagos não infectados, (C) macrófagos infectados, (D) macrófagos não infectados expostos ao CNFT, (E) macrófagos não infectados expostos ao CNF3, (F) macrófagos infectados expostos ao CNFT e (G) macrófagos infectados expostos ao CNF3. Observar maior fluorescência nos tratamentos contendo macrófagos infectados. Em detalhe alterações da fluorescência citoplasmática e nuclear também são demonstradas.



**Figura 16.** Gráfico de intensidade média de fluorescência em unidades arbitrárias nos diferentes tratamentos após 24 horas de interação.

## VI. DISCUSSÃO

A distribuição de diâmetro de uma nanopartícula é uma de suas características mais importantes porque pode determinar sua distribuição *in vivo*, destino biológico, toxicidade, capacidade de carreamento, aprisionamento, liberação e estabilidade. Trabalhos mostraram que nanopartículas com diâmetro em torno de 100-300 nm são efetivas em estudos de captação celular, mas o potencial zeta varia de acordo com a sua funcionalização (Sortino et al, 2006; Ganesan et al, 2008). Além disso, nanopartículas com potenciais zeta carregados negativamente ou positivamente facilitam a internalização celular mantendo-se em suspensão quando os valores são próximos de  $\pm 30$  mV. Esses valores também são favoráveis para sua dispersão favorecendo sua utilização em ensaios *in vivo* e *in vitro* (Kreuter et al, 2003).

Valores próximos foram obtidos por Paul e Sharma, 2012 estudando nanopartículas de fosfato de cálcio funcionalizadas ou não. Estes autores citam a distribuição do diâmetro e o potencial zeta em torno de 40 a 200 nm e -11 a -28 mV. Estes valores também são similares aos obtidos por Kreuter et al, 2003 com diâmetros de 100 a 250 nm e +1,2 a -24 mV de potencial zeta. Em nosso estudo a análise da distribuição de diâmetro de CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT indicou que 95 % das nanopartículas apresentaram diâmetros de aproximadamente 180 nm e potencial zeta entre -14,7 e -19,5 mV. Esses dados foram considerados satisfatórios para a continuidade dos ensaios propostos.

A condutividade abaixo de  $0,02 \text{ mS cm}^{-1}$  obtida para CNF0, CNF3 e CNF5, indica melhor estabilidade estrutural destas frente a CNFT ( $0,162 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Ainda assim, estes resultados sugerem a limitada remobilização de seus elementos constituintes (Cálcio, Magnésio, Fosfato e, eventualmente, Antimônio) satisfazendo também a possibilidade de utilizá-las como nanocarreadoras também em sistema aquoso.

Nas análises de XRD, as CNF0 e CNF3 apresentaram um perfil predominantemente amorfo, diferindo dos CNF5 e CNFT que apresentaram fases cristalinas mistas. Minerais amorfos são altamente solúveis e podem incorporar diversas substâncias inorgânicas ou orgânicas e mobilizar seus elementos (Simkiss, 1991; Corrêa Júnior et al, 2009). Ainda assim o aspecto

morfológico esférico para CNF5 e CNFT sugere que as fases amorfas sejam mais superficiais do que randomicamente distribuídas (Simkiss, 1991).

Alguns estudos indicaram que há baixa toxicidade de diversos tipos de nanopartículas, sendo possíveis tratamentos promissores para a leishmaniose. Nanopartículas de sulfeto de antimônio ( $Sb_2S_4$ ) também apresentaram baixa toxicidade em macrófagos não infectados por leishmania e atividade leishmanicida contra *L. infantum* intracelular (Soflaei et al, 2012). Nanopartículas contendo selênio testadas em cultura de macrófagos infectados com *L. infantum* demonstraram redução da proliferação de amastigotas e promastigotas em 72 horas e um IC50 de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  em macrófagos não infectados. Estudos *in vitro* utilizando 7 complexos com Ni (II) em macrófagos J774.2 indicaram baixa toxicidade embora seja reconhecida a toxicidade do elemento Ni em sistemas biológicos (ATSDR, 2005). Outros estudos investigaram a atividade de nanopartículas de  $TiO_2 @Ag$  contra *L. infantum* e *L. tropica* na presença de luz visível ou não e mostraram que estas nanopartículas reduziram o número de amastigotas de *L. infantum* no interior dos macrófagos em concentração dose-dependente (Allahverdiyev et al, 2013).

Em relação ao teste de toxicidade dos CNF em macrófagos murinos, a viabilidade dessas células não foi afetada por nenhuma delas exceto para CNFT na concentração mais alta. Ainda assim pode-se considerar que houve diminuição da toxicidade do Sb (III) associado ao CNFT, já que redução de viabilidade celular de 25 % é similar a obtida por Sereno e colaboradores 1998 utilizando tartarato de antimônio e potássio em macrófagos THP-1 com  $9 \mu\text{g}$  de Sb  $\text{mL}^{-1}$ , cerca de 5 vezes menor que a concentração utilizada com CNFT ( $46 \mu\text{g}$  de Sb  $\text{mL}^{-1}$ ).

A tabela 6 mostrou a quantificação de Sb nos macrófagos expostos aos CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT nos períodos de 24 e 48 horas e o aumento da concentração de Sb em relação ao controle. Todos os macrófagos expostos aos CNF mostraram uma alta absorção celular de Sb, sendo os níveis mais elevados obtidos com CNFT. Provavelmente em função da composição das fases cristalinas internalizadas que apresentam características de menor mobilização elementar conforme sugerem os dados de microscopia eletrônica e microanálises de raios-X.

Essa dinâmica refletiu na concentração de Sb internalizada, que nos macrófagos variou de  $750 \mu\text{g mL}^{-1}$  (CNF3, 48 horas) a  $9345,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  (CNFT, 48 horas). CNFT promoveu uma elevada captação de Sb em 24 horas também porque a sua concentração inicial foi cerca de 7 vezes maior que a do CNF3 e o Sb foi mais rapidamente absorvido e retido em 24 e 48 horas. Os níveis de Sb intracelular foram mais estáveis em CNF3 do que em CNF5 e CNFT, onde os valores variaram de 9% a 33% na concentração final de Sb (Tabela 6).

Macrófagos incubados com CNF5 também mostraram uma redução na concentração celular de Sb de 47% entre 24 e 48 horas; em contraste, a concentração de Sb reduziu 19% neste mesmo período em macrófagos tratados com CNF3. A internalização de Sb pelos macrófagos foi observada nas primeiras horas de interação e foi seguida por uma redução nos níveis de Sb ao longo do tempo, exceto no CNFT que aumentou a concentração. O conjunto dos dados acima sugerem que há diferentes taxas de eliminação de Sb para cada nanopartícula testada e que CNFT apresenta um favorecimento termodinâmico para a agregação de sais sob forma cristalina intracelular provavelmente modulada pela Lei da energia livre de Gibbs favorecendo a passagem de organizações atômicas e moleculares de formação contendo fases amorfas para fases predominantemente cristalinas (Baumgartner et al, 2013; Yang et al, 2013).

Em alguns estudos prévios, os níveis de Sb (III) após exposição ao Glucantime foram dosados usando diferentes técnicas (Rath et al, 1997; Flores et al, 2002; Trivelin et al, 2006; Almeida et al, 2007; Cabral et al, 2008; Santos et al, 2009; Lukaszczyk e Zyrnicki, 2010; Seby et al, 2012), mas poucos estudos dosaram os níveis de Sb (III) e Sb (V) em macrófagos. Em um estudo anterior, os autores quantificaram os níveis de Sb (III) e Sb (V) em amastigotas e promastigotas de *L. mexicana pifanoi* utilizando espectroscopia de absorção com atomização eletrotérmica (Roberts e Rainey, 1993). Este estudo também caracterizou a cinética do influxo e efluxo de Sb (III) e Sb (V) e as taxas de influxo foram determinadas através da concentração de Sb que produziria uma redução do crescimento de 50% (IC50). A taxa de influxo de Sb (V) em amastigotas e promastigotas foram de 4,8 a 12 pg por milhão de células por hora, respectivamente e uma concentração de Sb de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A taxa de

influxo de Sb (III) nas amastigotas foi de 41 pg por milhão de células por hora e a concentração de Sb foi  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O influxo de Sb (III) nas amastigotas com uma concentração de Sb de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi rápida e atingiu um patamar de 175 pg por milhão de células em 2 horas (Roberts e Rainey, 1993). A maior concentração intracelular de Sb, cerca de  $90 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi dosada em macrófagos humanos Mono Mac 6, utilizando o medicamento Pentostam (estibogluconato de sódio) que contém o Sb (V). Em comparação, em nosso trabalho foi encontrada uma concentração bem mais elevada de Sb (Hansen et al, 2011).

Nos macrófagos expostos aos CNFs que contém Sb, a retenção de Sb poderia ocorrer de um modo semelhante como foi descrito em outros trabalhos, como no caso do tartarato de antimônio e potássio (SbIII) ou estibogluconato de sódio (SbV) em macrófagos J774 infectados com *L. panamensis* (WR120). Após apenas 4 horas, os macrófagos acumularam grandes quantidades de Sb com retenção intracelular de pelo menos 3 dias, demonstrando um potencial papel dessas células como um reservatório de Sb (Roberts et al, 1995). Estas células também são comumente utilizadas como alvos para teste de potenciais agentes terapêuticos contra leishmaniose por causa de seu papel em remover as amastigotas (estágio responsável pela manutenção da infecção no hospedeiro) (Cunningham, 2001; Mitropoulos et al, 2010).

Sabe-se que o Sb (III) possui elevada toxicidade, não sendo mais utilizado há várias décadas e o Sb (V) passou a ser associado a diferentes fármacos. O presente trabalho evidencia a potencial utilidade ao Sb (III) quando associado à nanopartículas, considerando o concomitante direcionamento delas às células-alvo específicas. O direcionamento de Sb mediado por nanopartículas em macrófagos pode diminuir os efeitos colaterais sistêmicos e também aumentar a eficácia do tratamento, como na utilização de nanopartículas lipossomais contendo Sb, por exemplo (Frezard et al, 2009). Alving e Swartz, 1984 demonstraram que o antimônio encapsulado em lipossomos foi cerca de 700 vezes mais ativo do que não encapsulado. O estibogluconato encapsulado em lipossomos (tufisina) foi 200 vezes mais eficaz contra a infecção por *L. donovani* em hamsters do que o fármaco não



encapsulado, que foi eficaz apenas após 28 dias de tratamento (Agrawal e Grupta, 1999).

Apesar das vantagens anteriormente mencionadas, a utilização dos lipossomos apresenta alguns inconvenientes, tais como a captura pelo fígado das preparações lipossômicas, a eficiência limitada de encapsulação de Sb em vesículas e possíveis efeitos colaterais devido a componentes lipídicos específicos (Torchilin, 2005). Portanto, outras formulações têm sido investigadas para uso como novas terapias, incluindo complexos anfifílicos de Sb (V) e os CNFs, que foram designados para o tratamento da leishmaniose visceral, apresentando vantagens em comparação ao Glucantime (Fernandes et al, 2013).

Os resultados dos ensaios de MTT demonstraram que os CNFs não alteram a viabilidade celular dos macrófagos murinos. Além disso, a remobilização dos elementos constituintes dos CNFs (Mg, P, Cl, Ca, e eventualmente, Sb) não afetou a atividade metabólica dos macrófagos. Esta remobilização observada pelas técnicas de microscopia eletrônica e microanálise de raios-X sugerem a compartimentalização em ambientes com vesículas ácidas teoricamente preconizado por Corrêa Jr et al, 2009. Além disso, alguns resultados corroboram dados anteriores que mostraram que as nanopartículas de fosfato de cálcio com fases amorfas possuem capacidade reduzida de alterar a viabilidade celular (Ganesan et al, 2008; Paul e Sharma, 2012).

Quando o Glucantime foi testado utilizando a mais alta concentração (450 ng mL<sup>-1</sup>), concentração próxima ao IC<sub>50</sub> relatado por Tempone e colaboradores (2004), o percentual de células infectadas reduziu em todo o período de exposição a droga, de 10% em 24 horas até 60% em 72 horas. Resultados semelhantes foram obtidos para CNF0 em uma baixa concentração de 20 µg mL<sup>-1</sup>. CNF3 apresentou a melhor redução no percentual de células infectadas, variando de 40% em 24 horas a cerca de 80% em 72 horas. Estes resultados associados à elevada produção de iNOS determinada a partir de dados de fluorescência, sugerem que a presença de Sb em CNF3 aumentou a atividade leishmanicida da nanopartícula por mecanismo similar ao descrito para drogas antimoniais. O CNF5 reduziu a infecção principalmente em 72 horas e a redução nas taxas de 1-5, 6-10 e >10 se mantiveram constantes ao

longo do tempo de exposição. O CNFT reduziu intensamente a infecção nas primeiras 24 horas, principalmente nas taxas de 6-10 e >10 e esse comportamento se manteve constante ao longo do tempo, onde o número de macrófagos não infectados foi cerca de 60% em 24 horas provavelmente por alguma inibição metabólica como sugerido pela relativa baixa indução de iNOS frente ao CNF3.

Poucos estudos compararam a eficácia de nanocarreadores transportando ou não substâncias leishmanicidas na redução da infecção por leishmanias ao longo do tempo (Esmaeili et al, 2008; Borborema et al, 2011; Ramírez-Macias et al, 2012; Soflaei et al, 2012). O Glucantime não afetou significativamente as taxas de infecção por amastigotas após 24 horas e após 72 horas atingiu 50% apenas na maior concentração testada ( $450 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Além do aumento da eficácia de drogas nanocarreadas demonstrado anteriormente, deve-se considerar que a falta de toxicidade observada em CNF0, CNF5 e CNF3 destaca a segurança destes CNFs em futuros tratamentos.

CNF0, CNF3, CNF5 e CNFT, em todas as concentrações testadas, exibiram atividade leishmanicida contra amastigotas de *L. infantum* em 24, 48 e 72 horas. Estes resultados indicam que os efeitos dos CNFs não são associados apenas com a concentração de Sb, apesar da correlação dos níveis de Sb e o tratamento com o Glucantime ( $33,20$ ;  $99,75$  e  $299,25 \text{ ng mL}^{-1}$  de Sb V), CNF3 ( $14$ ;  $42$  e  $125 \text{ ng mL}^{-1}$  de Sb(V)), CNF5 ( $73$  ;  $219$  e  $652,04 \text{ ng mL}^{-1}$  de Sb V) e CNFT ( $155,61$ ;  $467,08$  e  $1.401 \text{ ng mL}^{-1}$  de Sb III). Estes dados sugerem que os íons solubilizados a partir das nanopartículas afetam o metabolismo celular tanto dos macrófagos quanto das amastigotas internalizadas por macrófagos. Os efeitos da concentração mais baixa de CNFs em geral ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram similar aos observados nas concentrações de  $60$  e  $180 \mu\text{g mL}^{-1}$  e um efeito dose-dependente foi observado apenas no CNF0 a 48 horas.

Considerando que o CNF0, que não possui Sb em sua composição, também mostrou um efeito contra *L. infantum*. Atenção particular deve ser dada também a função biológica de seus constituintes no interior dos macrófagos (P, Ca, Mg). O fósforo na forma de pirofosfato, ortofosfato ou polifosfato tem sido associado ao mecanismo de geração de energia celular e poderia estar

relacionado com a manutenção da viabilidade celular e nenhum efeito deletério foi relatado devido ao aumento da concentração intracelular desses compostos (Kornberg, 1962; Shintani et al, 1998; Young et al, 1998; Merckel et al, 2001; Ahn et al, 2001; Nelson e Cox, 2002; Rao et al, 2009).

A forma fosfática utilizada na síntese dos NPCs foi o pirofosfato, que em protozoários, é crucial a diversas atividades de manutenção do parasitismo, sobrevivência e diferenciação. Trabalhos destacam essencialmente a pirofosfatase de acidocalcissomas na virulência de *Trypanosoma brucei*; na sinalização de cAMP, sobrevivência e infectividade de *Leishmania donovanni*; incluindo as ecto-pirofosfatases caracterizadas em *Leishmania amazonensis*. (Lemercier et al 2003, Biswas et al 2015; Espiau 2006). Portanto a possibilidade de um desequilíbrio metabólico por saturação local e ou inibição via feedback nos parasitos não podem ser descartadas.

Similarmente, ao observado para os macrófagos da linhagem THP-1 (Wyllie e Fairlamb, 2006) o aumento da concentração de Sb (V) não afetou a viabilidade celular dos macrófagos murinos após a interação com os NPCs . O comportamento de Sb (V) é diferente do comportamento encontrado em Sb (III) e Ca. Vários efeitos colaterais e a toxicidade das drogas à base de Sb estão relacionados à concentração de Sb (III), que é altamente tóxico. Deve-se considerar que viabilidade de macrófagos THP-1 foi reduzida em 50% com uma concentração de Sb (III) de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Wyllie e Fairlamb, 2006).

A principal hipóteses aceita atualmente sobre o mecanismo de ação do Sb nos macrófagos infectados com amastigotas, considera que o Sb (V) atuaria como uma pró-droga sendo convertido a Sb (III) dentro de vacúolos intracelulares (vacúolos parasitóforos em macrófagos infectados). Sb (III) afetaria a atividade enzimática do parasita, o que levaria à redução da tripanotona e aumento da suscetibilidade ao óxido nítrico (NO) sintetizado a partir da L-arginina e  $\text{O}_2$  pela NO sintase. Esses eventos levariam a um desequilíbrio da membrana plasmática do parasita através da peroxidação e liberação de Ca dos estoques intracelulares, que frequentemente resulta em apoptose da amastigota (Goodwin e Page, 1943; Das et al, 2001; Ferreira et al, 2001; Frézard et al, 2001; Shaha, 2006; Dzamitika et al, 2006). A utilização de nanopartículas que liberam diretamente óxido nítrico para o tratamento de infecções bacterianas envolvendo *Pseudomonas aeruginos*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* também são descritas na literatura (Han et al, 2009; Hetrick et al, 2009; Hetrick et al, 2013).

Há também a possibilidade de que os mesmos mecanismos sejam induzidos após a internalização e a dissolução dos CNFs por macrófagos e que a introdução de Sb (V) *via* CNFs permitiria a liberação de Sb (V) em células que o parasita é internalizado. Além disso, diversos mecanismos dos macrófagos associados à eliminação do parasito dependem da liberação de  $Ca^{+2}$  de seus próprios estoques. Na fagocitose,  $Ca^{+2}$  intracelular é necessário para a captação de partículas, maturação do fagossomo, rearranjo do citoesqueleto, liberação intravacuolar de  $H^{+}$ , a ativação do complexo NADPH - oxidase e a geração de NO. Estes processos são iniciados pela ativação de fosfolipases do tipo C ou D por receptores Fc ou receptores do complemento através de canais operados pelo estoque de cálcio, que induzem a liberação de  $Ca^{+2}$ . (Stossel, 1973; Alexiewicz et al, 1995; Malik et al, 2001; Massry e Smogorzewski, 2001;Tejle et al, 2002; Nunes e Demaurex, 2010).



Promastigotas podem transitoriamente impedir a fusão dos fagossomos com lisossomos e, assim, atrasar ou inibir a maturação endossomal, como refletido pela expressão tardia de RAB7 e LMAP-1 (Scianimanico et al, 1999; Olivier et al, 2005). Além disso, lipofosfoglicanos de promastigotas de *Leishmania* inibem a maturação endossomal através da indução da acumulação da F-actina perifagossomal (Holm et al, 2001) e previne a acidificação dos fagossomos pela interferência da bomba V-ATPase, permitindo as promastigotas se diferenciarem em amastigotas resistentes (Vinet et al, 2009). Por outro lado, a remobilização de Ca induzida pelos CNFs poderia bloquear esses processos e agir como um adjuvante para a elevação de  $Ca^{+2}$  intracelular, suprimindo assim os mecanismos de evasão do parasito dependentes de  $Ca^{+2}$ . A elevação do cálcio dentro dos vacúolos poderia potencialmente aumentar a apoptose dos parasitos.

## VII. CONCLUSÃO

Neste estudo, sugerimos que os CNFs contendo fosfatos, cálcio, magnésio, com ou sem antimônio, são internalizados por macrófagos e liberam seletivamente seus constituintes. A internalização dos CNFs não influencia significativamente a viabilidade das células que apresentam altas concentrações de antimônio após a interação. Os constituintes iônicos dos CNFs liberados dentro dos macrófagos participam ativamente na resolução dos processos parasitários que ocorrem dentro de macrófagos murinos infectados com *L. Infantum*, utilizados neste estudo.

## VIII. ANEXOS

## A) Depósito de patente: BR 10 2012032493 8

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL 19/12/2012 014120002969 16:13 DEMG  BR 10 2012 032493 8 Espaço reservado ao protocolo	< Uso exclusivo do INPI >     Espaço para etiqueta
---	---

### DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais  
 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa  
 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104  
 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil  
 1.5 CEP: 31270-901                      1.6 Telefone: (31) 3409-4774                      1.7 Fax: (31) 3409-6430  
 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

 continua em folha anexa

**2. Natureza:**     Invenção                       Modelo de Utilidade                       Certificado de Adição

 Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**
**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

SÍNTESE DE COMPÓSITOS NANOESTRUTURADOS AMORFOS FOSFATADOS E USO

 continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº \_\_\_\_\_ Data de Depósito: \_\_\_\_\_

**5. Prioridade:**                       interna                       unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: JOSÉ DIAS CORREA JÚNIOR  
 6.2 Qualificação: PROFESSOR UNIVERSITÁRIO                      6.3 CPF: 003.485.787-76  
 6.4 Endereço completo: RUA JESUS MACHADO GONTIJO, 57, APTO. 301, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG  
 6.5 CEP: 31340-010                      6.6 Telefone: 31 3409-4774                      6.7 Fax: 31 3409-6430  
 6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

 continua em folha anexa


## B) Depósito de patente: BR 10 2013032731 0

< Uso exclusivo do INPI >

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PROFESSOR ZENIL  
19/12/2013 114130002523  
C-47 DEMG  
BR 10 2013 032731 0

Espaço reservado para o protocolo      Espaço reservado para a etiqueta      Espaço reservado para o código QR



**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:
	Título do Documento:		Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2
			Procedimento:	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais  
1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa  
1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104  
1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil  
1.5 CEP: 31270-901  
1.6 Telefone: (31) 3409-4774      1.7 Fax: (31) 3409-6430  
1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:**  Invenção       Modelo de Utilidade       Certificado de Adição

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS FOSFATADOS BIOCMPATÍVEIS, PRODUTOS E USO

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº      Data de Depósito:

- 5. Prioridade:**  Interna (66)       Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito
Brasil	102012032493-8	19/12/2012

continua em folha anexa



*Handwritten signature*





**D) Protocolo CEUA 132/2012****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 131 / 2012, relativo ao projeto intitulado "ROS e NO EXPRESSAS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS COM Leishmania infantum APÓS APLICAÇÃO DE ANTIMONIAIS CONVENCIONAIS E NANOCARREADOS.", que tem como responsável JOSE DIAS CORREA JR, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 01/10/2013. Este certificado espira-se em 01/10/2018.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 131 / 2012, related to the Project entitled "ROS and NO level expression in macrophages infected with L. infantum after application of conventional and nanostructured Sb composites.", under the supervision of JOSE DIAS CORREA JR, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 01/10/2013. This certificate expires in 01/10/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 01/10/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: [\(31\) 3499-4516](tel:(31)3499-4516) – Fax: [\(31\) 3499-4592](tel:(31)3499-4592)  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 9250

## Nanoparticle phosphate-based composites as vehicles for antimony delivery to macrophages: possible use in leishmaniasis†

Betânia Mara Alvarenga,<sup>a</sup> Maria Norma Melo,<sup>b</sup> Frédéric Frézard,<sup>c</sup> Cynthia Demicheli,<sup>d</sup> Juliana Moreira Mendonça Gomes,<sup>a</sup> José Bento Borba da Silva,<sup>d</sup> Nivaldo Lucio Spezial<sup>e</sup> and José Dias Corrêa Junior<sup>\*a</sup>

Pentavalent antimonial drugs such as *N*-methylglucamine antimonate (Glucantime<sup>®</sup>) are used for treating leishmaniasis but produce severe side effects, including cardiotoxicity and hepatotoxicity. We characterized the physicochemical properties of 3 nanoparticle phosphate-based composites (NPCs; NPC0, NPC3, and NPC5) as Sb(v) carriers for specifically targeting macrophages and reducing systemic side effects. NPCs were synthesized in liquid media and sterilized at 25 kGy before use. Macrophage viability and NPC toxicity, independent of Sb uptake, were evaluated to assess NPC safety in visceral leishmaniasis treatment. NPC zeta potential, conductivity, diameter, Sb content, and crystallinity were determined using electrophoretic light scattering, scanning electron microscopy (SEM), conductance, graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), and X-ray diffraction, respectively. *In vitro* NPC cytotoxicity against murine peritoneal macrophages was evaluated using MTT assays, and Sb amounts internalized by macrophages were determined using GFAAS. The rate of macrophage infection caused by *Leishmania infantum* was assayed *in vitro*, by using Glucantime<sup>®</sup> as a reference drug. NPCs featured negative zeta potentials (−15.5 to −19.5 mV), mean diameters around 180 nm, and a low dissolution constant in Milli-Q water (<0.0197 mS cm<sup>−1</sup>), and were prepared using 0.0 (NPC0) to 36.2 μg mL<sup>−1</sup> Sb (NPC5). NPC5 exhibited characteristic crystalline peaks resembling mopungite, but other NPCs exhibited predominantly amorphous structures. Cell viability was not markedly affected at any NPC concentration tested. Light microscopy, SEM, and GFAAS data revealed NPC internalization and intracellular Sb retention. Amastigote infection was reduced by both Sb-containing NPC3 and Sb-lacking NPC0, but NPC3 was more effective. These data indicate the potential of NPCs as Sb nanocarriers for specifically targeting macrophages and lowering Sb dosage without reducing leishmanicidal activity.

Received 25th February 2015,  
Accepted 27th October 2015

DOI: 10.1039/c5tb00376h

[www.rsc.org/MaterialsB](http://www.rsc.org/MaterialsB)

<sup>a</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail: [correajr@ufmg.br](mailto:correajr@ufmg.br)

<sup>b</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5tb00376h

## Introduction

Leishmaniasis, a disease caused by an intracellular parasite, is endemic in 98 countries in 5 continents. Leishmaniasis occurs in 4 forms: cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous, and visceral. Visceral leishmaniasis is one of the most severe forms of the disease, being lethal in most untreated cases, and is caused by *Leishmania infantum* or *Leishmania donovani*. The disease is characterized by irregular fever, weight loss, hepatomegaly, splenomegaly, lymphadenopathy, and anemia. In America, the main sand fly species involved in transmission is *Lutzomyia longipalpis*. Dogs, which represent the most important domestic reservoirs of the disease, are responsible for the maintenance of parasitism in endemic foci due to the presence of amastigotes in the skin.<sup>1,2</sup>

The conventional treatment used for all forms of leishmaniasis relies primarily on intramuscular or intravenous administration of metal salts in the pentavalent form. *N*-Methylglucamine antimonate

(Glucantime<sup>®</sup>) is a drug of first choice due to its therapeutic efficacy.<sup>3–7</sup> The reduction of Sb(v) to Sb(III) is required for leishmanicidal activity, suggesting that Sb(v) is a pro-drug that becomes active and toxic after its reduction to Sb(III) in the body, which occurs inside phagolysosomes in macrophages.<sup>5–7</sup>

Although drugs containing Sb(v) remain the drug of choice in most cases of leishmaniasis, their hepatotoxicity, cardiotoxicity, and nephrotoxicity present serious obstacles in properly treating disease cases, and this can lead to treatment failure, interruption, or even discontinuation by the patient prior to the termination of chemotherapy.<sup>8–11</sup> Moreover, the medical care costs associated with the side effects of these chemotherapies are substantial and increase the overall economic burden. Therefore, current chemotherapies of leishmaniasis present several limitations.<sup>12</sup>

Nanostructured materials possess unique properties and capabilities that make them suitable for interaction with biological targets, particularly in drug-delivery applications.<sup>13,14</sup> As a drug-delivery vehicle, inorganic nanoparticles have received considerable attention due to their high cellular uptake, low toxicity, and low immune response; these nanoparticles are typically more hydrophilic, biocompatible, and stable as compared to organic materials.<sup>15–21</sup> Because of their several favorable characteristics, certain types of phosphate-based nanoparticles have been used in applications such as the delivery of DNA plasmids (pEGFP-N1, pUC19, pSV $\beta$ gal) into the HeLa cell line<sup>22</sup> and delivery of antibiotics such as vancomycin to prevent infections after knee arthroplasty,<sup>23</sup> and for use as a carrier in the oral administration and intestinal absorption of insulin in diabetic rats.<sup>21</sup> These diverse examples of applications reveal the potential for new therapeutic approaches.

In this study, we sought to synthesize nanoparticle phosphate-based composites (NPCs) containing Sb(v) and characterize their physicochemical properties, with a focus on their potential use in leishmaniasis therapy.

## Experimental

### Synthesis of nanoparticle phosphate-based composites

The complete synthesis of NPCs is presented in the patent filings BR 102012032493-8 and BR 102013032731-0, which are available at [www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br). NPCs were synthesized using a mixture of salt solutions in a controlled precipitation system. The NPCs were prepared in solutions consisting of 7–10 mmol of Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (Cromoline), 5 mmol of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Cromoline), 5 mmol of MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Synth), and 0–5 mmol of K<sub>2</sub>Sb(OH)<sub>6</sub> (Sigma) by using semipermeable membranes (Spectrum Medical Industries, Inc.). We prepared 3 types of NPCs: NPC0 (no Sb added in the formulation), NPC3 (1.5 mmol of Sb salt added), and NPC5 (2.5 mmol of Sb salt). After synthesis, each NPC suspension was centrifuged at 3500 rpm for 10 min, and the precipitate was washed thrice with absolute ethanol (Merck) and dried at 60 °C for 48 h. Lastly, aliquots of 0.1 g per vial of each NPC were placed in conical polypropylene microtubes and sterilized under 25 kGy gamma irradiation, at the Laboratório de Irradiação Gama – LIG, CDTN-UFGM. For all subsequent analyses, a stock solution containing 1 mg of NPCs was eluted in 100  $\mu$ L of liquid

(Milli-Q water, ethanol, or RPMI 1640 culture medium) immediately before use.

### Characterization techniques

Zeta potential and conductivity were measured (in mV and mS cm<sup>-1</sup>, respectively) using a zetasizer (Nano ZS90, Malvern Instruments, UK); 20  $\mu$ L of the NPC stock solution (1 mg diluted in 100  $\mu$ L of Milli-Q water) was added to 2 mL of Milli-Q water in a folded capillary cell. For electron microscopy analysis, one drop of the eluted stock solution of NPC (1 mg diluted in 100  $\mu$ L of ethanol) was placed on carbon coverslips (Thermanox<sup>®</sup>) and dried. Samples were mounted on a stub with adhesive double-layered carbon tape and carbon sputtered at 10<sup>-5</sup> mBar by using a Hitachi HUS4G. Electron micrographs (in the 50 000 $\times$  magnification range) were obtained with secondary electrons by using an FEG Quanta 200 (FEI). The NPC diameter distribution was determined using Image Pro Plus 4.0 and GraphPad Prism 5.0. The Sb content in NPCs was determined using graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS).<sup>28</sup> Aliquots of 0.1 g of each NPC (NPC0, NPC3, and NPC5) were diluted in 1 mL of 0.2% HNO<sub>3</sub> solution for measuring Sb by using a spectrometer equipped with a graphite furnace and an autosampler (AAAnalyst 600, Perkin Elmer). For determining the NPC crystallinity, we deposited 3 mg of each NPC on a silicon sample port and analyzed them by means of X-ray diffraction (XRD) on a Geigerflex-RIGAKU diffractometer featuring a Cu pump, with a 2 $\theta$  scan angle and a pitch of 0.1°, in an accumulation period of 1 h at room temperature. Data were collected using OriginPro 8 Sr0 v.80724 (B724) software. For all NPCs, XRD patterns containing the intensity distribution of the beam diffracted by the distinct crystal planes or amorphous patterns were obtained. To identify known crystal planes that were comparable to those obtained experimentally, the XRD patterns were compared with standard crystallographic data deposited in these electronic databases: Inorganic Crystal Structure Database <http://icsd.fizkarlsruhe.de.fisica.dotlib.com.br/search/basic.xhtml> and CRYSTMET [http://bdec.dotlib.com.br/go\\_global/index?direct=true&embed=false&app=crystmet](http://bdec.dotlib.com.br/go_global/index?direct=true&embed=false&app=crystmet).

### Biological assays

A commercial sample of meglumine antimoniate (Glucantime<sup>®</sup>) (5 mL vials at 300 mg mL<sup>-1</sup>; Batch 3680, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brazil) was obtained from the Brazilian Ministry of Health. BALB/c mice (female, 4–6 weeks old, 18–22 g) were obtained from Cebio, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil). Mice were provided *ad libitum* access to a standard diet and tap water. *L. infantum* promastigotes of the MHOM/BR/70/BH46 strain were cultured *in vitro* at 24  $\pm$  1 °C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained through serial subculturing performed every 48–72 h. To isolate peritoneal macrophages, BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with 2.5 mL of thioglycolate at 3%.<sup>24</sup> After 3 days, animals were sacrificed through cervical dislocation and 10 mL of cold, sterile unsupplemented RPMI medium was injected into the peritoneal cavity; the abdomen was then massaged to optimize the withdrawal of RPMI medium containing macrophages by using a syringe. The collected cells were centrifuged



at 3000 rpm for 15 min and then counted in a Neubauer chamber. This protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the UFMG (CETEA protocol number 131/2012).

#### Murine macrophage cytotoxicity assay

To assess *in vitro* cellular toxicity, NPCs containing or lacking Sb were incubated in RPMI 1640 medium together with  $5 \times 10^5$  murine macrophages in a 96-well microplate.<sup>25</sup> For each NPC, a stock solution (1 mg of NPC diluted in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ ) was prepared and diluted to various concentrations (1, 0.1, 0.01, 0.001, and 0.0001 mg mL<sup>-1</sup>) with RPMI 1640 complete medium. The Sb content ranged from 0.362 to 0.000  $\mu\text{g}$  per well. As a negative control, adherent macrophages were incubated in the presence of only RPMI 1640 complete medium. Triplicate cultures were incubated for 24 h at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After incubation, 10  $\mu\text{L}$  of a 5 mg mL<sup>-1</sup> MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (Sigma) was added to the wells (50  $\mu\text{g}$  per well), and the cells (in 96 wells) were maintained for 4 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The supernatants were then removed and 100  $\mu\text{L}$  of dimethyl sulfoxide was added to dissolve the formazan crystals generated in the wells. The plates were subsequently read using a spectrophotometer, at a wavelength of 570 nm.<sup>26–28</sup> To obtain the final optical density (OD) values, the OD of the wells containing only macrophages (negative control) was subtracted from the measured OD values.

#### Measurement of intracellular Sb in murine macrophages

The internalization of Sb into macrophages was examined using GFAAS.<sup>29</sup> Macrophages ( $5 \times 10^5$ ) in a final volume of 1 mL were maintained in 24-well plates at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The macrophages were allowed to adhere for 2 h and then 6  $\mu\text{L}$  of NPC3 and NPC5 stock solutions (0.1 g diluted in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ ) were added for either 24 or 48 h. After incubation, cells were washed thrice with RPMI 1640 medium to remove all free NPCs and Sb. Cells were allowed to recover and then digested in 65% HNO<sub>3</sub> (Merck) overnight, which was then diluted 100-fold in 0.2% HNO<sub>3</sub> for subsequent measurement of Sb by means of atomic absorption spectroscopy performed using a spectrometer equipped with a graphite furnace and an autosampler (AAAnalyst 600, Perkin Elmer). The rates of Sb internalization (R) at 24 and 48 h were calculated using this formula:  $R = \text{Sb (measured in } 5 \times 10^5 \text{ macrophages)}/\text{Sb (measured in the NPCs added per well)}$ .

#### Effect of NPC0, NPC3, and Glucantime on *L. infantum* infection

Twenty-four-well plates containing peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5$ ) adhered on glass coverslips were incubated overnight at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in the presence of promastigote ( $1 \times 10^7$ ) parasites during the stationary growth phase in order to allow infection. Wells were washed twice with the same media at room temperature to remove non-internalized parasites. The time at which the wells were washed was considered “time zero” of infection. Different volumes of stock solutions (1 mg diluted in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ ) of NPC0 (lacking Sb) or NPC3 (containing Sb) were added to cells at final concentrations of 20, 60, and 180  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup>,

which corresponded to Sb(v) concentrations of 13.9, 41.7, and 125.1 ng mL<sup>-1</sup> for NPC3, respectively. NPCs were incubated with cells for 24, 48, and 72 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Glucantime was tested at concentrations of 50, 150, and 450 ng mL<sup>-1</sup>, which corresponded to Sb(v) concentrations of 33.25, 99.75, and 299.25 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. The control infection rate for the assays was >90%. Drug and NPC activities were evaluated from Panótico-stained slides by counting at least 200 cells per treatment, and the rates of infected cells were assessed by calculating the percentage (%) of infected cells in all treatments.<sup>30,31</sup> Reduction in the percentage of infection by *L. infantum* and parasite residence within peritoneal macrophages were evaluated by counting the infected macrophages and the internalized parasites, respectively, after various incubation times. The number of internalized parasites was binned and also plotted according to a categorized infection rate—uninfected, 1–5, 6–10, or >10 amastigotes per macrophage—adapted from Gebre-Hiwot *et al.*<sup>30,31</sup>

#### NPC internalization

*Leishmania*-infected murine peritoneal macrophages were obtained using procedures described in preceding paragraphs. Macrophages were incubated with 20  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup> NPC0, NPC3, and NPC5 for 24 h, and then Panótico-stained and imaged using an Olympus BX 41 microscope equipped with an Olympus Q Color 3 digital camera and a 60 $\times$  objective lens and a 2.5 $\times$  projective lens. Images were calibrated using a 0.01 mm micrometer ruler (Olympus). For electron microscopy, *Leishmania*-infected murine peritoneal macrophages were cultured using the aforementioned procedures, and incubated with 60  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup> NPC3 on carbon coverslips (Thermanox<sup>®</sup>). After incubation, samples were fixed using 4% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 24 h. After post-fixation with 1% OsO<sub>4</sub>, the samples were rinsed with PBS and dehydrated using alcohol solutions. Samples were then mounted on stubs and carbon sputtered in an evaporator (Hitachi Model HUS4G) and analyzed with secondary and back-scattered electrons by using a Quanta FEG 3D FEI electron microscope.

## Results and discussion

The zeta potential and conductivity measured for each NPC are presented in Table 1. Negative zeta potentials were measured for the NPCs and ranged from –15.5 mV for NPC5 to –19.5 mV for NPC0. Conductivity values were close to 0.01 mS cm<sup>-1</sup>.

Electron microscopy analysis revealed that the NPCs were spherical (Fig. 1). The average diameter of NPCs and the diameter range of 95% of the nanoparticles were respectively the following: NPC0, 183.2 and 173.1–193.3 nm; NPC3, 193.5 and 185.2–201.8 nm; and NPC5, 172.8 and 166–179.6 nm.

Table 1 Zeta potential and conductivity of NPCs

NPC	Zeta potential (mV)	Conductivity (mS cm <sup>-1</sup> )
NPC0	–19.5	0.00842
NPC3	–17.8	0.0136
NPC5	–15.5	0.0197

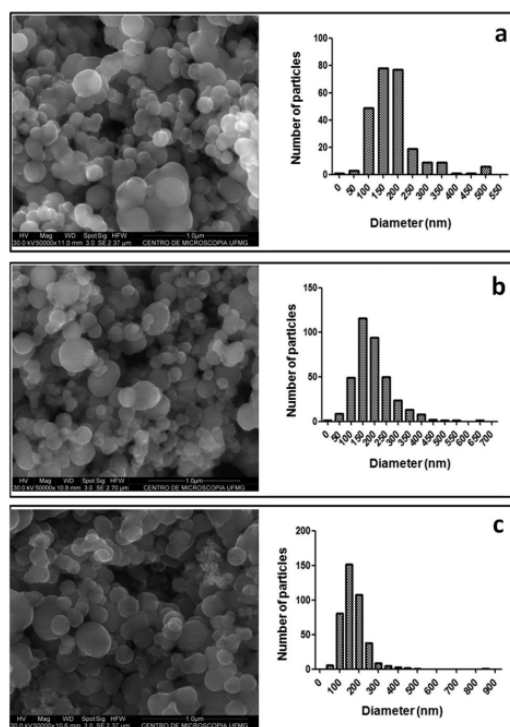


Fig. 1 Scanning electron micrographs, obtained with secondary electrons, of NPC0 (a), NPC3 (b), and NPC5 (c) and the respective diameter distribution graphs.

These data show a close diameter distribution among the synthesized NPCs.

Antimony levels were higher in NPC5 nanoparticles ( $36.24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) than in NPC3 nanoparticles ( $6.95 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Sb levels in NPC0 particles, which were prepared without the addition of antimony, were below the limit of quantification ( $0.063 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). The XRD patterns of the NPCs (Fig. 2) revealed

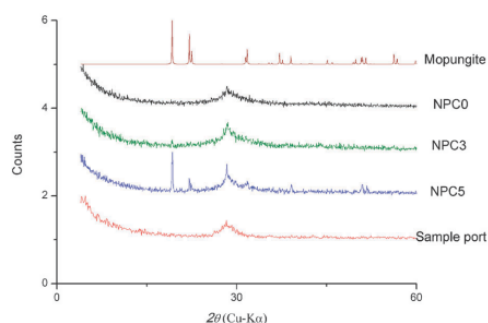


Fig. 2 XRD patterns of NPCs and mopungite. The amorphous pattern observed in the sample holder, NPC0, and NPC3 is distinct from the crystalline profile in mopungite and the mixed profile in NPC5.

a single broad peak present at  $2\theta = 28.3^\circ$  for all synthesized nanoparticles, similar to the gate silicon samples, indicating a predominantly amorphous pattern. However, NPC5 also exhibited crystalline peaks (19.1 and  $22.1^\circ$ ), and this profile was similar to the crystalline profile obtained for mopungite ( $\text{NaSb}(\text{OH})_6$ ).

The diameter distribution of a nanoparticle is one of its most critical features because it can determine the distribution of nanoparticles *in vivo*, biological fate, toxicity, targeting capacity, drug entrapment, release, and stability. A review article previously noted that nanoparticles featuring a zeta potential near ( $\pm$ )30 mV remain in suspension, where the charged surface is responsible for particle dispersion and is favorable for *in vitro* and *in vivo* assays.<sup>32</sup> Studies on functionalized and non-functionalized calcium phosphate nanoparticles have reported diameters and zeta potentials ranging from 40 to 200 nm and  $-11$  to  $-28$  mV,<sup>21</sup> respectively, which are similar to those in our study. These values are also similar to values reported for calcium phosphate nanoparticles containing porphyrin (250 nm and  $+1.2$  and  $-18$  mV<sup>32</sup> and 100–250 nm and  $+12$  to  $-24$  mV<sup>33</sup>). These data suggest that NPCs can be consistently synthesized.

Nanoparticles featuring a diameter of 100–300 nm were shown to be effective in cellular uptake studies, and the zeta potential of the nanoparticles varied according to their functionalization.<sup>34</sup> Other studies have also reported that the uptake of nanoparticles by NIH3T3 fibroblasts occurred after only a few hours of exposure, and that porphyrin was released in the cytoplasm after dissolution of the nanoparticles, with no adverse effects being detected.<sup>35</sup> The analysis of the diameter distribution of NPC0, NPC3, and NPC5 indicated that 95% of the nanoparticles featured diameters of approximately 180 nm, and the data presented herein also suggest the dissolution of these nanoparticles. The conductivity values of NPCs near  $0.01 \text{ mS cm}^{-1}$  support their structural stability in liquid medium. The results showed a slight mobilization of the constituent elements of the NPCs. In XRD analysis, all NPCs showed an amorphous profile, except for NPC5. Amorphous minerals are highly soluble and can incorporate diverse organic and inorganic substances and mobilize their mineral ions.<sup>36,37</sup> To test the cytotoxic effect of NPCs on murine macrophages, the viability of the cells at distinct NPC concentrations was measured (Fig. 3). Cell viability was not affected in a statistically significant manner by any NPC at any concentration tested. Although the toxicity of nanoparticles could be lower than that of current chemotherapeutic agents, only a few studies have investigated inorganic nanoparticles as chemotherapeutic agents for leishmaniasis. Antimony sulfide ( $\text{Sb}_2\text{S}_3$ ) nanoparticles have been demonstrated to exhibit low toxicity toward uninfected macrophages and leishmanicidal activity against intracellular *L. infantum*.<sup>38</sup> Studies on selenium nanoparticles in macrophage cultures infected by *L. infantum* have demonstrated a reduction in the proliferation of promastigotes and amastigotes at 72 h, and an  $\text{IC}_{50}$  of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  in uninfected macrophages.<sup>39</sup> *In vitro* studies have been conducted on the anti-proliferative activity of 7 ternary Ni(II) complexes featuring a triazolopyrimidine derivative and different aliphatic or aromatic amines as auxiliary ligands against promastigote and

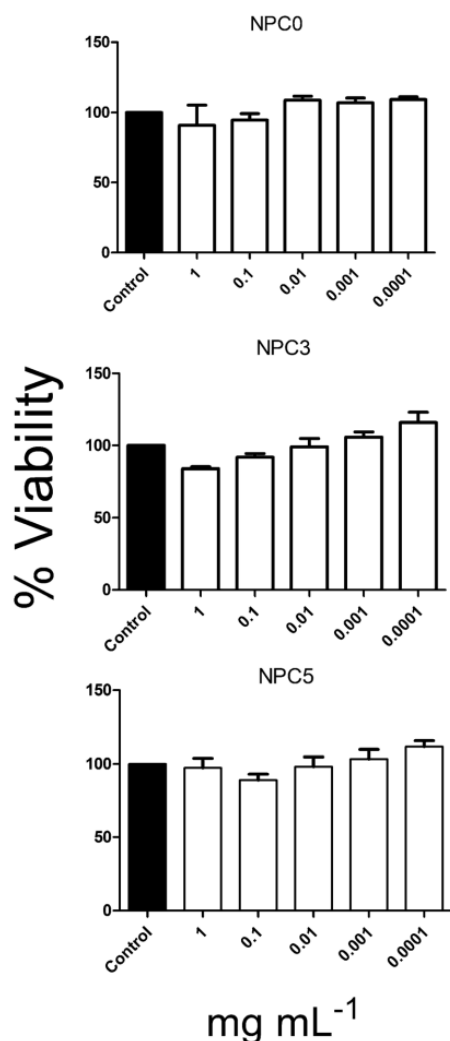


Fig. 3 Cell viability after incubation with NPC0, NPC3, and NPC5. None of the nanoparticles exhibited significant toxicity toward murine macrophages (two-way ANOVA,  $p < 0.05$ ).

amastigote forms of *L. infantum* and *Leishmania braziliensis*; the results showed that these complexes are not toxic to J774.2 macrophages<sup>40</sup> despite the general toxicity of Ni.<sup>41</sup> Other studies investigated the activity of TiO<sub>2</sub>@Ag nanoparticles (TiAg-NPs) against *L. infantum* and *L. tropica* in the presence of visible and non-visible light; these nanoparticles reduced the survival of *L. infantum* amastigotes inside macrophages in a concentration-dependent manner under both visible and non-visible light, although stronger effects were observed under visible light. Exposure to a low concentration (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of TiAg-NPs under non-visible light showed no effect on amastigotes, similar to the control; however, at the same concentration but under visible

Table 2 Antimony amounts ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) added to cultures at time 0 h and obtained from  $5 \times 10^5$  murine peritoneal macrophages after incubation with NPC0, NPC3, NPC5, and controls for 24 and 48 h. The total amounts of Sb added to cultures and the rates of Sb internalization into macrophages after incubation for 24 and 48 h are presented

Treatment	0 h Sb added	24 h	48 h	Rate of Sb internalization, 24 h	Rate of Sb internalization, 48 h
Control	nd	33.5 <sup>a</sup>	30.7 <sup>a</sup>	nd	nd
NPC0	37.8 <sup>a</sup>	nd	28.7 <sup>a</sup>	nd	nd
NPC3	4168 <sup>c</sup>	919.9 <sup>b</sup>	750.1 <sup>b</sup>	0.22	0.18
NPC5	21 745 <sup>d</sup>	3596.0 <sup>c</sup>	1912.0 <sup>b</sup>	0.16	0.09

"nd": not determined; superscripts a, b, c, and d: significant differences between points in the same category, two-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test with  $-\log(y)$  transformed data,  $p < 0.05$ . Mean values are presented.

light, TiAg-NPs inhibited amastigotes of *L. infantum* 3–5 times more effectively.<sup>42</sup>

Table 2 shows the quantification of Sb in macrophages exposed to NPC0, NPC3, and NPC5 for 24 or 48 h and the respective Sb content increase relative to the control. All macrophages exposed to NPCs containing Sb showed a high cellular uptake of Sb, the highest levels being obtained with NPC5. After treatment for 48 h with NPC0, cellular levels of Sb were below the quantification limit, similar to the Sb levels in controls. After 24 h, Sb levels in macrophages treated with NPC3 were lower than those in cells treated with NPC5. However, after 48 h, the cellular Sb levels did not differ significantly in macrophages treated with NPC3 and NPC5.

Macrophages incubated with NPC5 exhibited a 47% reduction in cellular Sb concentrations between 24 and 48 h; by contrast, Sb concentrations decreased by only 19% over this period in macrophages treated with NPC3. The uptake of Sb by macrophages was observed within the first 24 h of interaction and this was followed by a reduction in the cellular Sb level over time, and the results suggested distinct elimination rates for the NPCs tested. The concentration of Sb in macrophages ranged from 3596  $\mu\text{g L}^{-1}$  (NPC5, 24 h) to 750  $\mu\text{g L}^{-1}$  (NPC3, 48 h). NPC5 promoted a higher uptake of Sb at 24 h than the other nanoparticles did likely because the input concentration of Sb was 5 times higher, although Sb was also lost from the macrophages more rapidly by 48 h. The intracellular Sb level over time was more stable with NPC3 than with NPC5: the values varied within 20% of the input Sb concentration. These data suggest that distinct NPCs affect the intracellular Sb content differently. In several previous studies, Sb(III) levels after Glucantime exposure have been measured using different techniques,<sup>43–50</sup> but few studies have measured Sb(III) and Sb(V) levels in macrophages. Previous studies have quantified Sb(III) and Sb(V) levels in promastigotes and amastigotes of *L. mexicana pifanoi* by using absorption spectroscopy with electrothermal atomization.<sup>29</sup> This assay was also used here to characterize Sb(III) and Sb(V) influx and efflux kinetics. Influx rates were determined at antimony concentrations that produced a 50% inhibition of growth (IC50). The influx rates of Sb(V) into amastigotes and promastigotes were 4.8 and 12 pg per million cells per h, respectively, at an Sb concentration of 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The influx rate of Sb(III) into



amastigotes was 41 pg per million cells per h at an Sb concentration of 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The influx of Sb(III) into promastigotes at an Sb concentration of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was rapid and reached a plateau of 175 pg per million cells in 2 h. The efflux of Sb(III) and Sb(V) from amastigotes and promastigotes exhibited biphasic kinetics: the initial ( $\alpha$ ) half-lives of Sb(V) and Sb(III) efflux were < 4 min and 1–2 h, respectively, and the apparent terminal ( $\beta$ ) half-lives ranged from 7 to 14 h. The highest concentration of intracellular Sb previously reported, approximately 90  $\mu\text{g L}^{-1}$ , was measured in Mono Mac 6 human macrophages exposed to Sb(V) in the form of sodium stibogluconate (Pentostam).<sup>51</sup> By comparison, we observed considerably higher intracellular Sb concentrations in our work.

In macrophages exposed to Sb-containing NPCs, Sb retention could potentially occur in a manner similar to that previously described in the case of polysaccharide and potassium antimony tartrate Sb(III) or sodium stibogluconate Sb(V) in *Leishmania*-infected WR120 macrophage J774 cultures. After only 4 h, macrophages accumulated large amounts of Sb, which was retained intracellularly for at least 3 days, demonstrating a potential role of the cells as an Sb reservoir.<sup>52</sup> These cells are also commonly used as a target for testing potential therapeutics against leishmaniasis because of the role of cells as amastigote cleaners.<sup>53,54</sup> Nanoparticle-mediated targeting of Sb to macrophages could decrease the systemic side effects and also increase the efficacy of the treatment, and this has been demonstrated using several Sb-containing nanoparticles. Antimony encapsulated in liposomes was nearly 700 times more active than the non-encapsulated metalloid.<sup>55</sup> Moreover, sodium stibogluconate encapsulated in tuftsin-bearing liposomes was at least 200 times more effective against *L. donovani* infection in hamsters than the non-encapsulated drug, which was effective only after 28 days of treatment.<sup>56</sup>

Despite the aforementioned benefits, the use of liposomes presents drawbacks such as the capture of liposomal preparations primarily by the liver, the limited efficiency of Sb encapsulation in vesicles, and possible side effects due to specific lipid components.<sup>57</sup> Therefore, other formulations have been investigated as promising alternatives for use as novel therapeutics. These formulations include amphiphilic complexes of Sb(V) and NPCs, which were designed for treating visceral leishmaniasis which have advantages compared to Glucantime.<sup>58</sup>

The results of MTT assays demonstrated that NPCs do not affect the viability of murine macrophages; moreover, the remobilization of the constituent elements present on the NPC structure (Mg, P, Cl, Ca, and eventually Sb) did not demonstrably affect the metabolic activity of macrophages. These data confirm previous reports of calcium phosphate nanoparticles being compatible with the maintenance of cell viability.<sup>21,34,36</sup>

When Glucantime was used at the highest tested dose (450  $\text{ng mL}^{-1}$ ), which is close to the IC<sub>50</sub> reported by Tempone *et al.*,<sup>28</sup> the percentage of infected cells decreased over the experimental period, from 10% at 24 h to nearly 60% after 72 h (Fig. 4). Similar results were obtained with NPC0 at a low concentration of 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . NPC3 also reduced the percentage of infected cells, which ranged from 40% at 24 h to nearly 80% after 72 h. These results suggest that the presence of Sb in

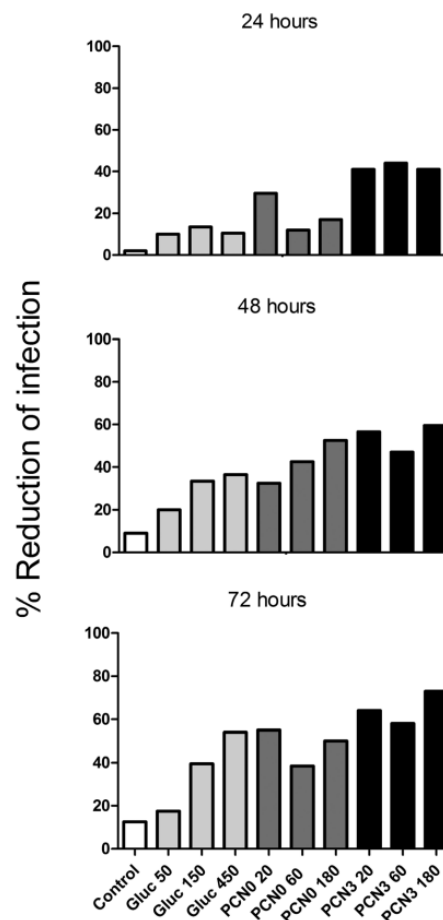


Fig. 4 Reduction of infection (%) at 24, 48, and 72 h after exposure to Glucantime (50, 150, and 450  $\text{ng mL}^{-1}$ ) and NPC0 and NPC3 (20, 60, and 180  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

NPC3 enhanced the leishmanicidal activity of the nanoparticles. Moreover, the effects of NPC treatment were stronger at earlier exposure times.

Few studies have compared the efficacy of nanocarriers carrying or not carrying leishmanicidal substances in reducing infections over time. In addition to the increased efficacy of nanocarried drugs demonstrated previously, the lack of toxicity observed with NPC0 and NPC3 highlights the safety of these treatments.<sup>39,40,59,60</sup> Glucantime did not significantly affect amastigote infection rates after 24 h (Fig. 5). However, after 48 h, the percentages of cells containing 6–10 and > 10 amastigotes were reduced at all concentrations and the percentage of uninfected macrophages increased in a dose-dependent manner, reaching 40% at the highest concentration tested (450  $\text{ng mL}^{-1}$ ). After 72 h, the percentage of cells containing 6–10 amastigotes was reduced and the percentage of uninfected macrophages was

increased in a dose-dependent manner and reached 50% at the highest concentration tested ( $450 \text{ ng mL}^{-1}$ ). As shown in Fig. 5, NPC0 treatment for 24 h of macrophages infected by *L. infantum* reduced the percentage of macrophages containing >10 amastigotes and increased the percentage of uninfected macrophages. After 48 h, the percentage of macrophages containing 6–10 or >10 amastigotes was reduced, and the percentage of uninfected macrophages was increased to ~60%. Similar results were observed after 72 h. NPC3 treatment reduced the percentage of macrophages containing 6–10 and >10 amastigotes and increased the percentage of uninfected macrophages, which was ~40% at the lowest concentration ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) after 24 h (Fig. 5). After 48 h, the percentages of macrophages containing 1–5, 6–10, and >10 amastigotes were reduced and the percentage of uninfected macrophages was increased to ~55% at the lowest concentration ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). After 72 h, the percentage of macrophages containing 1–5, 6–10, and >10 amastigotes was reduced (at 60 and  $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and the percentage of uninfected macrophages was increased to ~70% at the highest concentration tested ( $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

NPC0 and NPC3, at all concentrations tested, exhibited leishmanicidal activity against *L. infantum* amastigotes at 24, 48, and 72 h. These results indicate that the effects of NPCs are

not associated only with the Sb content, despite a correlation between Sb levels and the treatments with Glucantime (Sb: 33.20, 99.75, and  $299.25 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and NPC3 (Sb: 14, 42, and  $125 \text{ ng mL}^{-1}$ ). These data suggest that solubilized ions from NPCs can affect the cellular metabolism of both host cells and amastigotes. The effects at a low NPC3 concentration ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were similar to those observed at 60 and  $180 \mu\text{g mL}^{-1}$ , and dose-dependent effects were only observed after 24 h.

These data suggest that because of Sb retention, the low dose can produce a similar effect to the higher doses. By using light microscopy, we were able to identify infected murine macrophages that contained internalized *L. infantum* amastigotes. No morphological changes relative to control were observed in these cells as a result of Glucantime or NPC treatment (Fig. 6).

NPC3 internalization by macrophages was confirmed using SEM-associated techniques (Fig. 7 and Fig. S1–S5, ESI†). By using secondary electrons, we could clearly observe a macrophage membrane covering the spherical nanostructures. Nanostructures were present at all time-points analyzed and preferentially localized to the distal portion of macrophages. Structures resembling spherical NPCs were rarely observed outside the macrophages, which reflected the active internalization of nanoparticles. Electron micrographs acquired using

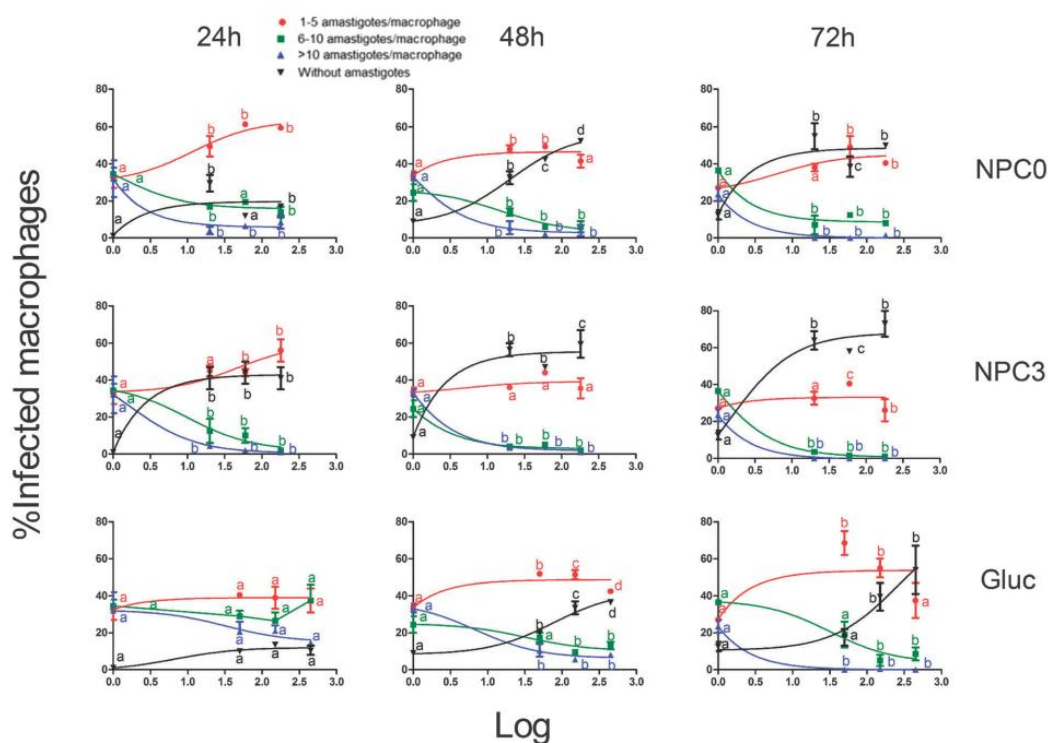


Fig. 5 Rates of macrophage infection by *L. infantum* amastigotes as a function of the concentrations of NPC0 and NPC3 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and Glucantime ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) after incubation for 24, 48, and 72 h. The labels a, b, c, and d indicate significant differences between points in the same category; two-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test,  $p < 0.05$ .



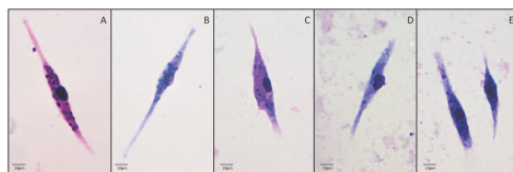


Fig. 6 Light microscopy images of macrophages infected with *L. infantum* after incubation for 24 h. Amastigotes appear as basophilic dots in the cytoplasm of these Panótic-stained macrophages. Control (A), Glucantime at  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  (B), and NPC0 (C), NPC3 (D), and NPC5 (E) at  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

backscattered electrons confirmed the intracellular distribution of NPCs.

NPC0, whose composition did not include Sb, likely showed an effect against *L. infantum* due to the release of its ionic constituents inside macrophages. Phosphorous in the form of pyrophosphates, orthophosphates, or polyphosphates has been associated with cellular power generation mechanisms and could be related to the maintenance of cell viability, and no deleterious effects have been reported due to an increase in the intracellular concentration of these compounds.<sup>61–67</sup> Similarly, increasing the concentration of Sb(v) does not appear to affect macrophages, as observed in THP-1-lineage macrophages.<sup>68</sup> This behavior of Sb(v) differs from the behavior of both intracellular Sb(III) and Ca. Several side effects and the toxicity of Sb-based drugs are related to the concentration of Sb(III), which is highly toxic. The viability of THP-1 macrophages is reduced to 50% at an Sb(III) concentration of  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>68</sup> Currently, Sb(v) is hypothesized to act as a pro-drug, which is converted to Sb(III) inside acidic intracellular vacuoles (parasitophorous vacuoles in infected cells) such as macrophages. Sb(III) affects the enzymatic activity of the parasite, and this leads to trypanothione depletion and susceptibility to macrophage nitric oxide (NO) which is synthesized from arginine and O<sub>2</sub> by NO synthase. These events lead to parasite membrane disruption through peroxidation and the release of intracellular Ca stores, which frequently result in apoptosis.<sup>7,69–74</sup> We cannot rule out the possibility that the same mechanisms are induced after the internalization and dissolution of NPCs by macrophages, given that the introduction of Sb(v) into NPCs allows the delivery of Sb(v) into cells in which the parasite is internalized. Moreover, several macrophage mechanisms associated with parasite elimination depend on Ca<sup>+2</sup> release from their own cellular stores. In phagocytosis, free intracellular Ca<sup>+2</sup> is required for the uptake of particles, phagosome maturation, cytoskeletal rearrangement, intravacuolar release of H<sup>+</sup>, NADPH oxidase complex activation, and the generation of NO (oxidative burst).<sup>75–80</sup> These processes are initiated by the activation of phospholipase C and/or D by Fc receptors and/or complement receptors through store-operated calcium entry channels, which induce Ca<sup>+2</sup> release.

Promastigotes can transiently prevent the fusion of phagosomes and lysosomes and thereby delay or inhibit endosomal maturation, as reflected by the late expression of Rab7 and

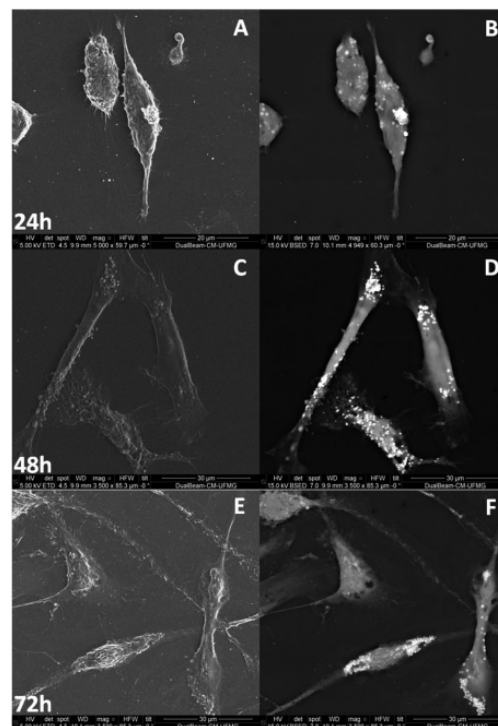


Fig. 7 Scanning electron micrographs of infected macrophages incubated with NPC3 ( $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); images were obtained after 24, 48, and 72 h of interaction. Typical secondary electron micrographs from the surface of macrophages are shown in A, C, and E. In electron micrographs acquired with backscattered electrons, NPCs appear as white dots inside macrophages (B, D, and F).

LAMP-1.<sup>81,82</sup> Furthermore, lipophosphoglycan from *Leishmania* promastigotes inhibits endosome maturation by inducing periphagosomal F-actin accumulation<sup>83</sup> and prevents the acidification of phagosomes by interfering with the V-ATPase pump, and this allows promastigotes to differentiate into resistant amastigotes.<sup>84</sup> Conversely, NPC-induced Ca remobilization could block these processes and act as an adjuvant to the elevation of intracellular Ca<sup>+2</sup>, and thus suppresses Ca-dependent evasion mechanisms. The elevation of Ca inside vacuoles could potentially increase the apoptosis of parasites.

## Conclusions

In this study we suggest that water-stable NPCs synthesized containing pyrophosphate, calcium, and magnesium with or without antimony become soluble after macrophage uptake. The ionic constituents of the NPCs released inside the macrophages probably participate in the resolution of the parasitic processes examined here that occur within murine macrophages infected by *L. infantum*.

## Acknowledgements

This study was partially funded by CAPES, CTTT-UFMG, FAPEMIG, and PRPq-UFMG (Brazilian Agencies for Science and Technology).

## References

- J. Alvar, I. D. Vélez, C. Bem, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, K. Jannin and M. de Boer, *PLoS One*, 2012, **7**, e35671.
- World Class Parasites, ed. J. J. Shaw, *Leishmania*, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2003.
- D. Sereno, M. Cavaleira, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouaisi and J. L. Lemesre, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, **42**, 3097.
- WHO-World Health Organization, Ethiopia, Addis Ababa, March, 22, 2007.
- N. Shakya, A. S. Sane, P. Vishwakarma and P. Bajpai, *Acta Trop.*, 2011, **119**, 193.
- L. H. Freitas-Junior, E. Chatelain, H. A. Kim and J. L. Siqueira-Neto, *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.*, 2012, **2**, 19.
- F. Frézard, C. Demicheli, C. S. Ferreira and M. A. P. Costa, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 913.
- P. Shaked-Mishan, N. Ulrich, M. Ephros and D. Zilberstein, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 3971.
- S. Wyllie, M. L. Cunningham and A. H. Fairlam, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 39925.
- C. Demicheli and F. Frézard, *Drug Des. Rev.*, 2005, **2**, 243.
- F. Frézard, D. A. Schettini, O. G. F. Rocha and C. Demicheli, *Quim. Nova*, 2005, **28**, 511.
- E. D. Franke, *Ann. Intern. Med.*, 1990, **113**, 934.
- M. Goldberg, R. Langer and X. Jia, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2007, **18**, 241.
- P. M. Mendes, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 9207.
- S. Chander and D. W. Fuerstenau, *Colloids Surf.*, 1982, **4**, 101.
- E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy and M. D. Wyatt, *Small*, 2005, **1**, 325.
- Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu and A. B. Yu, *Chem. Eng. Sci.*, 2006, **61**, 1027.
- A. H. Faraji and P. Wipf, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 2950.
- W. Gao, J. M. Chan and O. C. Farokhzad, *Mol. Pharmaceutics*, 2010, **7**, 1913.
- A. Tabakovic, M. Kester and J. H. Adair, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2012, **4**, 96.
- W. Paul and C. P. Sharma, *Process Biochem.*, 2012, **47**, 882.
- S. Bisht, G. Bhakta, S. Mitra and A. Maitra, *Int. J. Pharm.*, 2005, **288**, 157.
- S. Radin, J. T. Campbell, P. Ducheyne and J. M. Cuckler, *Biomaterials*, 1997, **18**, 777.
- S. Gordon, J. Todd and Z. A. Cohn, *J. Exp. Med.*, 1974, **5**, 1248.
- T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55.
- Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura and D. Schubert, *J. Neurochem.*, 1997, **69**, 593.
- A. Dutta, S. Bandyopadhyay and C. Mandal, *Parasitol. Int.*, 2005, **54**, 119.
- A. G. Tempone, D. Perez, S. Rath, A. L. Vilarinho, R. A. Mortara and H. F. Andrade, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2004, **54**, 60.
- W. L. Roberts and P. M. Rainey, *Anal. Biochem.*, 1993, **211**, 1.
- A. Gebre-Hiwot, G. Tadesse, S. L. Croft and D. Frommel, *Acta Trop.*, 1992, **51**, 245.
- C. Bogdan, H. Moll, W. Solbach and M. Rollinghoff, *Eur. J. Immunol.*, 1990, **20**, 1135.
- J. Kreuter, P. Ränge, V. E. Petrov, S. Hamm, S. E. Gelperina, B. Engelhardt, R. N. Alyautdin, H. von Briesen and D. Begley, *J. Pharma Res.*, 2003, **20**, 409.
- V. Sokolova, D. Koslova, T. Knuschke, J. Buer, A. Westendorf and M. Eplle, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 7527.
- S. Sortino, A. Mazzaglia, L. M. Scolaro, F. M. Merlo, V. Valveri and M. T. Sciortino, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4256.
- K. Ganesan, A. Kovtun, S. Neumann, R. Heuman and M. Eplle, *J. Mater. Chem.*, 2008, **31**, 3617.
- J. D. Corrêa Júnior, M. I. Bruno, S. Allodi and M. Farina, *J. Struct. Biol.*, 2008, **166**, 59.
- K. Simkiss, in *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, ed. S. Suga and H. Nakahara, Springer-Verlag, 1991, p. 382.
- S. Soflaei, A. Dalimi, F. Ghaffarifar, M. Shakibaie, A. R. Shahverdi and M. Shafierpour, *J. Parasitol. Res.*, 2012, DOI: 10.1155/2012/756568.
- S. Soflaei, A. Dalimi, A. Abdoli, M. Kamali, V. Nasiri, M. Shakibaie and M. Tat, *Comp. Clin. Pathol.*, 2012, DOI: 10.1007/s00580-012-1561-z.
- I. Ramírez-Macias, C. R. Maldonado, C. Marín, F. Olmo, R. Gutiérrez-Sánchez, M. J. Rosales, M. Quirós, J. M. Salas and M. Sánchez-Moreno, *J. Inorg. Chem.*, 2012, **112**, 1.
- ATSDR – Agency for toxic substances and disease registry, Nickel, 2005.
- A. Allahverdiyev, E. S. Abamor, M. Bagirova, S. Y. Baydar, S. C. Ates, F. Kaya, C. Kaya and M. Rafailovich, *Exp. Parasitol.*, 2013, **135**, 63.
- S. Rath, W. F. Jardim and J. G. Dorea, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1997, **4**, 548.
- E. M. D. Flores, E. P. dos Santos, J. S. Barin, R. Zanella, V. L. Dressler and C. F. Bittencourt, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 819.
- L. A. Trivelin, J. R. Rohwedder and S. Rath, *Talanta*, 2006, **68**, 1536.
- V. G. K. Almeida, M. F. Lima and R. J. Cassella, *Talanta*, 2007, **71**, 1047.
- L. M. Cabral, V. N. M. Juliano, L. R. S. Dias, C. B. Dornelas, C. R. Rodrigues, M. Villardi, H. C. Castro and T. C. Santos, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2008, **103**, 130.
- V. S. Santos, W. J. R. Santos, L. T. Kubota and C. R. T. Tarley, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **50**, 151.
- L. Lukaszczyk and W. Zyrnicki, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, **52**, 747.
- F. Seby, C. Gleyzes, O. Gross, B. Plau and O. F. X. Donard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 2939.
- C. Hansen, E. W. Hansen, H. R. Hansen, B. Gammelgaard and S. Sturup, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, **144**, 234.

- 52 W. L. Roberts, J. D. Berman and P. M. Rainey, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, **39**, 1234.
- 53 A. C. Cunningham, *Exp. Mol. Pathol.*, 2001, **72**, 132.
- 54 P. Mitropoulos, P. Konidas and M. Drukin-Konidas, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010, **63**, 2.
- 55 C. R. Alving and G. M. Swartz, in *Liposome Technology*, ed. G. Gregoriadis, CRC Press, Boca Raton, 1984, ch. 4, vol. II.
- 56 A. K. Agrawal and C. M. Gupta, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1999, **41**, 146.
- 57 V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2005, **4**, 160.
- 58 F. R. Fernandes, W. A. Ferreira, M. A. Campos, G. S. Ramos, K. C. Kato, G. G. Almeida, J. D. Corrêa Júnior, M. N. Melo, C. Demicheli and F. Frezard, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, **9**, 57.
- 59 S. E. T. Borborema, R. A. Schwendener, J. A. Osso Jr. and H. F. de Andrade Jr., *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011, **38**, 347.
- 60 J. Esmacili, M. Mohebbali, G. H. Edrissian, S. M. Rezayat, M. Ghazi-Khansai and S. Charehdar, *Acta Med. Iran.*, 2008, **43**, 196.
- 61 A. Kornberg, in *Horizons in Biochemistry*, ed. M. Kasha and B. Pullman, Academic Press, New York, 1962, p. 264.
- 62 T. Shintani, T. Uchiumi, T. Yonezawa, A. Salminen, A. A. Baykov, R. Lahti and A. Hachimori, *FEBS Lett.*, 1998, **439**, 263.
- 63 T. W. Young, N. J. Kuhn, A. Wadeson, S. Ward, D. Burges and G. D. Cooke, *Microbiology*, 1998, **144**, 2563.
- 64 M. C. Merckel, I. P. Fabrichniy, A. Salminen, N. Kalkkinen, A. A. Baykov, R. Lahti and A. Goldman, 2001, **9**, 289.
- 65 S. Ahn, A. J. Milner, K. Futterer, M. Konopka, M. Ilias, T. W. Young and S. A. White, *J. Mol. Biol.*, 2001, **313**, 797.
- 66 D. L. Nelson and M. M. Cox and M. M. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3rd edn, Mc Millan, Worth Publishers, 2002.
- 67 N. N. Rao, M. Gómez-Garcia and A. Kornberg, *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, **78**, 605.
- 68 S. Wyllie and A. H. Fairlamb, *Biochem. Pharmacol.*, 2006, **71**, 257.
- 69 L. G. Goodwin and J. E. Page, *Biochem. J.*, 1943, **37**, 198.
- 70 M. Das, S. B. Mukherjee and C. Shaha, *J. Cell Sci.*, 2001, **114**, 2461.
- 71 H. Zangger, J. C. Mottram and N. Fasel, *Cell Death Differ.*, 2002, **9**, 1126.
- 72 C. S. Ferreira, P. S. Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette and F. Frézard, *Biomaterials*, 2001, **16**, 441.
- 73 C. Shaha, *Indian J. Med. Res.*, 2006, **123**, 233.
- 74 S. A. Dzamitika, C. A. Falcão, F. B. de Oliveira, C. Marbeuf, A. Garnier-Suillerot, C. Demicheli, B. Rossi-Bergmann and F. Frézard, *Chem.-Biol. Interact.*, 2006, **160**, 217.
- 75 T. P. Stossel, *J. Cell Biol.*, 1973, **58**, 346.
- 76 J. M. Alexiewicz, D. Kumar, M. Smogorzewski, M. Klin and S. G. Massry, *Ann. Intern. Med.*, 1995, **123**, 919.
- 77 S. Massry and M. Smogorzewski, *Kidney Int. Suppl.*, 2001, **78**, 195.
- 78 K. Tejle, K. E. Magnusson and B. Rasmusson, *Biosci. Rep.*, 2002, **22**, 529.
- 79 Z. A. Malik, C. R. Thompson, S. Hashimi, B. Porter, S. S. Iyer and D. J. Kusner, *J. Immunol.*, 2001, **170**, 2811.
- 80 P. Nunes and N. Demaurex, *J. Leukocyte Biol.*, 2010, **88**, 22.
- 81 M. Olivier, D. J. Gregory and G. Forget, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, **18**, 293.
- 82 S. Scianimanico, M. Desrosiers, J. F. Dermine, S. Méresse, A. Descoteaux and M. Desjardins, *Cell. Microbiol.*, 1999, **1**, 32.
- 83 A. Holm, K. Tejle, K. E. Magnusson, A. Descoteaux and B. Rasmusson, *Cell. Microbiol.*, 2001, **3**, 439.
- 84 A. F. Vinet, M. Fukuda, S. J. Turco and A. Descoteaux, *PLoS Pathog.*, 2009, **5**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000628.

## IX. REFERÊNCIAS

Adair JH, Parette MP, Altinoglu EI, Kester M. Nanoparticulate alternatives for drug delivery. *ACS Nano*, 4:4967–4970. 2010.

Agrawal AK and Grupta CM. Adv. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Drug Delivery Rev.*, 1999, 41, 146.

Ahn S, Milner AJ, Futterer K, Konopka M, Ilias, M Young TW and S. A. White, J. *Mol. Biol.*, 2001, 313, 797.

Ali MA, Valian HK, Mohebbali M, Khamesipour A. Seroepidemiological Studies of Visceral Leishmaniasis in Iraq. *Sch. J. App. Med. Sci.*, 1(6):985-989. 2013.

Allahverdiyev A, Abamor ES, Bagirova M, Baydar SY, Ates SC, Kaya F, Kaya C and Rafailovich M. Investigation of antileishmanial activities of Tio<sub>2</sub>@Ag nanoparticles on biological properties of *L. tropica* and *L. infantum* parasites, *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 135, 2013.

Almeida VGK, Lima MF and Cassella RJ. Development of a reversed FIA system for the spectrophotometric determination of Sb(III) and total Sb in antileishmanial drugs. *Talanta*, 2007, 71, 1047.

Alvar J, Vélez ID, Bem C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin K and de Boer M, Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0035671, 2012.

Alving CR and Swartz GM. in *Liposome Technology*, ed. G. Gregoriadis, CRC Press, Boca Raton, 1984, ch. 4, vol. II.

Araújo-Santos T, Prates DB, Andrade BB, Nascimento DO, Clarêncio J, Entringer PF, Carneiro AB, Silva-Neto MA, Miranda JC, Brodskyn CI, Barral A, Bozza PT, Borges VM. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*. 2;4(11):e873, 2010.

Ashford, RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14:523–532; 1996.

ATSDR – Agency for toxic substances and disease registry, Nickel, 2005.

Babior, BM; Kipnes, RS; Curnutte, JT. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52:741–744; 1973.

Babior, BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109:33–44; 2000.

Baiocco P, Ilari A, Ceci P, Orsini S, Gramiccia M, Di Muccio T, Colotti G. Inhibitory effect of silver nanoparticles on Trypanothione Reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 2-230-233. 2011.

Ballou WR, McClain JB, Gordon DM, Shanks GD, Andujar J, Berman JD, Chulay JD. Safety and efficacy of high-dose sodium stibogluconate therapy of American cutaneous leishmaniasis. *Lancet*, 2, 13-16. 1987.

Barth BM, Sharma R, Altinoglu EI, Morgan TT, Shan-mugavelandy SS, Kaiser JM, McGovern C, Matters GL, Smith JP, Kester M, et al. Bioconjugation of calcium phosphosilicate composite nanoparticles for selective targeting of human breast and pancreatic cancers in vivo. *ACS Nano.* 4:1279–1287. 2010.

Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.*;11(4):340-4, 2008.

Baumgartner J, et al. Nucleation and growth of magnetite from solution. *Nature Materials* 12, 310–314, 2013.

Benchimol, M. et al. Functional expression of a vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 332, 695–702 (1998).

Berhe N, Wolday D. Hailu A et al. HIV viral load and response to antileishmanial chemotherapy in co-infected patients. *AIDS*, 13, 1921-1925. 1999

Berman, JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and therapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect. Dis* 24, 684-703. 1988.

Bisht S, Bhakta G, Mitra S, Maitra A. pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery. *Int J Pharm.* 288:157–168. 2005.

Biswas T<sup>1</sup>, Resto-Roldán E, Sawyer SK, Artsimovitch I, Tsodikov OV. A novel non-radioactive primase-pyrophosphatase activity assay and its application to the discovery of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* primase DnaG. *Nucleic Acids Res.* 1;41(4):e56. 2013.

Bogdan C, Moll CH, Solbach W and Rollinghoff M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur. J. Immunol.*, 20, 1135, 1990.

Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today*, v.15, p.22-28, 1999.

Borborema SET, Schwendener RA, Osso Jr. And de Andrade Jr. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania (Leishmania) major*-infected macrophages. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011, 38, 347.

Bowman, E. J., Siebers, A. & Altendorf, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 7972–7976 (1988).

Brittingham A. et al. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin, *Infect. Immun.* 67 (9) 4477 - 4484. 1999.

Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette MD. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 47 D 10 ] :3073 – 3079, 2003.

Cabral LM, Juliano VNM, Dias LRS, Dornelas CB, Rodrigues CR, Villardi M, Castro HC and Santos TC. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2008, 103, 130.

Chakraborty S, Bhar K, Saha S, Chakrabarti R, Pal A, and Siddhanta A. Novel Arsenic Nanoparticles Are More Effective and Less Toxic than As (III) to Inhibit Extracellular and Intracellular Proliferation of *Leishmania donovani*. J Parasitol Res. 187640. 2014.

Chander S, Fuerstenau DW. On the dissolution and interfacial properties of hydroxyapatite. Colloids Surf . 4:101–120. 1982.

Chang KP, Leishmania donovani: promastigote e macrophage surface interactions in vitro, Exp. Parasitol. 48 (2) 175 - 189. 1979.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol., 5(11):873-82, 2007.

Cheng X, Kuhn L. Chemotherapy drug delivery from calcium phosphate nanoparticles. Int J Nanomed 2:667–674, 2007.

Christopherson, J. B.; Lancet, 2, 325. 1918.

Chulay JD, Fleckenstein L, Smith DH. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 82, 68-72.1988.

Cioli, D; Pica-Mattocchia, L.; Archer, S.; Pharmac. Ther. 68, 35. 1995.

Convit J, Castellanos P, Ulrich M, Castes M, Rondon A, Pinardi ME, Rodriguez N, Bloom BR, Formica S, Valecillos L, Bretana A. Immunotherapy of localized, intermediate and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. Journal of Infectious Diseases, 160, 104-115.1989.

Corrêa JR, JD; Bruno, MI; Allodi, S; Farina, M. Effects of H<sup>+</sup> concentration on amorphous mineral granules: Structural stability and elemental mobilization. J. Struct. Biol., v.166, p.59-66, 2008.



Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 19 1:111 – 126. doi:10.1128/CMR.19.1.111-126. 2006.

Cunningham, AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp. Mol. Pathol. 72:132–141; 2002.

Da Silva RP, et al., CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages, J. Immunol. 143 (2) 617 - 622. 1989.

Das M, Mukherjee SB and Shaha CJ. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Cell Sci., 2001,114, 2461.

De Lacerda Junior, FS, Ferminiani H, et al. Comparative study of electrocardiographic changes determined by treatment with tri- and pentavalent antimony. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.7, n.4, Jul-Aug, p.210-7. 1965.

Delavari M, Dalimi A, Ghaffarifar F, and Sadraei J. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). Iran J Parasitol. 9(1): 6–13, 2014.

Delgado, J, Macias J, et al. High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. Am J Trop Med Hyg, v.61, n.5, Nov, p.766-9. 1999.

Demicheli C, Frezard F, Mangrum JB, Farrell NP. Interaction of trivalent antimony with a CCHC zinc finger domain: potential relevance to the mechanism of action of antimonial drugs. Chem Commun D Camb 39:4828 – 4830. doi:10.1039/b809186b. 2008.

Den Boer, Ahar J, Davidson RN, Ritmeijer K, Balasegaram M. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. Expert Opinions Emerging Drugs. 14(3): 395-410. 2009.



Denton H, McGregor JC, Coombs GH. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* 381 2:405 – 412. doi: 10.1042/BJ20040283. 2004.

Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: Epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 15. 2003.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27(5):305-18. 2004.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis world-wide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95, 239-243, 2001.

Docampo, R., Scott, D. A., Vercesi, A. E. & Moreno, S. N. J. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 310, 1005–1012 (1995).

Dorozhkin, SV. Amorphous calcium orthophosphates: nature, chemistry and biomedical applications. *International Journal of Materials and Chemistry*, 2(1):19:46. 2012.

Drexler, E. Engines of creation: the coming era of nanotechnology. Toronto: Anchor Books. 1986.

Duclos S, Desjardins M, Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens, *Cell Microbiol.* 2 (5) 365 e 377. 2000.

Durán, N et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*, London, v.3, n.8. 2005.

Durán, N, Azevedo, MMM. O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas. Instituto de Química, UNICAMP. 2003.

Dutta, A.; Bandyopadhyay, S.; Mandal, C.; Chatterjee, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

Dzamtika SA, Falcao SA, de Oliveira FB, Marbeuf C, Garnier-Suillerot A, Demicheli, C, Rossi-Bergmann and Frezard, Chem.-Biol. Interact., 2006, 160, 217.

Epple M, Ganesan K, Heumann R, Klesing J, Kovtun A, Neumann S, Sokolova V. Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. J Mater Chem 20:18–23, 2010.

Esmaeili J, Mohebbi M, Edrissian GH, Rezayat, SM, Ghazi-Khansai and Charehdar S. Evaluation of miltefosine against *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER): In vitro and In vivo studies. Acta Med. Iran., 2008, 43, 196.

Espiau B, Lemercier G, Ambit A, Bringaud F, Merlin G, Baltz T, Bakalara N. A soluble pyrophosphatase, a key enzyme for polyphosphate metabolism in *Leishmania*. J Biol Chem. 2006 Jan 20;281(3):1516-23.

Fairlamb AH, Cerami A D. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. Annu Rev Microbiol 46:695 – 729. doi:10.1146/annurev.mi.46.100192.003403. 1992.

Fairlamb, AH.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, BT.; Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science, 227, 1485 – 1487. 1985.

Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. Bioorg Med Chem. 17:2950–2962. 2009.

Faraut-Gambarelli, F, Piarroux R, Deniau M, Giusano B, Marty, G. Michel P, B. Fauge`re B, and Dumon H. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 41:827–830. 1997.

Fernandes FR, Ferreira WA, Campos MA, Ramos GS, Kato KC, Almeida GG, Corrêa Júnior, JD, Melo MN, Demicheli C and Frezard F, Amphiphilic Antimony(V) Complexes for Oral Treatment of Visceral Leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 9, 57.

Fernandes, MFM. Google, nanotecnologia e historiografia da ciência do tempo presente. *Rev Bras Cienc Tecnol Soc*; 2(1):99-108. 2011.

Ferreira C dos, S, Martins SPS, et al. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals*, v.16, n.3, Sep, p.441-6. 2003.

Feynman, Richard. There's plenty of room at the bottom. Pasadena: California Institute of Technology, 1960. Disponível em: <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>. Acesso em: 14 nov. 2014.

Flores EMD, dos Santos EP, Barin JS, Zanella R, Dressler VL, Bittencourt CF. Determination of antimony(III) and total antimony by hydride generation atomic absorption spectrometry in samples of injectable drugs used for leishmaniasis treatment. *J Anal At Spectrom* 17(8):819 – 823. 2002.

Franco MA, Barbosa AC, Rath S, Dorea JG. Antimony oxidation in antileishmanial drugs. *Am J Trop Med Hyg*, 52, 435-437. 1995.

Franke, ED, Wignall FS, et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*, v.113, n.12, Dec 15, p.934-40. 1990.

Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, 14(7):2317-36, 2009.

Frezard F, Salaun P. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405:5201 – 5214.

Frezard F, Silva H, Pimenta AM, Farrell N, Demicheli C. Greater binding affinity of trivalent antimony to a CCCH zinc finger domain compared to a CCHC domain of kinetoplastid proteins. *Metallomics* 4:433 – 440. doi:10.1039/c2mt00176d. 2012.

Frézard, F; Schettini, DA.; Rocha, OGF; Demicheli, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, v.28, n.3, p. 511-518, 2005.

Gabizon, AA; Shmeeda, H; Zalipsky, S. Pros and cons of the Liposome platform in câncer drug targeting. *Journal of Liposome Research*, vol.16, n.3, p.175-183, 2006.

Ganesan K, Kovtun A, Neumann S, Heuman R, Epfle M. Calcium phosphate nanoparticles colloiddally stabilized and made fluorescent by a phosphate-functionalized porphyrin. *Journal of Materials Chemistry*. 18 (31). 3617-3724. 2008.

Gao W, Chan JM, Farokhzad OC. pH-responsive nanoparticles for drug delivery. *Mol Pharm* 2010, 7:1913–1920.

García C., Paucar, C., Gaviria J., Duran, A. Effect of some physical-chemical variables in the synthesis hydroxyapatite by the precipitation route. *Key Engineering Materials*, 284, 47-50, 2005.

Garcia, C. R. et al. Acidic calcium pools in intraerythrocytic malaria parasites. *Eur. J. Cell Biol.* 76, 133–138 (1998).

Gebre-Hiwot A, Tadesse, Croft and D. Frommel, *Acta Trop.*, 1992, 51, 245.

Goodwin LG and Page. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *JE, Biochem. J.*, 1943, 37, 198.

Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 23-35, 2003.

Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279 30:31010 – 31017. doi:10.1074/jbc.M403959200. 2004.

Grimaldi Jr G, Tesh RB, Mc Mahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg* 41, 687-727.1989.

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, 6, 230-250, 1993.

Handman E, Bullen DV. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18(8):332-4, 2002

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 27(9):403-9, 2011.

Han C, Hu T, Wu D, Qu S, Zhou J, Ding J, Shen X, Qu D, Jiang H. X-ray crystallographic and enzymatic analyses of shikimate dehydrogenase from *Staphylococcus epidermidis*. *FEBS J.*;276(4):1125-39. 2009.

Hansen, Hansen EW, Hansen HR, B. Reduction of Sb(V) in a Human Macrophage Cell Line Measured by HPLC-ICP-MS Gammelgaard and S. Sturup, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 144, 234.

Henao, HH, Osorio Y, et al. Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application. *Biomedica*, v.24, n.4, 393-402. 2004.

Henderson, A e Jolliffe D. Cardiac effects of sodium stibogluconate. *Br J Clin Pharmacol*, v.19, n.1, Jan, p.73-7. 1985.

Hepburn, NC, Siddique I, et al. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate in leishmaniasis. *Lancet*, v.342, n.8865, Jul 24, p.238-9. 1993.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet* . 354: 1191-9. 1999.

Hetrick EM, Shin JH, Paul HS, Schoenfisch MH. Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. *Biomaterials.*;30(14):2782-9. 2009.

Heussler VT<sup>1</sup>, Küenzi P, Rottenberg S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol.* 31(11):1166-76. 2001.

Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol.* 3(7):439-47. 2001.

Horikawa MM, Peña MS. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. *Revista da Biologia*, 6b: 32-37. 2011.

Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, Houston, v.354, p.56-58. 1991.

Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Ciarlini PC, Marques FJ, Lima VFM, Perri SHV, Feitosa MM. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Res Vet Sci*, 83, 105-108. 2007.

Irigoin, F.; Cibils, L.; Comini, M. A.; Wilkinson, SR.; Floh L.; Radi, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radical Biol. Med.*, 45, 733 – 742. 2008.

Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat. Nanotechnol.* 3:145–50. 2008.

John Emsley. *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements.* [S.l.]: Oxford University Press, 2003. ISBN 978-0-19-850340-8

Jones, RAL. What has nanotechnology taught us about contemporary technoscience? In: Zülsdorf TB, Coenen C, Ferrari A, Fiedeler U, Milburn C, Wienroth M, editores. *Quantum engagements: social reflections of nanoscience and emerging technologies.* Amsterdam: IOS Press; 2011.

Killick-Kendrick R<sup>1</sup>, Rioux JA. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*. 44(1-2):67-71, 2002.

Kornberg A. *Horizons in Biochemistry*, ed. M. Kasha and B. Pullman, Academic Press, New York, 1962, p. 264.

Krauth-Siegel, RL.; Comini, MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1780, 1236 – 1248. 2008.

Kreuter J, Ramge P, Petrov VE, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, Alyautdin RN, von Briesen H, Begley D. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *J. Pharm. Res.* 20. 409. 2003.

Krogsgaard-Larsen, P; Liljefors, T; Madsen, U. *A textbook of drug design and development*. 2 ed. The Netherlands: Harwood Academic, 543p. 1996.

Kumar, MNVR. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci*, v.3, n.2, p.234-258. 2000.

Lawn SD, Yardley V, Watson J, Vega-Lopez, Lockwood DN. South American cutaneous leishmaniasis in returned travelers: treatment failures using intravenous sodium stibogluconate. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 97, 443-445, 2003.

Lemercier G, Espiau B, Ruiz FA, Vieira M, Luo S, Baltz T, Docampo R, Bakalara N. A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3420-5

Ley, V. et. al. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acid compartments. *J. Exp. Med.*, v.171, p. 401-413, 1990.

Li J, Chen YC, Tseng YC, Mozumdar S, Huang L. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. *J Control Release*. 142:416–421. 2010.

Liu, Y.; Peterson, DA.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, v. 69, n. 2, p. 593, 1997.

Lowenstam, HA., Weiner, S. On biomineralization. Oxford University Press, New York, USA. 324 pp. 1989.

Lowenstam, HA., Weiner, S. Transformation of amorphous calcium phosphate to crystalline dahillite in the radular teeth of chitons. *Science* 227, 51-53. 1985.

Lu, H.-G. et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* *J. Biol. Chem.* 272, 9464–9473 (1997).

Lubben et al. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials*, 687-694. 2001.

Lukaszczyk L and Zyrnicki W. Speciation analysis of Sb(III) and Sb(V) in antileishmaniotic drug using Dowex 1 x 4 resin from hydrochloric acid solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 52, 747.

Magill, A. Leishmaniasis. In: Strickland, G. (Ed.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*. Saunders, Philadelphia, pp. 665–688; 2000.

Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, Porter B, Iyer SS and Kusner DJ. *J. Immunol.*, 2001, 170, 2811.

Manzano JI, Garcia-Hernandez R, Castanys S, Gamarro F. A new ABC half-transporter in *Leishmania* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 8:3719 – 3730. doi:10.1128/AAC.00211-13. 2013.



Marchesini, N., Luo, S., Rodrigues, C. O., Moreno, S. N. J. & Docampo, R. Acidocalcisomes and a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in malaria parasites. *Biochem. J.* 347, 243–253 (2000).

Marsden PD. Pentavalent antimonials: Old drug for new diseases. *Rev Soc Bras Med Trop* 18, 187–198. 1985.

Masala, O; Mc Innes, E; O'brien, P. Modelling the formation of granules: the influence of manganese ions calcium pyrophosphate precipitates. *Inorganica Chimica Acta*, v.339, p.366-372, 2002.

Massry s and Smogorzewski M. *Kidney Int. Suppl.*, 2001, 78, 195.

Merckel MC, Fabrichniy IP, Salminen A, Kalkkinen N, Baykov AA, Lahti R and Goldman A. Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism. 2001, 9, 289.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª Edição. 5ª Reimpressão. Brasília, 2014.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New world cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol*, 63(2), 309-322, 2010.

Moreno, B. et al. Magic-angle spinning <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of condensed phosphates in parasitic protozoa: visualizing the invisible. *FEBS Lett.* 523, 207–212 (2002).

Moreno, S. N. J. & Zhong, L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Biochem. J.* 313, 655–659 (1996).

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

Motskin M, Wright D, Muller K, Kyle N, Gard T, Porter AE, Skepper JN. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials*, 30:3307–3317. 2009.

Mu Q, Jiang G, Chen L, Zhou H, Fourches D, Iropha A, Bing, Y. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chemical Reviews*, 2013.

Nelson DL, Cox MM and M. M. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3rd edn, Mc Millan, Worth Publishers, 2002.

Nott, JA; Nicolaidou, A. Transfer of metal detoxification along marine food chains. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v.60, p.905-912, 1990.

Nowack B, Krug HF, Height M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ Sci Technol*; 45(4): 1177-83. 2011.

Nunes P and Demaurex N. *J. Leukocyte Biol.*, 2010, 88, 22.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.*18(2):293-305, 2005.

Olliaro P, Darley S, Laxminarayan R, Sundar S. Cost-effectiveness projections of single and combination therapies for visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health*, 14, 918-925, 2009.

Oyane A, Kim H, Furuya T, Kobuko T, Miyazaki T, Nakamura T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *J Biomed Mater Res A*. 65A:188–195. 2003.

Paul, W.; Sharma CP. Synthesis and characterization of alginate coated zinc calcium phosphate nanoparticles for intestinal delivery of insulin. *Process Biochemistry*, 47: 882-886. 2012.

Pearson, RD et al., The immunobiology of leishmaniasis, *Rev. Infect. Dis.* 5 (5) 907 e 927. 1983.

Pink, R, Hudson, H Mouriès, Marie-Annick and Bendig, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews-Drug Discovery*, v.4, p.727-740, 2005.

Posner AS, Betts F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Acc Chem Res* 8:273-81. 1975.

Radin, S.; Campbell, JT.; Ducheyne, P.; Cuckler, JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials*, 18:777-782. 1997.

Ramírez-Macias I, Maldonado CR, Marín C, Olmo F, Gutiérrez-Sánchez, Rosales MJ, Quirós M, Salas JM and Sanchez-Moreno. In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *J. Inorg. Chem.*, 2012, 112,1.

Rao NN, Gomez-Garcia M and Kornberg A. *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, 78, 605.

Rath S, Jardim WF, Dórea JG. A simple spectrophotometric procedure for the determination of antimony (III) and (V) in antileishmanial drugs. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*.358, 4, 550. 1997.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 40(7):2352-6, 2002.

Rittig, MG, Bogdan, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views, *Parasitol. Today* 16 (7) 292 - 297. 2000.

Roberts WL, Berman JD and Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39, 1234.

Roberts, WL, Rainey, PM. Antimony quantification in *Leishmania* by electrothermal atomic absorption spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, v. 211, n. 1, p. 1-6, 15. mai. 1993.

Rodriguez NE, Gaur U, Wilson ME, Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages, *Cell Microbiol.* 8 (7) 1106 - 1120. 2006.

Rodríguez NE, Gaur Dixit U, Allen LA, Wilson ME. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. *PLoS One.* 28;6(4):e19000, 2011.

Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O. & Docampo, R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 276,26114–26121 (2001).

Sacks P, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.*,55:453-83, 2001.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol.* 3(11):1041-7, 2002.

Salaun P, Frezard F. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. *Anal Bioanal Chem* 405 D 15 ] :5201 – 5214. doi:10.1007/s00216-013-6947-5. 2013.

Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Castro HC. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*, 103(1), 1-10, 2008.

Santos LJ, Rocha GP, Alves RB, de Freitas RP. Fullereno [C60]: química e aplicações. *Quim. Nova.* 33(3):680-93, 2010.

Schlein Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today.* 9(7):255-8, 1993.

Scianimanico S, Desrosiers M, Dermine JF, Meresse S, Descoteaux A and Desjardins M. Cell. Microbiol., 1999, 1, 32.

Scott, D. A., Moreno, S. N. J. & Docampo, R. Ca<sup>2+</sup> storage in *Trypanosoma brucei*: the influence of cytoplasmic pH and importance of vacuolar acidity. Biochem. J. 310, 789–794 (1995).

Seby F, Gleyzes C, Gross O, Plau B and Donard OFX. Speciation of antimony in injectable drugs used for leishmaniasis treatment (Glucantime®) by HPLC-ICP-MS and DPP. Anal. Bioanal. Chem., 2012, 404, 2939.

Sereno 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):3097. 1998

Shaha, C. Indian J. Med. Res., 2006, 123, 233.

Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. The Journal of biological chemistry, v. 276, n. 6, p. 3971-3976. 2001.

Sharma, A.; Sharma, US. Liposome in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 154, p.123-140. 1997.

Sharma, U.; Singh, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J. Vector Borne Dis. 45:255–272; 2008.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* *chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 101, 577-579. 2006.

Shintani T, Uchiumi T, Yonezawa T, Salminen A, Baykov AA, Lahti R and Hachimori A. FEBS Lett., 1998, 439, 263.

Simkiss, K. Cellular discrimination processes in metal accumulating cells. J. exp. Biol, v.94, p.317-327, 1981.

Simkiss, K; Taylor, MG. Calcium magnesium phosphate granules: atomistic simulations explaining cell death. *J. exp. Biol*, v.190, p.131-139, 1994.

Soflaei S, Dalimi A, Abdoli A, Kamali M, Nasiri V, Shakibaie M, M Tat. Anti-leishmanial activities of selenium nanoparticles and selenium dioxide on *Leishmania infantum*. *Comp. Clin. Pathol.*, DOI 10.1007/s00580-012-1561-z. 2012.

Soflaei S, Dalimi A, Ghaffarifar F, Shakibaie M, Shahverdi AR and Shafierpour M. In Vitro Antiparasitic and Apoptotic Effects of Antimony Sulfide Nanoparticles on *Leishmania infantum*. *J. Parasitol. Res.*, doi:10.1155/2012/756568, 2012.

Sortino S, Mazzaglia A, Scolaro LM, Merlo FM, V. Valveri MT, Sciortino MT. Nanoparticles of cationic amphiphilic cyclodextrins entangling anionic porphyrins as carrier-sensitizer system in photodynamic cancer therapy. *Biomaterials*. 27, 4256. 2006.

Stafford, JL.; Neumann, NF.; Belosevic, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. Microbiol*. 28:187–248; 2002.

Stossel TP. *J. Cell Biol.*, 1973, 58, 346.

Stricker, SA., Weiner, S. Amorphous calcium phosphate in the stylets produced by a marine worm (Nemertea). *Experientia*, 41, 1557-1559. 1985.

Sun H, Yan SC, Cheng WS. Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione implication for its mode of action. *Eur J Biochem* 267 17:5450 – 5457. doi:10.1046/j.1432-1327.2000. 01605.x. 2000.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of India kala-azar. *Brit Med Journal*, 308, 307-307, 2000.

Tabakovic, A, Kester, M, Adair, JH. Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 4: 96-112. 2012.

Taylor, MG., Simkiss, K. Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. In: Mann, S., Webb, R.P.J., Williams, R.J.P. (Eds.), *Biom mineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 427–460. 1989.

Tejle K, Magnusson KE and Rasmusson B, *Biosci. Rep.*, 2002, 22, 529.

Tempone, AG.; Perez, D.; Rath, S.; Vilarinho, AL.; Mortara, RA.; Andrade, HF. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, p. 60 – 68, 2004.

Torchilin VP. *Nat. Rev. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Drug Discovery*, 2005, 4, 160.

Trivelin LA, Rohwedder JR and Rath S. Determination of pentavalent antimony in antileishmaniotic drugs using an automated system for liquid-liquid extraction with on-line detection. *Talanta*, 2006, 68, 1536.

Tropp J, Blumenthal NC, Waugh JS, Phosphorus NMR. study of solid amorphous calcium phosphate. *J Am Chem Soc* ;105:22-6. 1983.

Ueno N, et al., Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes, *Cell Microbiol.* 11 (12) 1827 - 1841. 2009.

Uskokovic V, Uskokovic DP. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J Biomed Mat Res* 96B:152–191. 2011.

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 8(4):297-318, 2002.

Vianna G. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *An. 7° Congr. Bras. Med. Cirurg.* 4:426-428, 1912.

Wan, F.; You, J.; Sun, Y.; Zhang, X. G.; Cui, F. D.; Du, Y. Z.; Yuan, H.; Hu, F. Q.; Int. J. Pharm. 359, 104. 2008.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical report series no. 949 (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26. March, 2010.

WHO Technical report series no 949. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26, March, 2010.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection, Ethiopia, Addis Ababa, p.20–22. 2007.

WHO. Draft Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region World Health Organization, 2014.

WHO/PAHO. Guia das Leishmanioses nas Américas, 60pp, 2013.

Wilson ME, Pearson RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes, Infect. Immun. 56 (2) 363 - 369. 1988.

Wilson, ME.; Andersen, KA.; Britigan, B. E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. Infect. Immun. 62:5133–5141; 1994.

Wright, SD.; Craigmyle, LS. Silverstein, SC. Fibronectin and serum amyloid P component stimulate C3b and C3bi-mediated phagocytosis in culture human monocytes. *J. Exp. Med.*, v.158, p.1338-1343, 1983.

Wyllie S, Fairlamb AH. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochemical Pharmacology*. 71. 3. 257-267. 2006.

Wyllie, S.; Cunningham, ML.; Fairlamb, AH. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, N. 38, p. 39925–39932, 2004.



Yan S, Li F, Ding K, Sun H D. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony (III) and trypanothione. *J Biol Inorg Chem* 8 D 6:689 – 697. doi:10.1007/s00775-003-0468-1. 2003.

Yang Z, Hao J, Yuan S, Lin S, Yau HM, Dai J, Lau SP. Field-Effect Transistors Based on Amorphous Black Phosphorus Ultrathin Films by Pulsed Laser Deposition. *Advanced Materials*. 27, 3748–3754, 2015.

Yao, C, Donelson, JE, Wilson, ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function, *Mol. Biochem. Parasitol.* 132 (1) 1 -16, 2003.

Yih TC, Al-Fandi M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem*, 97:1184–1190. 2006.

Young TW, Kuhn NJ, Wadeson A, Ward S, Burges D and Cooke GD. *Bacillus subtilis* ORF *yibQ* encodes a manganese-dependent inorganic pyrophosphatase with distinctive properties: the first of a new class of soluble pyrophosphatase? *Microbiology*, 1998, 144, 2563.

Zhang G, Liu T, Chen YH, Chen Y, Xu M, Peng J, Yu S, Yuan J, Zhang X. Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle. 2009.

Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* 279:37445 – 37451. doi:10.1074/jbc.M404383200. 2004.