



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR



JOYCE CORDEIRO BORGES

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO
CARVACROL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* FRENTE A
***LEISHMANIA INFANTUM*: ESTUDO PRELIMINAR**

JOÃO PESSOA - PB

2022

JOYCE CORDEIRO BORGES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO
CARVACROL FRENTE A *LEISHMANIA INFANTUM*: ESTUDO PRELIMINAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

JOÃO PESSOA - PB

2022

JOYCE CORDEIRO BORGES

Dissertação de Mestrado Aprovada em 09 / 03 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Elisângela A. de M. Kretzschmar

Prof. Dr. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal da
Paraíba
Orientadora



Documento assinado digitalmente
BOLIVAR PONCIANO GOULART DE LIMA DAMASC
Data: 10/03/2022 11:25:24-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno
Professor Nível D RETIDE da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

(Assinado digitalmente em 10/03/2022 14:04)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Professor Associado I do Centro de Biotecnologia da
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Examinador Interno

FICHA CARTALOGRÁFICA

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

B732d Borges, Joyce Cordeiro.

Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo carvacrol frente a *Leishmania infantum* : estudo preliminar / Joyce Cordeiro Borges. - João Pessoa, 2022.

48 f.

Orientação: Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar. Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Monoterpenos. 3. Biopolímeros. 4. Nanobiotecnologia. 5. Nanocarreadores. I. Kretzschmar, Elisângela Afonso de Moura. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.993.161(043)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que foram a força
e o meu escudo em dias árduos,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a presença espiritual de Deus em minha vida. A nossa comunhão e forte conexão é essencial para que eu saiba trilhar um caminho com fé em um Deus que tudo pode. A trajetória até aqui não foi fácil, em meio a tempos difíceis e abalados, a minha fortaleza e esperança vinha de ti. Obrigada Pai, por me mostrar que devo continuar quando pensar em desistir e por ter permitido conduzir esse trabalho conforme a tua vontade.

A minha família, em especial aos meus pais, que são a base de tudo e o motivo de todo esforço e dedicação para alcançar os meus objetivos. Palavras não são capazes de expressar a minha gratidão pelo o amor, apoio, incentivo e suporte de sempre.

Ao meu irmão que mesmo com a distância não deixou de expressar amor, apoio e incentivo durante todo o processo.

A minha orientadora Elisângela Afonso, pela confiança, pelos ensinamentos e todo auxílio na execução de cada etapa desse trabalho. Agradeço pela paciência e compreensão em meio as dificuldades, e por conduzir o papel de professor com excelência. Além, de não só conduzir as tarefas acadêmicas, mas de saber cuidar, se preocupar, ouvir e dá conselhos.

Aos colegas do LANNILAB, Palloma, Carlos, Maíne, Anne e Geórgia, que foram pessoas muito importantes nessa caminhada e que tanto me auxiliaram na execução desse projeto.

Ao Laboratório de Materiais e Biosistemas – LAMAB da UFPB pela parceria e por auxiliar nas análises das caracterizações físico-químicas do estudo.

Ao Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC) da UFPB pela parceria, suporte e auxílio na realização dos testes *in vitro*.

A turma do curso de mestrado do PPGBCM, sem exceção, que eu tive a alegria de conhecer, conviver e trocar experiências boas e também de angústias, dificuldades que fizeram parte dessa jornada.

Aos professores do PPGBCM da UFPB, por contribuírem tanto com a minha formação acadêmica, pela troca de conhecimentos, pelo apoio e incentivo aos estudos e a pesquisa. Levarei todos os ensinamentos para a minha vida.

A secretaria do PPGBCM da UFPB, na pessoa de Regina Miranda, por sempre ser atenciosa, paciente e não medir esforços em querer ajudar todas as vezes que precisei.

A banca examinadora, o Pro. Dr. Bolívar Damasceno e Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos por aceitarem o convite para compor minha banca de avaliação e contribuir e enriquecer meu trabalho através de suas considerações.

A Capes pelo apoio na concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

RESUMO

As Leishmanioses são doenças infecciosas tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmito por flebotomíneos (*Lutzomyia*). A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença. As linhas de tratamento para a LV incluem fármacos administrados pela via intravenosa e que causam efeitos adversos nos pacientes. O carvacrol (CAR), é um monoterpene fenólico que tem mostrado forte atividade frente à *Leishmania* spp. A quitosana (Qui) é um biopolímero com excelentes propriedades químicas e biológicas, e atua como componente de diversos sistemas de liberação de fármacos em diversas terapias e em especial na atividade anti-leishmania. Vários estudos têm como propostas a utilização de nanocarreadores como sistemas de liberação utilizando nanopartículas poliméricas de quitosana, como estratégia para a melhoria da eficácia e segurança no tratamento da leishmaniose. A hipótese desse estudo de encapsulação do CAR em nanopartículas poliméricas de quitosana (NPQui) objetiva responder se os seus efeitos terapêuticos podem potencializar o tratamento para leishmaniose. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar NPQui contendo o CAR (NPCar) e avaliar a atividade *in vitro* frente a *L. infantum*. As NPQui foram preparadas pelo método da gelificação iônica variando as concentrações de Qui e tripolifosfato (TPP) respectivamente entre 0,05%, 0,1% e 0,2% e 0,05%, 0,1% e 0,5%, obtendo 9 amostras. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas pelo tamanho de partículas, índice de polidispersão (Pdi) e potencial Zeta, com o objetivo de avaliação das características desejáveis para sistemas de liberação de fármacos. Os ensaios de atividade *in vitro*, foram realizados frente a formas promastigotas de *L. infantum* pelo teste de MTT e os resultados foram analisados com o auxílio *Software GraphPad Prisma 5.0*. Entre as formulações preparadas, a amostra A2 (0,1% Qui:0,05% TPP g/v), teve melhores resultados, com tamanhos de partículas em $89,43 \pm 0,774$ nm, índice de polidispersibilidade 0,168 e potencial Zeta 12,8 mV. Após a encapsulação do CAR (1mg/mL) na formulação A2, a mesma apresentou tamanho de partícula de 245,9 nm, índice de polidispersibilidade 0,175 e o potencial zeta alto 15,4 mV. A análise preliminar da atividade *in vitro* anti-leishmania demonstrou uma forte inibição das formas promastigotas de *L. infantum* das NPCar com uma IC_{50} de 2,659 μ g/mL. Os resultados do presente estudo demonstram que as NPCar obtidas mantêm as características adequadas para sistemas de liberação de fármacos com homogeneidade e estabilidade, e os estudos preliminares em formas promastigotas de *L. infantum* demonstraram que as NPCar podem ser candidatos promissores para a leishmaniose visceral.

Palavras-chaves: Leishmaniose Visceral, Monoterpenos, Biopolímeros. Nanobiotecnologia, Nanocarreadores.

ABSTRACT

The Leishmaniasis are neglected tropical infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by sand flies (*Lutzomyia*). Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease. The treatment lines for VL include intravenously administered drugs that cause adverse effects in patients. Carvacrol (CAR), is a phenolic monoterpene that has shown strong activity against *Leishmania* spp. Chitosan (Chi) is a biopolymer with excellent chemical and biological properties, and acts as a component of several drug delivery systems in various therapies and in particular in anti-leishmania activity. Several studies have proposed the use of nanocarriers as delivery systems using polymeric chitosan nanoparticles, as a strategy to improve efficacy and safety in the treatment of leishmaniasis. The hypothesis of this study of CAR encapsulation in polymeric chitosan nanoparticles (NPChi) aims to answer whether its therapeutic effects can potentiate the treatment for leishmaniasis. Thus, the present work aimed to develop, characterize NPChi containing CAR (NPCar) and evaluate the anti-leishmania activity against *L. infantum*. The NPChi were prepared by the ionic gelation method varying the concentrations of Chi:TPP respectively between 0.05%, 0.1% and 0.2% and 0.05%, 0.1% and 0.5%, obtaining 9 samples. The in vitro activity assays were performed against promastigotes of *L. infantum* by the MTT test and the results were analyzed with the aid of GraphPad Prisma 5.0 software. Among the prepared formulations, sample A2 (0.1%Chi:0.05%TPP g/v), had the best results, with particle sizes at 89.43 ± 0.774 nm, polydispersity 0.168 and Zeta potential 12.8 mV. After encapsulation of the CAR (1mg/mL) in formulation A2, it showed a particle size of 245.9 nm, polydispersity 0.175 and the high zeta potential 15.4 mV. Preliminary analysis of in vitro anti-leishmania activity demonstrated strong inhibition of *L. infantum* promastigotes by NPCar with an IC_{50} of 2.659 μ g/mL. The results of the present study demonstrate that the obtained NPCar maintain characteristics suitable for drug delivery systems with high homogeneity and stability, and preliminary studies in *L. infantum* demonstrated that NPCar may be promising candidates for visceral leishmaniasis.

Keywords: Visceral Leishmaniasis, Monoterpenes, Biopolymers. Nanobiotechnology, Nanocarriers.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

B.O.D: Demanda biológica de oxigênio

Car: Carvacrol

IC₅₀: Concentração inibitória mínima capaz de matar 50% do total de células

LC - Leishmaniose cutânea

LM - Leishmaniose mucocutânea

LV - Leishmaniose visceral

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

NPCar: Nanopartículas de quitosana contendo carvacrol

NPQui: Nanopartículas de quitosana

OD: Densidade óptica

OEs: Óleos essenciais

OMS: Organização Mundial de Saúde

Pdi: Índice de polidispersão

QUI: Quitosana

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro fetal bovino

TPP: Tripolifosfato de sódio

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> | 15 |
| Figura 2: Ilustração das principais organelas intracelulares do <i>Leishmania spp</i> : Promastigota (A) e amastigota (B) | 15 |
| Figura 3 – Exemplar adulto de <i>L. longipalpis</i> | 16 |
| Figura 4 - Ciclo de vida da <i>Leishmania ssp.</i> | 16 |
| Figura 5 – Hepatoesplenomegalia em paciente com LV | 17 |
| Figura 6 – Distribuição de casos de LV na Região das Américas em 2020 | 18 |
| Figura 7 – A- Formas promastigotas de <i>L. infantum</i> . B – Formas amastigotas de <i>L. infantum</i> | 19 |
| Figura 8 - Estrutura química do CAR | 20 |
| Figura 9: Estrutura da quitina e quitosana após reação de desacetilação | 22 |
| Figura 10: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas | 23 |
| Figura 11 - Ilustração esquemática da estrutura química da quitosana reticulada ionicamente com TPP | 26 |
| Figura 12 – Esquema de preparação de nanopartículas de quitosana pela técnica da gelificação iônica | 27 |
| Figura 13 – Preparação das nanopartículas de QUI/TPP | 31 |
| Figura 14 – Amostras das formulações de NPQui | 34 |
| Figura 15 - A – Aspecto macroscópico das formulações de NPQui A2 e B3. B - Visualização do efeito Tyndall nas amostras A2 e B3 | 36 |
| Figura 16 – Formulação de NPQui e NPcar | 38 |
| Figura 17 – A- Visualização do efeito Tyndall na amostra A2-1. B- Visualização do efeito Tyndall na amostra A2-2 | 38 |
| Figura 18 – Relação da densidade óptica (OD) de células nos poços após os tratamentos. Com CAR, NPQui, NPCar e a Anfotericina B | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Métodos de preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana | 25 |
| Tabela 2 – Concentrações de QUI/TPP das formulações de nanopartículas | 30 |
| Tabela 3 – Tamanho de partículas, Pdi e potencial zeta das formulações A1-C3 | 35 |
| Tabela 4 - Análises de tamanho de partícula, Pdi e potencial Zeta das NPbr e NPcar A2 e NPcar B3 | 39 |
| Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% (IC ₅₀) de promastigotas de <i>L. infantum</i> com os tratamentos CAR, NPQui, NPCar e a Anfotericina B®. | 41 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 14 |
| 2.1 Leishmanioses..... | 14 |
| 2.1.1 Leishmaniose Visceral..... | 17 |
| 2.2 Carvacrol..... | 20 |
| 2.3 Quitosana..... | 22 |
| 2.4 Nanopartículas poliméricas | 23 |
| 2.4.1 Métodos de preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana | 24 |
| 3 OBJETIVOS..... | 29 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 29 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 SOLUÇÃO DE QUITOSANA..... | 30 |
| 4.2 PRÉ-FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA..... | 30 |
| 4.3 FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CARVACROL..... | 31 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOPARTÍCULAS..... | 32 |
| 4.4.2 Tamanho e índice de polidispersão (Pdi) | 32 |
| 4.4.3 Análise do Potencial Zeta..... | 32 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DAS NPCAR <i>IN VITRO</i> | 32 |
| 4.7.1 Parasitos e cultura <i>in vitro</i> | 32 |
| 4.7.4 Atividade <i>in vitro</i> das NPCar frente a promastigotas de <i>L. infantum</i> | 33 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 34 |
| 5.1 PRÉ-FORMULAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA..... | 34 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOPARTÍCULAS..... | 34 |
| 5.2.1 Tamanho e índice de polidispersão (Pdi) | 34 |
| 5.2.2 Análise do Potencial Zeta..... | 34 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DAS NPCAR <i>IN VITRO</i> | 40 |
| 5.4.1 Atividade <i>in vitro</i> das NPCar frente a promastigotas de <i>L. infatum</i> | 40 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 43 |
| ANEXOS | 50 |

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são doenças infecciosas tropicais negligenciadas, consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um grande problema de saúde pública. É uma doença que apresenta forte potencial de surto e mortalidade. São relatados cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos mundialmente, sendo fatal se não tratada em mais de 95% dos casos. 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em países como, o Brasil, China, Etiópia, Eritreia e Índia (WHO, 2022).

A leishmaniose é uma doença causada por mais 20 espécies do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae. A doença é transmitida aos seres humanos através da picada de fêmeas de mosquitos conhecidos como, flebotomíneos (gênero *Lutzomyia*) (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

As manifestações clínicas são divididas em três formas principais, cutânea, mucocutânea e visceral, também conhecida como calazar (SILVA et al., 2017). A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação mais comum e é caracterizada pela formação nódulos e úlceras bem delimitadas, com bordas elevadas e ruptura epidérmica (AARA et al., 2013). Na leishmaniose mucocutânea (LM) ocorre lesões na mucosa oral e nasal, preferencialmente, embora as lesões ulcerativas possam se estender às cordas vocais e cartilagem traqueal (GUERRA et al., 2011). A leishmaniose visceral (LV) humana é a forma sistêmica da doença, caracterizada por esplenomegalia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia. Os protozoários que geralmente causam a LV são das espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). O Brasil representou mais de 97% dos casos de LV em toda a América, tendo como principal agente etiológico a *Leishmania infantum* (BELO et al., 2013; OPAS; 2021).

As linhas de tratamento para a LV incluem fármacos que são administrados pela via intravenosa ou intramuscular e podem causar efeitos adversos graves, limitando a resistência do parasita ao fármaco (DE SOUZA, et al., 2018). Além disso, o alto custo do tratamento dificulta o acesso da população (SUNYOTO et al., 2018).

Nesse cenário, os produtos naturais se destacam na bioprospecção de novas moléculas bioativas, entre eles, alguns monoterpenos têm demonstrado atividade contra *leishmania* spp., como por exemplo, o carvacrol (YOUSSEFI et al., 2019).

O carvacrol (2-metil-5-[1-metil-etil] fenol) é um monoterpeno fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas (SHARIFI-RAD et al., 2018). O carvacrol tem mostrado resultados promissores com um alto potencial terapêutico contra cepas de *Leishmania* spp.

Estudos *in vivo* demonstram baixa toxicidade, diminuição da carga parasitária e redução no tamanho de lesões cutâneas em animais experimentais (MONZOTE et al., 2014b; YOUSSEFI et al., 2019).

Vários estudos têm proposto nanocarreadores como sistemas de liberação utilizando nanopartículas poliméricas de quitosana, como estratégia para a melhoria da eficácia e segurança no tratamento da leishmaniose (DE SOUZA, et al., 2018; ALMEIDA et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2016; DAS et al., 2017). Esses nanocarreadores apresentam vantagens como, baixa toxicidade, biodegradabilidade, pequeno tamanho de partícula (<1µm) e estabilidade em meio biológico, sendo assim, o sistema protege o princípio ativo até sua célula alvo (DE SOUZA et al., 2018). Dessa forma, nanopartículas poliméricas de quitosana podem ser consideradas promissoras como sistemas de liberação de fármacos e moléculas bioativas anti-leishmania.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a encapsulação do carvacrol em nanopartículas poliméricas de quitosana, bem como a caracterização do sistema e sua avaliação leishmanicida frente a *L. infantum*.

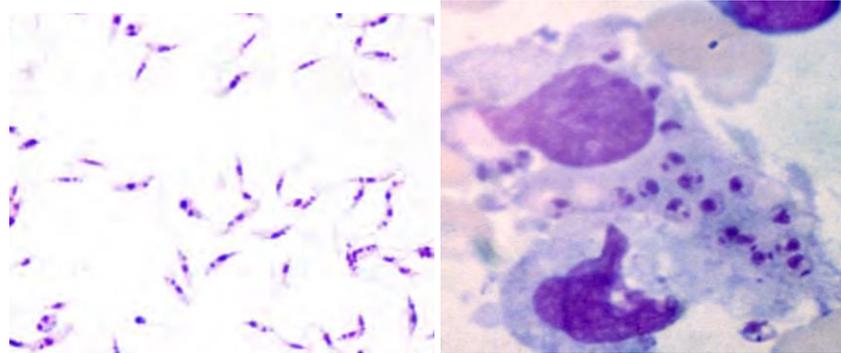
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

A Leishmaniose é uma doença infecciosa tropical negligenciada causada por cerca de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a sexta doença parasitária mais prevalente no mundo. É uma doença frequente em 98 países, mais comumente na região da Ásia, Oriente Médio, norte da África, Mediterrâneo e América do Sul e Central. São relatados cerca de 700.000 a 1 milhão de novos casos e de 20.000 a 30.000 mortes mundialmente. Estima-se cerca de 310 milhões de pessoas se encontram em áreas de risco de infecção causados por *Leishmania* spp. (WHO, 2022).

Os protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* possuem duas formas evolutivas: as promastigotas e amastigotas. As promastigotas são formas flageladas encontradas no tudo digestivo e partes bucais do inseto vetor, e as amastigotas são formas aflageladas, encontradas como parasitas intracelulares de células do sistema fagocítico mononuclear nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (SAUNDERS e MCCONVILLE, 2020) (Figura 1).

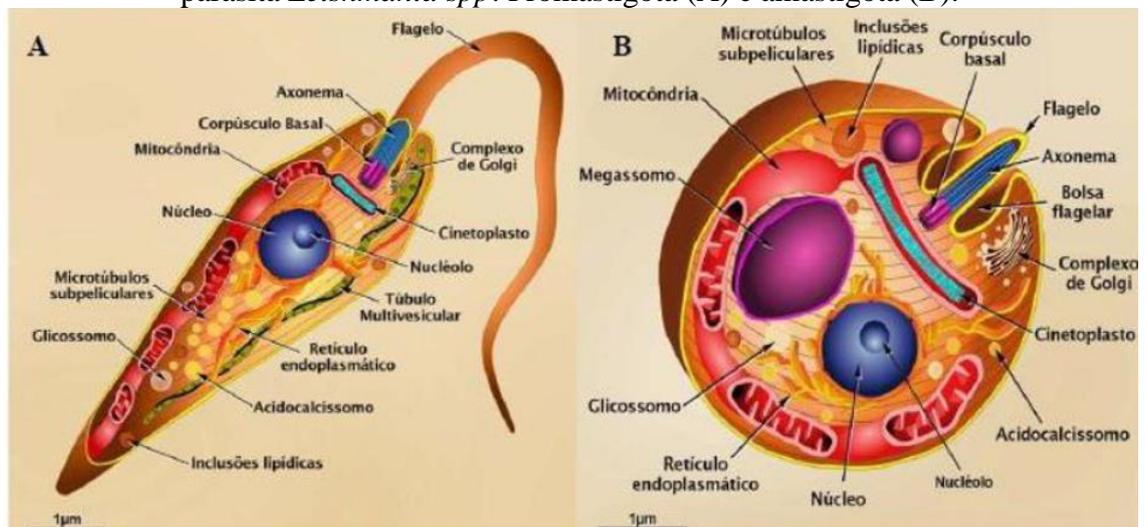
Figura 1 – Formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero *Leishmania* spp.



Fonte: adaptado de OPAS (2020)

Em relação a biologia celular de *Leishmania* spp., o grupo possui organelas comuns à outras células eucarióticas, mas também se caracterizam por apresentar estruturas citoplasmáticas e organelas características da família Trypanosomatidae, tais como cinetoplasto, acidocalcissomas, glicossomos e megassomos, além de microtúbulos subpeliculares (Figura 2) (DE SOUZA, 2008; TEIXEIRA et al., 2013).

Figura 2: Ilustração das principais organelas intracelulares das formas evolutivas do parasita *Leishmania* spp: Promastigota (A) e amastigota (B).



Fonte: Adaptado de Teixeira et al. (2013)

A doença é transmitida aos humanos pela picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*, sendo a espécie *L. longipalpis* considerada a principal espécie de vetor da doença no mundo (Figura 3). Mas, a transmissão também pode ocorrer através de *L. cruzi* e *L. evansi*, além de outras formas de transmissão já registradas: congênita, injeção de drogas e transfusão sanguínea (BELO et al., 2013).

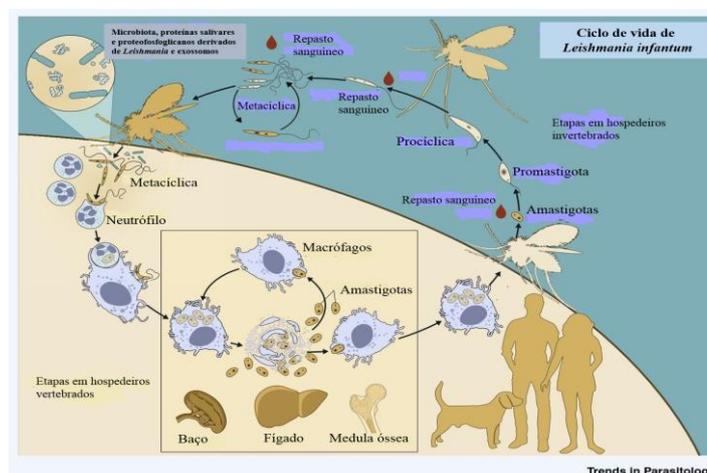
Figura 3– Exemplo adulto de *L. longipalpis*



Fonte: adaptado de OPAS (2020)

O ciclo de vida da *Leishmania* ssp. (Figura 4), inicia-se quando as fêmeas de flebotomíneos se alimentam com sangue de um mamífero parasitado, adquirindo células infectadas com formas amastigotas. As amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas no intestino do vetor e, posteriormente, em promastigotas metacíclicas. Estes migram para a probóscide do vetor e são reinoculados em um hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. As promastigotas são fagocitadas no hospedeiro principalmente por macrófagos. Neutrófilos são recrutados para o local da lesão, onde são transformadas intracelularmente em formas amastigotas. Amastigotas se multiplicam intracelularmente por fissão binária e a infecção se espalha para outras células por fagocitose de amastigotas livres. Após uma picada de flebotomíneo subsequente, células infectadas ou amastigotas livres são ingeridos, dando continuidade ao ciclo biológico (SAUNDERS e MCCONVILLE, 2020).

Figura 4 - Ciclo de vida da *Leishmania infantum*.



Fonte: Adaptado de SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA (2020)

As manifestações clínicas são divididas em três formas principais, cutânea, mucocutânea e visceral, também conhecida como calazar (SILVA et al., 2017). A leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação mais comum e é caracterizada pela formação de uma pápula assintomática, progredindo para pápulas maiores ou nódulos no local da inoculação do parasita. Esses nódulos aumentam e se transformam em úlceras bem delimitadas, com bordas elevadas e ruptura epidérmica (AARA et al., 2013).

A leishmaniose mucocutânea (LM) ocorre dentro de meses ou anos após a persistência de lesões cutâneas. A mucosa oral e nasal é afetada preferencialmente, embora as lesões ulcerativas possam se estender às cordas vocais e cartilagem traqueal (GUERRA et al., 2011).

Leishmaniose visceral (LV) é a forma sistêmica da doença, mais severa e debilitante caracterizada por febre alta, esplenomegalia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia (aumento de gamaglobulina no sangue) e pancitopenia (redução dos níveis de hemácias, leucócitos e plaquetas no sangue) (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

2.1.1 Leishmaniose visceral (LV)

A leishmaniose visceral (LV) humana é a forma mais grave das leishmanioses. Devido a disseminação sistêmica causado pela presença de parasitas em órgãos como medula óssea, baço e fígado, podem causar complicações sérias nos pacientes, que se não tratadas podem levar à morte do paciente em 90% dos casos (Figura 5). A LV afeta principalmente as pessoas mais vulneráveis, como crianças menores de 5 anos, idosos, pacientes com comorbidades e outras condições com imunossupressão, como infecção pelo HIV/AIDS, desnutrição, entre outras (BELO et al., 2013; OPAS; 2021).

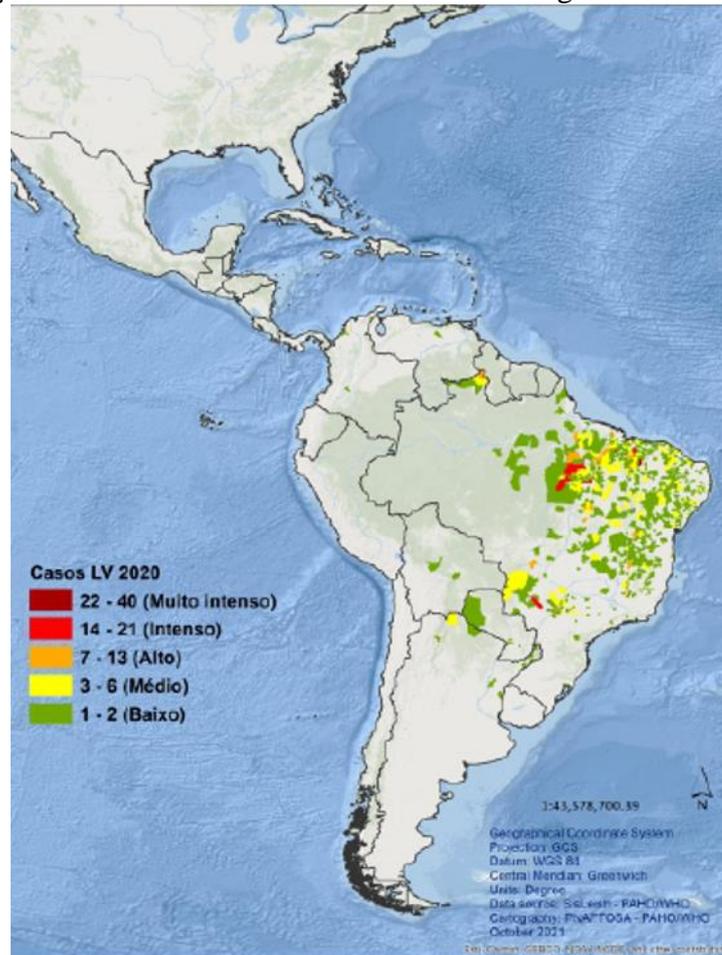
Figura 5– Hepatoesplenomegalia em paciente com LV.



Fonte: Adaptado de SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA (2020)

A LV é uma doença endêmica em 13 países das Américas, onde foram registrados 67.922 novos casos de 2001 a 2020. Nas Américas, em 2020, o Brasil representou mais de 97% (1.933) dos casos de LV quantificados (OPAS; 2021) (Figura 6). No Brasil, a doença se expandiu para cidades de médio e grande porte, nas quais as ações de vigilância e controle têm sido intensificadas, visando controlar a disseminação da LV (LARA-SILVA et al., 2015).

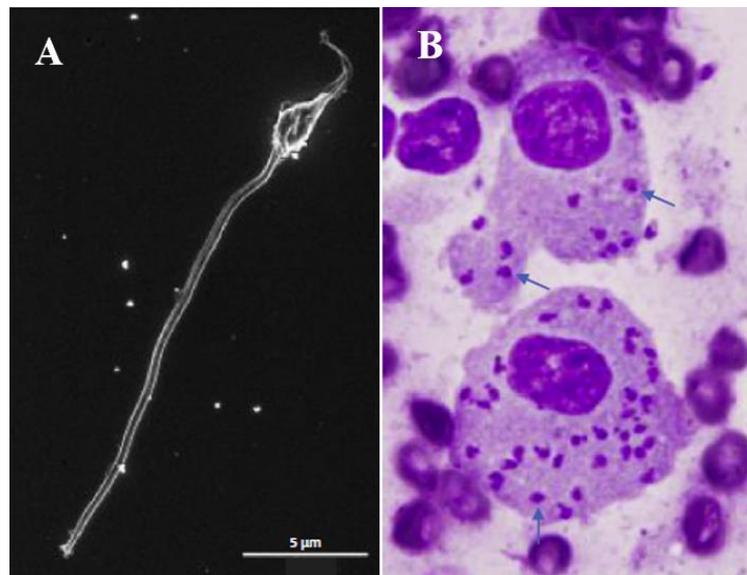
Figura 6– Distribuição de casos de leishmaniose visceral na Região das Américas em 2020



Fonte: Adaptado de OPAS (2021)

Os protozoários que geralmente causam a LV são *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Nas Américas, a LV é principalmente causada pelo protozoário da espécie *L. infantum* (Figura7) (BELO et al., 2013). Estudos do perfil epidemiológico da LV no Brasil relataram que o vetor da espécie *Lutzomyia longipalpis* compreendeu 96.5% do total de flebotomíneos vetores da doença, sendo que apresentaram uma taxa de infecção mínima expressiva por *Leishmania infantum* em 16,7% (LARA-SILVA et al., 2015).

Figura 7 – **A**- Formas promastigotas de *L. infantum*. **B** – Formas amastigotas de *L. infantum*



Fonte: Adaptado de SERAFIM; INIGUEZ; OLIVEIRA (2020)

As linhas de tratamento para a LV incluem fármacos que são administrados de forma invasiva pela via intravenosa ou intramuscular e podem causar efeitos adversos graves, limitando a resistência do parasita ao fármaco (DE-SOUZA, et al., 2018).

O tratamento de primeira escolha para leishmaniose é limitado aos antimoniais pentavalentes, incluindo estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime[®]). A segunda linha de tratamento de leishmanioses são o anfotericina B em formulação coloidal de micelas de deoxicolato de sódio (Fungizone[®]), formulação liposomal de anfotericina B (AmBisome[®]), pentamidina (Pentam[®]), miltefosina (Impavido[®]) e paramomicina (Humatin[®]) (DE-SOUZA, et al., 2018).

O tratamento com a administração parenteral da formulação liposomal de Anfotericina B[®] tem demonstrado uma melhora no desempenho terapêutico como também uma diminuição nos efeitos adversos. O uso desse tratamento na LV tem apresentado 95% de cura. Porém, a necessidade de repetidas administrações parenterais e o alto custo do tratamento, limitam seu uso em pacientes de países em desenvolvimento (NO et al., 2016). Além disso, o alto custo do tratamento, ocasiona uma insuficiente disponibilidade no mercado, devido à ineficiência do seu fornecimento, dificultando o acesso da população (SUNYOTO et al., 2018).

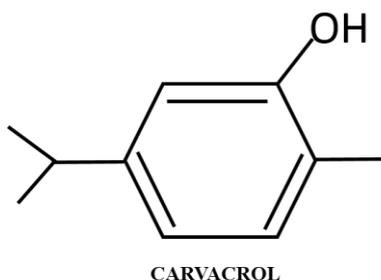
Levando em consideração as limitações e desvantagens do tratamento da leishmaniose, novas moléculas que apresentam uma toxicidade reduzida, baixa resistência, poderão ser promissoras e uma alternativa no tratamento da doença. Além da síntese de novos fármacos,

os produtos naturais, incluídos compostos isolados de óleos essenciais, se destacam na bioprospecção de novas moléculas que apresentam efeitos terapêuticos (YOUSSEFI et al., 2019).

2.2 Carvacrol

O CAR (2-metil-5-[1-metil-etil] fenol) (Figura 1) é um monoterpreno fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas como, por exemplo, orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), mosto de pimenta (*Lepidium flavum*), laranja-bergamota (*Citrus aurantium bergamia*), entre outras (SHARIFI-RAD et al., 2018).

Figura 1- Estrutura química do CAR



Fonte: Elaborado pelo autor, (2022).

Estudos *in vitro* com o carvacrol têm mostrado resultados promissores com um alto potencial terapêutico em diferentes ensaios farmacológicos (SILVA et al., 2018). Entre os efeitos farmacológicos incluem, atividades antioxidante (com a redução o estresse oxidativo pela remoção de radicais livres), antimicrobiana (pela perturbação da célula bacteriana, inibição da ATPase microbiana e inibição da bomba de efluxo bacteriano), anti-hipertensiva, imunomoduladora (pelo aumento de glóbulos brancos a partir da medula óssea, estimulando o sistema imunológico humoral), anti-inflamatório, anticancerígena e leishmanicida (EZZ-ELDIN; ABOSEIF; KHALAF, 2020, RATHOD et al., 2021; WANG; WU, 2021; YOUSSEFI et al., 2019).

A atividade anti-leishmania do carvacrol foi demonstrada em uma concentração inibitória em 50% das formas promastigotas de *L.chagasi* (IC₅₀) de 2,3 µg mL⁻¹ (MELO et al., 2013). Em cepas de *L. amazonensis*, foi observado uma IC₅₀ das formas promastigotas de 15,3 ± 4,6 ug.mL⁻¹ (PASTOR et al., 2015; MONZOTE et al., 2014a). Além disso, estudos *in vivo* em um modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos, demonstraram

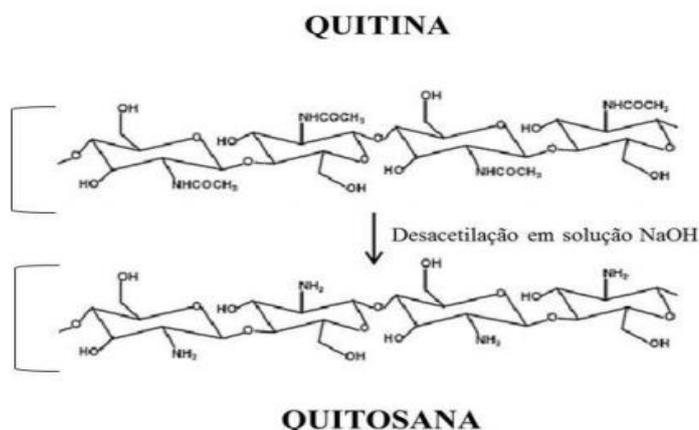
que após a administração intralesional de 30 mg/kg do carvacrol, houve uma redução no tamanho da lesão na pele dos animais semelhante ($p > 0.05$) aos animais tratados com o fármaco glucantime do controle positivo (MONZOTE et al., 2014b). Acredita-se que presença do grupo hidroxila ligado ao anel benzênico na molécula do carvacrol é importante na atividade anti-leishmania, além do fato que estes compostos possuem a natureza hidrofóbica e têm a capacidade de atravessar a membrana celular, tornando-a impermeável a prótons e íons, afetando assim funções enzimáticas do parasita (SILVA et al., 2017; PASTOR, et al., 2015).

Recentemente foi observado uma atividade promissora do carvacrol contra cepas de promastigotas da espécie *L. infantum*, com valores de IC50 de 9,8 µg/mL. Estudos de toxicidade *in vivo* mostraram que a administração de carvacrol a 100 mg/kg, foi um tratamento seguro e eficaz, com presença moderada de parasitas e poucos efeitos colaterais no fígado (YOUSSEFI et al., 2019).

As propriedades terapêuticas da molécula de carvacrol, podem apresentar limitações quanto à sua administração em meios biológicos a saber, à natureza lipofílica, hidrofóbica, facilidade de oxidação e volatilização (SANTOS et al., 2015). Como uma possível estratégia para solucionar essas limitações e potencializar os efeitos seria a incorporação da molécula em sistemas carreadores (DAS et al., 2017). Uma das vantagens desses sistemas carreadores é o tamanho nanométrico de suas partículas, o qual facilita a permeação em membranas e barreiras biológicas (DE-MATOS; LUCCA, KOESTER, 2019). Particularmente, no tratamento de leishmanioses, os nanocarreadores, entre eles as nanopartículas poliméricas de quitosana, se destacam, pois são capazes de direcionar o ativo para membrana de macrófagos infectados por *Leishmania* spp. (DAS et al., 2017).

2.4 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear obtida a partir da desacetilização da quitina. Pode ser encontrada em exoesqueleto de crustáceos e nas paredes celulares de fungos. A quitosana é composta por unidades N-cetil-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas $\beta(1,4)$ (Figura 9). As unidades características da quitosana, devido à presença de grupos de aminoácidos com carga positiva, formam um catiônico, policatônico, solúvel em água. Tais particularidades oferecem à quitosana um caráter hidrofílico, além de possuir propriedades de biocompatibilidade, de biodegradabilidade, de mucoadesão, de baixa toxicidade e de sensibilidade ao pH (HOSSEINNEJAD; JAFARI, 2016; SHARIATINIA, 2019; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017).

Figura 9: Estrutura da quitina e quitosana após reação de desacetilação

Fonte: Adaptado de ANITHA et al., (2014).

A quitosana é considerada um biopolímero que apresenta baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa imunogenicidade, atividade antimicrobianas, anti-inflamatória e anti-leishmania (ABDOU et al., 2008; VERLEE; MINCKE; STEVENS, 2017; RIEZK et al., 2019; SOTELO-BOYÁS et al., 2017; TIAN et al., 2021).

A quitosana possui excelentes propriedades químicas e biológicas, podendo ser aplicada em diversas áreas como por exemplo, indústria alimentícia, na agricultura, como biomaterial e no setor farmacêutico como componente de sistemas de liberação de fármacos (JHAVERI et al., 2021).

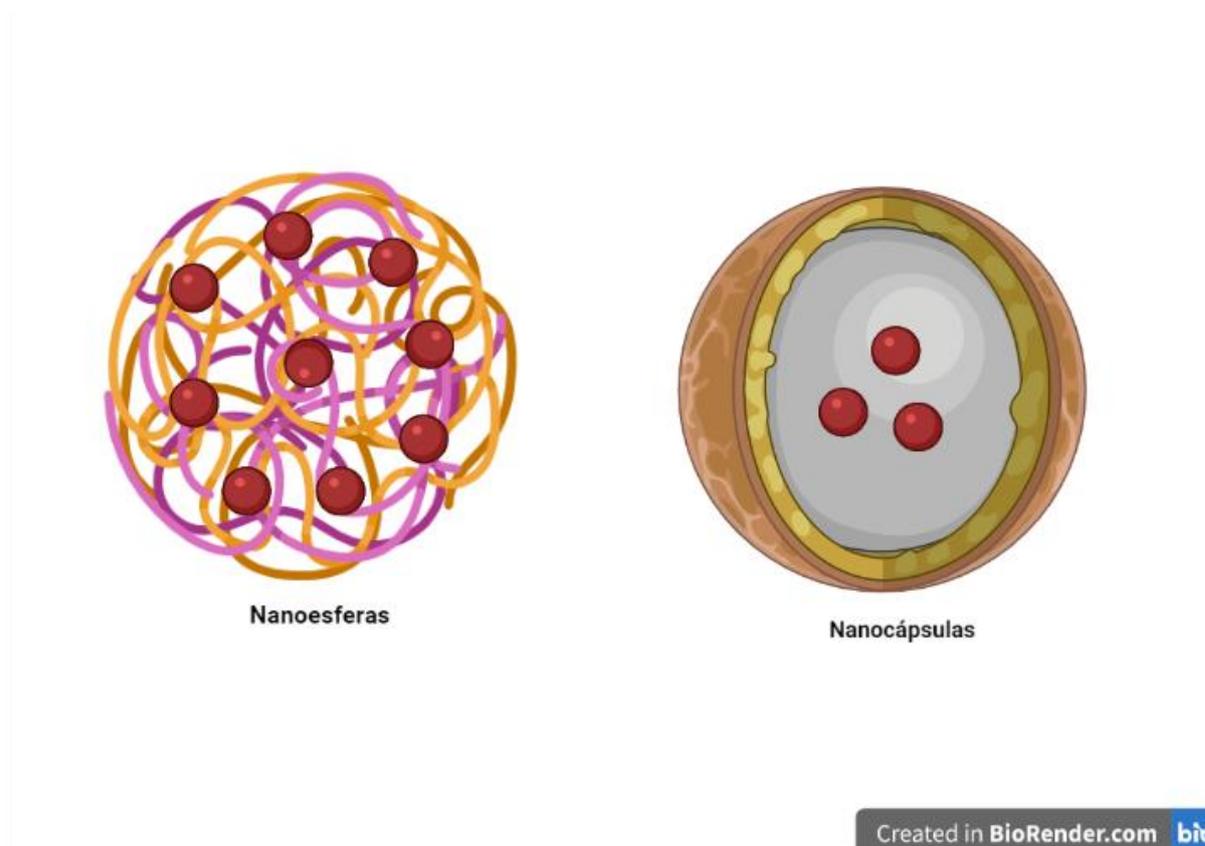
Entre os sistemas de liberação de fármacos estão as nanopartículas poliméricas. Vários estudos apontam diversas aplicação biomédicas das nanopartículas revestidas com quitosana. As nanopartículas de quitosana apresentam vantagens em sua aplicação, como o aumento da estabilidade físico-química do sistema, liberação controlada de fármacos, promove a mucoadesividade e a penetração nos tecidos, modula as interações celulares (absorção e toxicidade celular), e aumento da biodisponibilidade e eficácia dos fármacos (ou substâncias ativas) (FRANK et al., 2020).

2.5 Nanopartículas Poliméricas

Na última década, vários estudos têm proposto nanocarreadores como sistemas de liberação utilizando nanopartículas metálicas, lipídicas e poliméricas, além de lipossomas, como estratégia para a melhoria da eficácia e segurança no tratamento da leishmaniose (DE SOUZA, et al., 2018; ALMEIDA et al., 2017; GUTIERREZ et al., 2016).

A maioria das nanopartículas de interesse farmacêutico é obtida a partir de polímeros naturais, sintéticos ou semi-sintéticos (biodegradáveis ou não), chamadas de nanopartículas poliméricas (BRUNI et al., 2017). As nanopartículas poliméricas são divididas em nanocápsulas (um sistema na qual uma parede polimérica envolve um núcleo oleoso) ou nanoesferas (um sistema que forma uma matriz polimérica) (SCHAFFAZICK et al., 2003; POHLMANN et al., 2013; MIKUŁOVÁ; MIKUŁ, 2021) (Figura 10).

Figura 10: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas



Fonte: Elaborado pelo autor, (2022).

As nanopartículas poliméricas de quitosana apresentam diversas atividades biológicas, entre elas a atividade leishmanicida. Uma nanopartícula lipídica revestida com quitosana contendo ácido ursólico apresentou atividade leishmanicida *in vitro*, sendo mais eficaz contra amastigotas de *L. donovani* do que a forma não encapsulada da droga. Além disso, o estudo *in vivo* mostrou uma redução da carga do parasita para 98,75% (DAS et al., 2017).

Moreno et al. (2015), demonstraram que a incorporação da β -lapachona em nanopartículas de lecitina-quitosana para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados por *L. major*, melhorou o índice de seletividade de 11,3 em

relação à β -lapachona livre de 9,1. Uma nanopartícula lipídica revestida com quitosana contendo ácido ursólico apresentou atividade anti-leishmania *in vitro*, sendo mais eficaz contra amastigotas de *L. donovani* do que a forma não encapsulada da droga. Além disso, o estudo *in vivo* mostrou uma redução da carga do parasita para 98,75% (DAS et al., 2017).

Nanopartículas de quitosana conjugada com manose com curcumina (NCM-Cur) foram testadas quanto à sua eficácia e toxicidade frente a cepas de *L. donovani*. A atividade anti-leishmania *in vivo* mostrou maior supressão significativamente da replicação de parasitas no baço com o tratamento com NCM-Cur. O potencial do NCM-Cur também foi confirmado pela mínima citotoxicidade (CHAUBEY et al., 2018). Dessa forma, nanopartículas poliméricas de quitosana podem ser consideradas promissoras como sistemas de liberação de fármacos e moléculas bioativas anti-leishmania.

2.5.1 Métodos de preparação de nanopartículas de quitosana

Uma variedade de métodos de preparação ne nanopartículas de quitosana são descritos na literatura. Os principais métodos são: a gelificação iônica, complexação polieletrólítica, coacervação/ precipitação, *spray-drying*, coalescência de gotas da emulsão, nanoprecipitação e micela (Tabela 1) (NASKAR; KUOTSU; SHARMA, 2018; YANAT; SCHROËN, 2021).

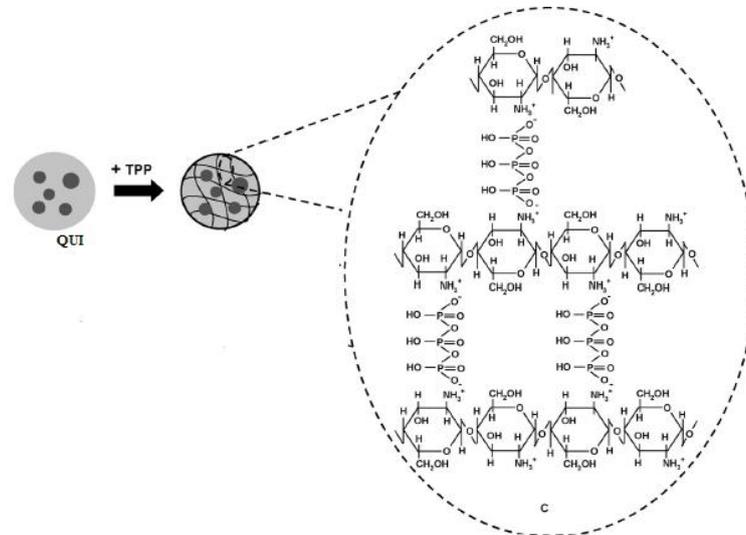
Tabela 1– Métodos de preparação e caracterização físico-química de nanopartículas de quitosana.

| Compostos | Método de preparação | Tamanho de partícula (nm) | Índice de Polidispersão | Potencial Zeta (mV) | Referência |
|---|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Nanopartículas de quitosana (NPQs) contendo rifampicina | Gelificação iônica | 181.7 ± 3.7 | 0.137 ± 0.24 | 39.6 ± 2.3 | (CHAUBE; MISHRA, 2014) |
| NPQs contendo ampicilina | Complexação polieletrólítica | 133.8 | 0.240 | +41.7 | (CIRO; ROJAS; SALAMANCA, 2019) |
| NPQs contendo doxorrubicina | Coacervação/precipitação | 178.64 ± 10.10 | 0.104 ± 0.160 | 1.62 ± 0.60 | (KELLY et al., 2019) |
| NPQs contendo amoxicilina | Spray-drying | 180.0 | - | 44.5 | (NGAN et al., 2014) |
| NPQs contendo 5-fluorouracil | Coalescência de gotas da emulsão | 100 | 0.22 | -24.8 | (REDDY, 2013) |
| NPQs | Nanoprecipitação | 230 | - | - | (LUQUE-ALCARAZ et al., 2016) |
| NPs de quitosana e alginato | Micela reversa | 250 ± 81.2 | 0.404 | - | (KAFSHGARI et al., 2012) |

Fonte: autoria própria.

Entre a variedade de métodos desenvolvidos para preparar nanopartículas de quitosana, a técnica de gelificação iônica tem sido a mais empregada, devido ser um método considerado eficaz, simples, rápido, atóxico e livre de solventes orgânicos (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI, 2004). A técnica de gelificação iônica é baseada na interação eletrostática entre grupos amino primário de carga positiva da quitosana e os grupos de ânions multivalentes carregados negativamente, como o tripolifosfato de sódio (TPP) (Figura 11) (CALVO, REMUNÁN-LÓPEZ, & VILA-JATO ALONSO, 1997; YANG et al., 2011; KEAWCHAOON & YOKSAN, 2011).

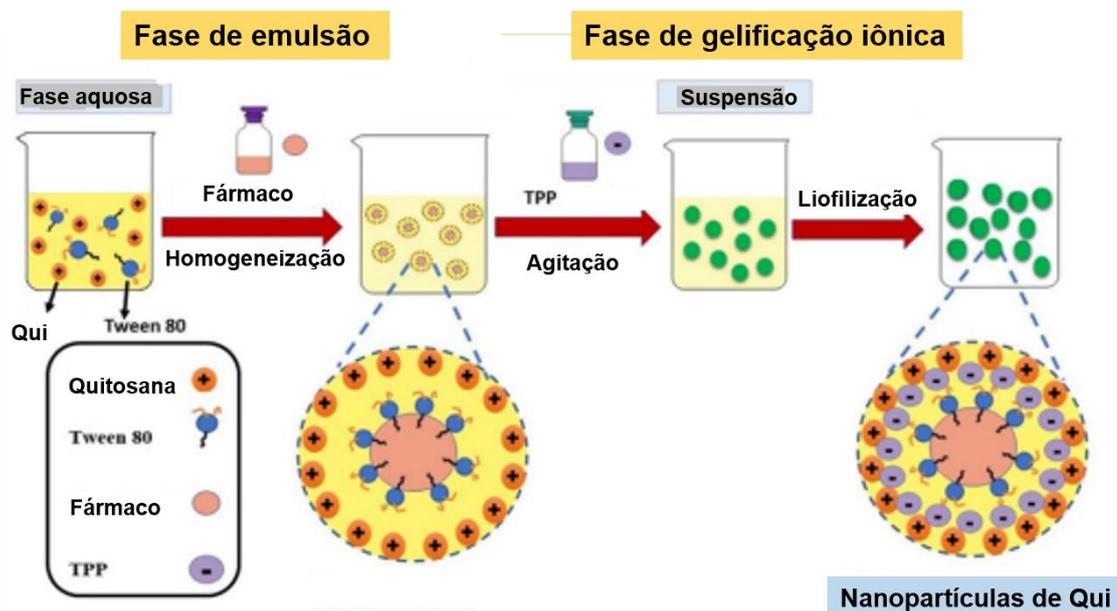
Figura 11 - Ilustração esquemática da estrutura química da quitosana reticulada ionicamente com TPP.



Fonte: Adaptado de Keawchaon e Yoksan, (2011). Qui- quitosana. TPP- tripolifosfato.

Neste método, a quitosana (QUIT) é dissolvida em solução aquosa ácida para obter a solução catiônica de QUIT. Depois, esta solução é adicionada à solução TPP aniônica sob constante agitação. A QUIT sofre gelificação iônica devido à complexação entre o poliânion TPP e QUIT catiônica por forças eletrostáticas e precipita para formar partículas esféricas (CALVO, REMUNÁN-LÓPEZ, & VILA-JATO ALONSO, 1997; YANG et al., 2011; KEAWCHAOON & YOKSAN, 2011; SETTA; KEGERE; MAMDOUH, 2019) (Figura 12).

Figura 12 – Esquema de preparação de nanopartículas de quitosana pela técnica da gelificação iônica



Fonte: Adaptado de SETTA; KEGERE; MAMDOUH, (2019).

As nanopartículas de quitosana com o TPP são sistemas promissores para o encapsulamento e entrega de proteínas (AVADI et al., 2009), genes (CSABA, KÖPING-HÖGGÅRD, & ALONSO, 2009), drogas hidrofílicas e hidrofóbicas (TRAPANI et al., 2011), vitaminas (LUO et al., 2011), óleos essenciais (OEs) (HOSSEINI et al., 2013), e compostos polifenólicos (Keawchaoon & Yoksan, 2011). Keawchaoon e Yoksan (2011) revelaram que o encapsulamento do carvacrol em nanopartículas de quitosana, o sistema poderia controlar sua liberação e manter as suas propriedades funcionais. Dessa forma, a técnica da gelificação iônica foi a escolhida como metodologia do presente estudo.

Várias técnicas podem ser usadas para caracterizar as nanopartículas poliméricas de quitosana. Algumas das caracterizações amplamente descritas são as de tamanho médio e distribuição de partícula, índice de polidispersão (Pdi) e mobilidade eletrostática (potencial zeta) das partículas (PRADO-AUDELO et al., 2020; KHALIFA; RASOOL, 2017; LIU et al., 2013), técnicas de microscopia para verificar aspectos morfológicos (KHALIFA; RASOOL, 2017; LIU et al., 2013), espectroscopia infravermelho por transformadora de *Fourier* (FTIR) para determinar a estrutura e interações químicas dos componentes das nanopartículas (KHALIFA; RASOOL, 2017; LIU et al., 2013), difração de raios X para determinar a cristalinidade, e análises quantitativas para determinar a eficiência de encapsulação e revestimento de nanopartículas de quitosana (LIU et al., 2013).

A hipótese do trabalho é a obtenção de um sistema de liberação controlada contendo carvacrol encapsulado em nanopartículas como uma abordagem inovadora para o tratamento da LV. Neste contexto, a preparação de sistemas de liberação controlada, nesse caso, nanopartículas contendo carvacrol consiste num importante avanço na terapêutica tradicional repercutindo em um impulso acadêmico e científico, vislumbrando o desenvolvimento de um produto comercial e uma alternativa em potencial no tratamento da LV.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanopartículas de quitosana contendo carvacrol e avaliar a atividade *in vitro* frente a *L. infantum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nanopartículas de quitosana (NPQui)
- Encapsular o carvacrol em NPQui;
- Realizar a caracterização físico-química das NPQui e NPCar;
- Analisar o tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das NPQui e NPCar;
- Avaliar e calcular a IC_{50} *in vitro* da atividade das NPQui e NPCar sobre as formas promastigotas de *L. infantum*;

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

- Quitosana de baixo peso molecular, grau de desacetilação 75-85% (Sigma-Aldrich[®])
- Ácido acético glacial P.A. (Química Moderna[®])
- Tripolifosfato de sódio (TPP) P.A. (Dinâmica[®])
- Carvacrol 99% (Sigma-Aldrich[®])

4.2 SOLUÇÃO DE QUITOSANA

As soluções de quitosana foram preparadas nas concentrações em 0,05% *m/v*, 0,1% *m/v* e 0,2% *m/v* em solução de ácido acético a 1% (*v/v*). Essa mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas e logo após esse processo foi feita filtragem da solução para remoção de material insolúvel.

4.3 ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

As nanopartículas de quitosana foram preparadas pelo método de gelificação iônica com adaptações de (CALVO et al., 1997; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; HADIDI et al., 2020). Para analisar a influência da concentração QUI:TPP para obter sistemas nanoestruturados, preparou-se 9 formulações utilizando a mistura de soluções nas concentrações de QUI e TPP conforme a tabela 2. Foi utilizada soluções de quitosana preparadas nas concentrações de 0,05% *m/v*, 0,1% *m/v* e 0,2% *m/v* em solução de ácido acético a 1% (*v/v*), bem como as soluções de TPP em água destilada nas concentrações de 0,05% *m/v*, 0,1% *m/v* e 0,5% *m/v*.

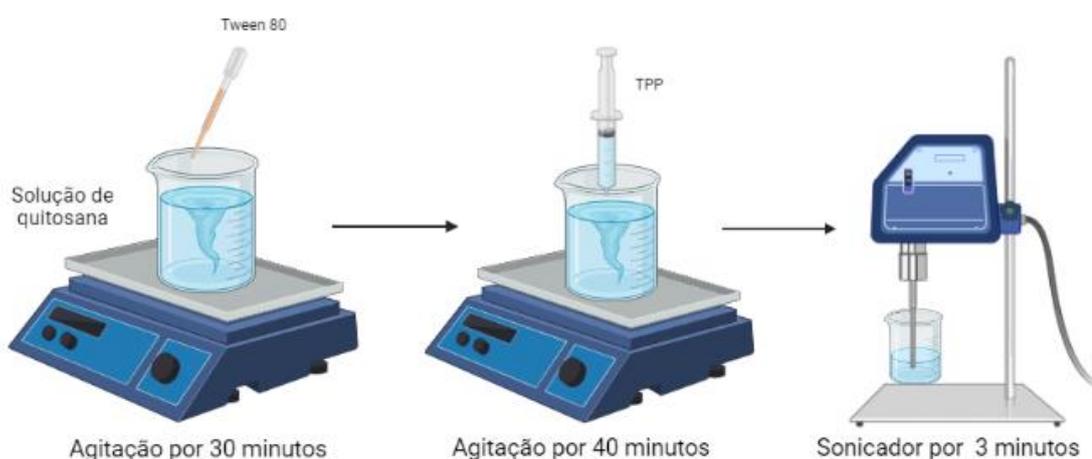
Tabela 2 – Concentrações de QUI/TPP das formulações de nanopartículas.

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES (% <i>m/v</i>) | |
|---------|---|------------------|
| | QUI | TPP |
| A1 | 0,05% <i>m/v</i> | 0,05% <i>m/v</i> |
| A2 | 0,1% <i>m/v</i> | 0,05% <i>m/v</i> |
| A3 | 0,2% <i>m/v</i> | 0,05% <i>m/v</i> |
| B1 | 0,05% <i>m/v</i> | 0,1% <i>m/v</i> |
| B2 | 0,1% <i>m/v</i> | 0,1% <i>m/v</i> |
| B3 | 0,2% <i>m/v</i> | 0,1% <i>m/v</i> |
| C1 | 0,05% <i>m/v</i> | 0,5% <i>m/v</i> |
| C2 | 0,1% <i>m/v</i> | 0,5% <i>m/v</i> |
| C3 | 0,2% <i>m/v</i> | 0,5% <i>m/v</i> |

Fonte: Autoria própria.

Para preparar 20 ml de cada amostra, em 10 ml de solução de quitosana foi adicionado 0,0032g de Tween 80. Essa mistura foi homogeneizada em agitação magnética por 30 minutos a uma temperatura de 50°. Em seguida, sob agitação magnética, foi adicionado 10 ml da solução de TPP gota a gota à solução de quitosana sob agitação por 40 minutos. Por fim, a dispersão foi sonicada por 3 (três) minutos a uma amplitude de 30, conforme a Figura 13. Foram formulados nanopartículas de quitosana contendo carvacrol (NPCar) e nanopartículas de quitosana sem o princípio ativo (NPQui). As amostras foram analisadas macroscopicamente quanto a cor, odor, presença de precipitação e a visualização do efeito Tyndall e analisadas físico-quimicamente. As formulações com melhores resultados de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram selecionadas para encapsular o carvacrol.

Figura 13 – Preparação das nanopartículas de QUI/TPP



Created in BioRender.com 

Fonte: Autoria própria, 2022.

4.4 FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CARVACROL

As NPCar seguiram o mesmo método de preparação das NPQui. 10 mL de solução aquosa de QUI (0,1%-0,2% *m/v*) e Tween 80 (0,0032g) foram mantidos sob agitação

magnética por 30 min a uma temperatura de 50°. Logo em seguida, o carvacrol nas proporções 1:1 e 1:2 v/v (quitosana/carvacrol) foi adicionado à solução aquosa de quitosana e homogeneizada utilizando agitação magnética por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionada gota a gota 10 mL de solução de TPP (0,05%-0,1% m/v) sob agitação magnética por 40 minutos. Ao final, a dispersão foi sonicada no Sonicador Ultrassônico (Qsonica Q55, USA.) por 3 (três) minutos a uma amplitude de 30 e potência 55w.

Após a preparação, amostras foram analisadas macroscopicamente quanto a cor, odor, presença de precipitação e a visualização do efeito Tyndall nas formulações. Posteriormente, foram realizadas as análises de caracterizações físico-químicas das NPcar.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOPARTÍCULAS

4.5.1 Tamanho e índice de polidispersão das partículas (Pdi)

Essas análises foram realizadas no Laboratório de Materiais e Biosistemas – LAMAB da Universidade Federal da Paraíba. Amostras das formulações (A1-C3) e posteriormente, das NPcar foram submetidas à análise através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, também conhecida como *Dynamic Light Scattering* (DLS). Valores de diâmetro médio, uma indicação da variância na distribuição de tamanhos, foram obtidos para amostras das NPQui e posteriormente, das NPcar através do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido), com ângulo de dispersão fixo em 90° e sob temperatura de 25 °C em triplicata. Os resultados foram analisados através do programa Zetasizer 7.13 (Malvern Panalytical, Reino Unido).

4.5.2 Análise do Potencial Zeta

Amostras das formulações de NPQui (A1-C3) e posteriormente, das NPcar foram analisadas quanto ao potencial zeta no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido). Os resultados foram obtidos por meio da média da leitura das triplicatas.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DAS NPQUI e NPCAR *IN VITRO*

4.6.1 Parasitos e cultura *in vitro*

Os ensaios biológicos da avaliação da atividade anti-leishmania das NPQui e NPcar *in vitro* foram realizados no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC), do Departamento de Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba seguindo o protocolo de Almeida et al. (2021).

Os parasitos utilizados durante a pesquisa foram promastigotas de espécie *L. infantum* da linhagem IOC579. As formas promastigotas dessa espécie de *Leishmania* foram mantidas *in vitro* em meio Schneider com pH 7 (Sigma-Aldrich, St, Louis, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, São Paulo, BRA), 1% de inibidor (penicilina 200 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL – Gibco, Br) e 1% de urina masculina humana. As culturas de *L. infantum* foram mantidas em incubação à uma temperatura de 26°C em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D) com passagem de células semanalmente.

4.6.2 Avaliação da atividade antileishmania pelo ensaio com MTT sobre formas promastigotas de *L. infantum*.

Foi avaliado a atividade antileishmania das NPQui e NPCar utilizando o teste do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Esse método é baseado na atividade de enzimas desidrogenases citosólicas e mitocondriais, que reduzem o MTT e formar um produto de coloração azul, o sal de formazan. Em placa de 96 poços foram adicionadas 100 µL de meio Schneider suplementado, promastigotas de *L. infantum* ajustadas a 4×10^7 parasitas/poço, as formulações de nanopartículas a serem testadas, o carvacrol isolado e o fármaco de referência em concentrações pré-estabelecidas. Além desses poços o controle negativo e controle do meio foram utilizados. O carvacrol isolado (1mg/mL), NPQui, NpCar foram adicionados nos poços, previamente diluídas em meio Schneider suplementado para um volume de 100 µL/poço nas concentrações seriadas de 50 a 0,39 µg/ml; e de 10 a 0,078 µg/mL para a Anfotericina B[®].

Posteriormente, a placa foi incubada por 72 h em estufa B.O.D à temperatura de 26 °C. Após o tempo de incubação, foi adicionado 10 µL de MTT e incubados por mais 4 h em estufa B.O.D a 26 °C, e em seguida foi adicionado 100 µL do SDS a 78% para dissolução dos cristais de formazan e por último, foi realizada leitura a 540 nm em espectrofotômetro (Biotek modelo Elx800). O experimento foi feito em triplicata.

Os resultados foram expressos em valores de concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (IC₅₀), sendo o controle negativo o meio Schneider suplementado, considerado como 0% de inibição do crescimento dos parasitas, e o controle positivo foi realizado com a Anfotericina B[®].

4.6.3 Análise estatística

Os tratamentos realizados foram avaliados em triplicata, e analisados com o auxílio do software *GraphPad Prism* 5.0 (San Diego,CA). A concentração inibitória de 50% do

crescimento (IC_{50}) foi calculada usando curvas dose-resposta e intervalos de 95% de confiança foram incluídos. O valor de IC_{50} (concentração da droga que inibem o crescimento dos parasitos em 50%) foi calculado com o auxílio do software *GraphPad Prism 5.0*. A análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida por um pós-teste Tukey, tomando um valor de $p < 0,05$ como o nível mínimo necessário para a significância estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

A preparação das nanopartículas se deu de forma simples e fácil pela técnica da gelificação iônica. Sendo possível reproduzir e obter as nanopartículas de quitosana utilizando o TPP como agente reticulante. Observou-se que ao final da preparação, as amostras tinham aspectos macroscópicos diferentes. A Figura 14 mostra o aspecto macroscópico das formulações preparadas com as diferentes concentrações de QUI e TPP. As amostras se caracterizavam visualmente como formulações transparentes e estáveis (A2, A3 e B3), e turvas (A1, B1, B2) e com formação de precipitados (C1, C2 e C3).

Figura 14 – Amostras das formulações de NPQui



Fonte: arquivo pessoal

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOPARTÍCULAS

5.2.1 Diâmetro hidrodinâmico médio e Pdi

A tabela mostra os resultados do diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersividade e o potencial zeta das 9 amostras analisadas. Os resultados mostram que as amostras tinham diâmetros médios de partículas entre $89,43 \pm 0,774$ nm a $1794 \pm$ nm, com exceção da amostra C3 que mostrou um diâmetro médio de $13,54 \pm 1,49$ nm (Tabela 3).

Tabela 3 – Tamanho de partículas, Pdi e potencial zeta das formulações A1-C3

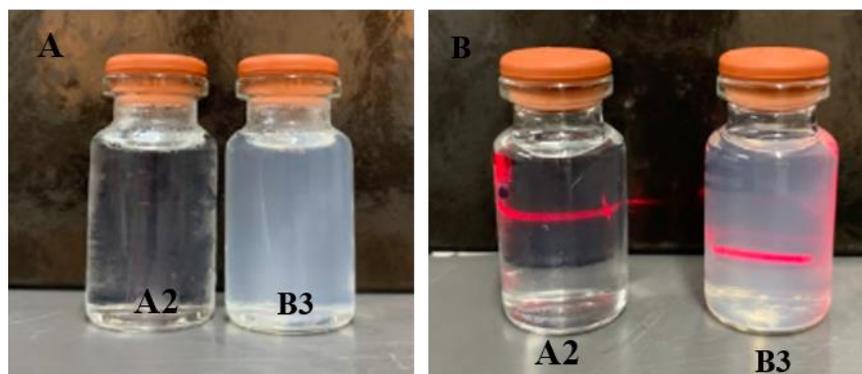
| AMOSTRA | CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES | | Diâmetro (nm) | Pdi | Zeta (mV) |
|---------|----------------------------|------------------|-------------------|-------|-----------|
| | QUI | TPP | | | |
| A1 | 0,05% <i>m/v</i> | 0,05% <i>m/v</i> | 1794 ± 0,146 nm | 0,476 | 6,04 |
| A2 | 0,1% <i>m/v</i> | 0,05% <i>m/v</i> | 89,43 ± 0,774 nm | 0,168 | 12,8 |
| A3 | 0,2% <i>m/v</i> | 0,05% <i>m/v</i> | 161,26 ± 0,378 nm | 0,475 | 36,7 |
| B1 | 0,05% <i>m/v</i> | 0,1% <i>m/v</i> | 362,63 ± 170 nm | 0,800 | 4,9 |
| B2 | 0,1% <i>m/v</i> | 0,1% <i>m/v</i> | 1536 ± 0,022 nm | 0,609 | 4,1 |
| B3 | 0,2% <i>m/v</i> | 0,1% <i>m/v</i> | 147,36 ± 0,665 nm | 0,228 | 13,1 |
| C1 | 0,05% <i>m/v</i> | 0,5% <i>m/v</i> | 178,66 ± 32 nm | 0,417 | 0,80 |
| C2 | 0,1% <i>m/v</i> | 0,5% <i>m/v</i> | 13,54 ± 1,49 nm | 0,339 | 2,85 |
| C3 | 0,2% <i>m/v</i> | 0,5% <i>m/v</i> | 1100 ± 1412 nm | 0,886 | 3,61 |

Fonte: autoria própria

Verificou-se que o aumento das concentrações das soluções de TPP em relação a solução de QUI para a preparação das amostras (A1-B1-C1), resultou em formulações com tamanho médio de partículas menores, porém influenciou os seus valores de Pdi, em 0,476, 0,800 e 0,417, respectivamente. Valores >0,3 de Pdi, caracterizam-se em sistemas polidispersos que apresentam mais de uma população de partículas no meio, o que acaba influenciando na estabilidade do sistema, visto que as partículas podem tender a se agrupar (ZHANG e KOSARAJU et al., 2007). Sendo assim, esses resultados colaboram com os estudos de Sullivan et al. (2018), que demonstram que o aumento da concentração do TPP resulta em sistemas polidispersos e com valores de Pdi mais altos.

Em comparação com anteriores, as amostras A2 e B3 com concentrações QUI/TPP nas proporções de massa 2:1, tiveram tamanhos de partículas em 89,43±0,774 nm e 147,36±0,665 nm e Pdi de 0,168 e 0,228, respectivamente, indicando serem excelentes sistemas para o encapsulamento de fármacos e com homogeneidade (Figura 15). Sistemas coloidais com Pdi >0,3 são caracterizados como sistemas monodispersos, ou seja, sistemas caracterizados com uma maior uniformidade de distribuição das nanopartículas (ZHANG e KOSARAJU et al., 2007). Esses resultados colaboram com o Sullivan et al. (2018), utilizando a razão de massa Qui:TPP na proporção 3:1, obtiveram NPQui estáveis com tamanho médio de partícula em 90,5 nm e Pdi 0,164.

Figura 15 - A – Aspecto macroscópico das formulações de NPQui A2 e B3. B - Visualização do efeito Tyndall nas amostras A2 e B3



Fonte: arquivo pessoal.

Foi possível analisar, que quando as formulações tinham concentrações QUI/TPP na proporção de massa 1:1 (A1 e B2), tinham tamanhos de partículas maiores que 1,000 nm e Pdi de 0,476 e 0,609, respectivamente. Estudos de Sullivan et al. (2018), mostram que as proporções de massa de Qui:TPP em 1:1 resultou em formulações coloidais turvas e com aglomerados, caracterizadas com tamanhos de partículas e Pdi altos e redução do potencial Zeta. Supostamente, entende-se que quando as concentração de Qui:TPP na mesma proporção, as mesmas não são capazes de formar nanopartículas com tamanhos menores, estáveis e homogêneas.

Ainda comparando as amostras A3 e C3, observe-se que a amostra C3 tinha um diâmetro médio de 1100 ± 1412 nm e Pdi 0,886, sendo esses valores maior que os encontrados na amostra A3. Suponha-se que a proporção da 0,2% g/v de QUI e 0,5% g/v de TPP usada na preparação da formulação C3, não seja a ideal para obter nanopartículas com tamanho abaixo de 500 nm.

5.2.2 Potencial Zeta

Pela análise do Potencial Zeta é possível medir a magnitude do potencial eletrostático ou das interações repulsivas entre as cargas das partículas e avaliar a estabilidade destas em soluções coloidais (DICKINSON, 2009). As nanopartículas de quitosana têm sua carga superficial determinada pelo grau de neutralização dos grupos $-NH_3^+$ pelos grupos polianiónicos do tripolifosfato de sódio (HU et al., 2008).

As amostras analisadas demonstraram ter carga superficial positivas, sendo esse característico de nanopartículas de quitosana. Observou-se que o potencial zeta das nanopartículas aumentou com o aumento da concentração de quitosana no sistema (A2, A3 e

B3). Isso era esperado, pois para formar as nanopartículas de quitosana, precisa ocorrer as interações entre os grupos -NH_3^+ protonados da quitosana e os fosfatos do TPP (KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011). Sendo assim, quanto maior a concentração de quitosana, mais grupos -NH_3^+ estarão disponíveis no meio e maior será o potencial zeta da amostra.

As amostras A2, A3 e B3 tiveram um potencial Zeta de 12,8 mV, 36,7 mV 13,1 mV, respectivamente. Isso demonstra que foram obtidas formulações moderadamente estáveis, considerando que sistemas nanoestruturados com cargas superficiais de ± 30 mV são menos suscetíveis a forças de aglomeração e desestabilização, tais como forças de Van der Waals, movimento browniano ou interações entre as partículas (GOKCE et al., 2014).

Esses achados colaboram com o estudo de Hadidi et al. (2020), que desenvolveram nanopartículas de QUI/TPP para encapsular o óleo do orégano e obtiveram um sistema com tamanho de $223,2 \pm 35,6$, Pdi 0,337 e potencial Zeta +34,50 mV.

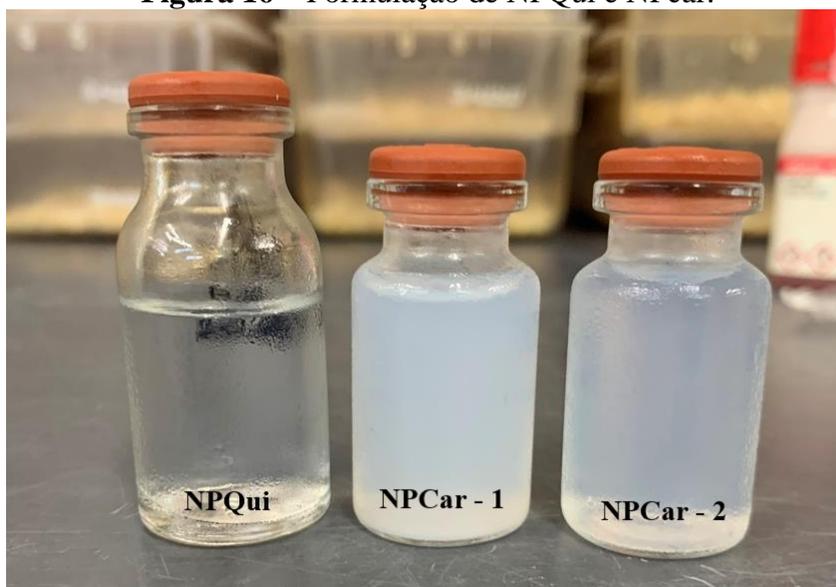
Dessa forma avaliando os aspectos macroscópicos e parâmetros físico-químicos: tamanho médio de partículas, Pdi e o potencial Zeta das formulações obtidas, foram selecionadas as formulações A2 e B3 para realizar o encapsulamento do carvacrol.

5.3 FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO CARVACROL

5.3.1 Aspectos macroscópicos

As NPcar formulados quando observados macroscopicamente se apresentaram com aspectos turvos, mas sem presença de precipitados (Figura 16). O efeito Tyndall é característico da formação de suspensões coloidais, que corresponde ao espalhamento de luz proporcionado por um sistema disperso quando irradiado por um feixe de luz (NETZ e ORTEGA, 2014). A dispersas de partículas em escala nanométrica em uma solução coloidal espalham a luz laser, formando um feixe de luz coerente, o que nos fornece uma técnica rápida para caracterizar sistemas coloidais nanométricos (LIMA, 2014). Indícios da presença de nanopartículas nas formulações A2-1 e A2-2 foram observados pela visualização do efeito de Tyndall nas amostras, o qual pode ser visto o trajeto da luz devido a dispersão de partículas presentes nas formulações de NPcar (Figura 17).

Figura 16 – Formulação de NPQui e NPcar.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 17– A- Visualização do efeito Tyndall nas amostras NPQui, A2-1 e A2-2



Fonte: arquivo pessoal.

5.3.2 Análises de tamanho de partícula, Pdi e potencial Zeta das NPcar.

A tabela 4 mostra os resultados das caracterizações físico-químicas obtidos das formulações de nanopartículas contendo o carvacrol. Pode-se notar que o aumento da concentração do carvacrol em relação a solução de quitosana resultou em nanopartículas de tamanhos e com carga superficial maiores em comparação a NPQui.

Tabela 4- análises de tamanho de partícula, Pdi e potencial zeta das NPQui e NPCar A2 e NPCar B3.

| AMOSTRAS | CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES (%g/mL) | | CARVACROL | TAMANHO (nm) | Pdi | Zeta (mV) |
|------------|------------------------------------|------------|-----------------------|------------------|-------|-----------|
| | QUI | TPP | | | | |
| A2 – NPQui | 0,1% m/v | 0,05% m/v | - | 89,43 ± 0,774 nm | 0,168 | 12,8 |
| NPCar – 1 | 0,1% m/v | 0,05% m/v | 1 mg/mL (1:2 Qui:Car) | 245,9 ± 3,466 nm | 0,175 | 15,4 |
| NPCar – 2 | 0,1% m/v | 0,05 % m/v | 1 mg/mL (1:1 Qui:Car) | 144,9 ± 1,388 nm | 0,224 | 15,7 |
| B3 – NPQui | 0,2% m/v | 0,1% m/v | - | 147,36±0,665 nm | 0,228 | 13,1 |
| NPCar – 1 | 0,2% m/v | 0,1 % m/v | 2 mg/mL (1:2 Qui:Car) | 699,5 ± 81,175nm | 0,428 | 13,2 |
| NPCar – 2 | 0,2% m/v | 0,1% m/v | 2 mg/mL (1:1 Qui:Car) | 679 ± 61,7372 nm | 0,39 | 14,9 |

Fonte: autoria própria.

As amostras NPCar - 1 e NPCar - 2 (formulação A2) apresentaram tamanho médio de partícula na faixa de 245,9-144,9 nm, respectivamente. Foram consideradas sistemas com distribuição de partículas homogêneas, com Pdi baixos (0,175 e 0,224) e o potencial zeta alto, dessa forma, pode-se dizer que foi possível encapsular o Car nos sistemas de forma eficiente e estável (Figura 16).

Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Bernal-Mercado (2022), que prepararam pela técnica da gelificação iônica nanopartículas de QUI contendo o carvacrol para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *P. aeruginosa*. Os autores tiveram como resultados, um tamanho médio de partículas de 140,3 nm, Pdi 0,2 e potencial Zeta alto em 14,4 mV. Os resultados ainda colaboram com outros estudos da literatura. Carvacrol encapsulados em NPQUIT funcionalizadas com β -ciclodextrina tiveram um tamanho médio de partícula de 175,2 (CAMPO et al., 2018). Nanopartículas de óxido de estanho-quitosan-poli(etilenoglicol) contendo carvacrol tiveram um tamanho médio de partícula 157,10 nm (TIAN et al., 2021).

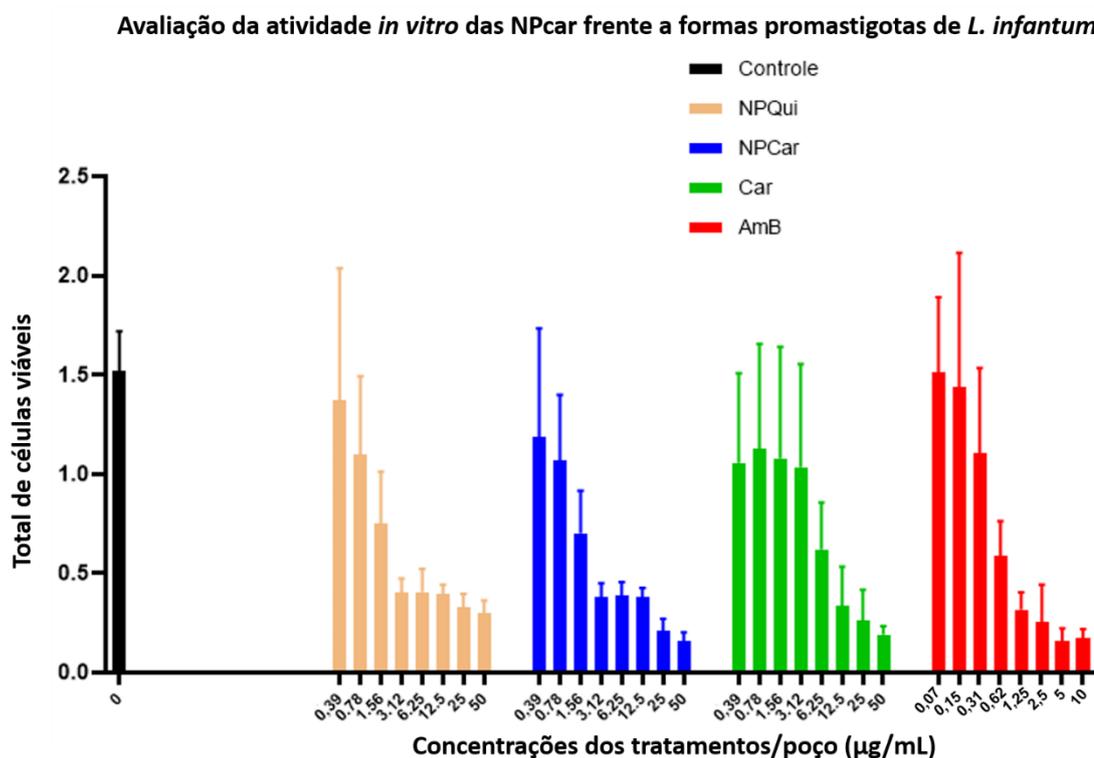
As formulações NPCar - 1 e NPCar - 2 (formulação B3) obtiveram tamanhos de partículas na faixa de 600 nm, possivelmente pode ser devido quanto maior a concentração do carvacrol proporcional em relação a concentração da solução de QUI, maior será o tamanho das partículas. De acordo com a literatura, estudos utilizando nanopartículas de <350 nm para a entrega de drogas, tiveram melhores resultados na eficácia para o tratamento da leishmaniose (SOUZA et al., 2018). Sendo assim, considerando a aplicação em meio biológico das NPCar contra formas promastigotas de *L. infantum* e os resultados de caracterização físico-química, a amostra NPCar– 1 (formulação A2) foi selecionada para os testes *in vitro* seguintes.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DAS NPQui e NPCAR *IN VITRO*

5.4.1 Avaliação da atividade *in vitro* das NPQui e NPCar frente a formas promastigotas de *L. infantum*

A atividade antileishmania foi avaliada *in vitro* pelo método do MTT sobre formas promastigotas de *L. infantum*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose visceral. O ensaio demonstrou a atividade efetiva do carvacrol sobre o crescimento dos parasitas da espécie *L. infantum*. O carvacrol livre apresentou potencial atividade de inibição do crescimento das formas promastigotas nas concentrações testadas. A forte atividade do carvacrol foi expressa pelo valor de IC₅₀ em 11,86 µg/mL, sendo esse dado menor com outros achados da literatura.

Figura 17 – Relação da densidade óptica (OD) de células nos poços após os tratamentos com CAR, NPQui, NPCar e a Anfotericina B®.



Os valores representam a média calculada em triplicata \pm erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa GraphPad Prisma 5.0.

Fonte: Autoria própria.

A atividade do carvacrol foi demonstrada contra promastigotas de cepas de *L. infantum*, com valores de IC₅₀ de 9,8 µg/mL (YOUSSEFI et al., 2019). Melo et al. (2013) avaliaram a

atividade anti-leishmania do carvacrol e demonstrou uma IC_{50} em formas promastigotas de *L. chagasi* de 2,3 $\mu\text{g/mL}$.

O presente trabalho é um estudo inédito da encapsulação do carvacrol em nanopartículas de quitosana para o tratamento da leishmaniose visceral. Os resultados demonstraram uma forte atividade biológica anti-leishmania das NPCar pela inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*, através de análises realizadas pelo cálculo da IC_{50} (Figura 17).

As NPQui apresentaram uma IC_{50} de 4,519 $\mu\text{g/mL}$, já as NPCar apresentaram uma IC_{50} de 2,659 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 5). Observa-se que houve uma diferença significativa $p < 0,05$ entre a atividade anti-leishmania nos poços tratados com a NPCar, em comparação com os poços tratados com o CAR isolado, esta atividade anti-leishmania das NPCAR pode ser devido o potencial do CAR e da Qui na inibição de parasitos de *Leishmania* spp. já demonstrados na literatura (YOUSSEFI et al., 2019; DAS et al., 2017; MORENO et al., 2015; CHAUBEY et al., 2018). Acredita-se que o CAR atua através em diferentes alvos nas mitocôndrias e em outras partes da célula de *Leishmania* ssp. (MONZONTE et al., 2018). Além disso, natureza lipofílica do CAR, permite que ele atravesse a membrana celular com facilidade, tornando-a impermeável a prótons e íons, afetando assim funções enzimáticas do parasita (SILVA et al., 20107; PASTOR, et al., 2015). Esses resultados demonstram que a encapsulação do CAR em NPQui otimiza os seus efeitos frente a *L. infantum*. Em comparação com os resultados da IC_{50} do nanosistema polimérico desenvolvido, nanopartículas lipídicas contendo CAR avaliadas frente a *L. amazonensis* demonstraram atividade com IC_{50} em 28.2 $\mu\text{g/mL}$ (Galvão et al., 2019).

Tabela 5 - Concentração inibitória de 50% (IC_{50}) de promastigotas de *L. infantum* com os tratamentos CAR, NPQui, NPCar e a Anfotericina B®.

| TRATAMENTOS | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------|--------------------------------|
| Car | 11,86 |
| NPQui | 4,519 |
| NPCar | 2,659* |
| Amb | 1,429 |

Os valores representam a média da IC_{50} calculada em triplicata \pm erro padrão da média. Para este cálculo foi utilizado o modelo de regressão linear com o programa GraphPad Prisma 5.0. *Diferença significativa $p < 0,05$ entre NPCar e Car.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados preliminares do presente estudo revelam que as NPCar podem ser candidatos promissores a terapêutica da leishmaniose visceral, visto que apresentaram uma

atividade relevante para as formas promastigotas de *L. infantium*. No entanto, ensaios posteriores com formas amastigotas, de citotoxicidade serão necessários para melhor avaliar a sua atividade biológica.

6. CONCLUSÃO

No estudo pré-formulação das nanopartículas de QUI/TPP pela da técnica da gelificação iônica, foi possível obter sistemas coloidais com partículas em tamanho manométricos, com índices de polidispersão baixos e carga superficial positivos e altos.

Entre as formulações preparadas, as que tiveram melhores resultados foram as amostras A2 e B3. Ambas foram caracterizadas físico-quimicamente como excelentes sistemas para o encapsulamento de drogas e com homogeneidade e estabilidade.

A encapsulação do carvacrol se deu de forma fácil, rápida e eficiente, com destaque para a formulação A2. As amostras A2 contendo o carvacrol apresentaram tamanho médio de partícula na faixa de 144,9 nm, foram consideradas sistemas com distribuição de partículas homogêneos, com Pdi baixos (0,175 e 0,224) e o potencial zeta alto.

A análise *in vitro* da atividade anti-leishmania demonstrou uma forte inibição das formas promastigotas da *L. infantium* das NPCar com uma IC_{50} de 2,659 $\mu\text{g/mL}$, em comparação com as NPQui que obtiveram uma IC_{50} de 4,519 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados do presente estudo revelam que as NPCar podem ser candidatos promissores a terapêutica da leishmaniose visceral, visto que apresentaram uma atividade relevante para as formas promastigotas de *L. infantium*. Todavia, ensaios posteriores com formas amastigotas, de citotoxicidade se fazem necessários para melhor avaliar a sua atividade biológica.

7. REFERÊNCIAS

- AARA, Naushin et al. Clinco-Epidemiologic Study of Cutaneous Leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 89, n. 1, p.111-115, 2013.
- ABDOU, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresour. Technol.**, 99 (5): 1359, 2008.
- AGNIHOTRI, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., & AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 100, 5–28, 2004.
- ALCOLEA, P. J. et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497-1516, 2010.
- ALMEIDA, Fernanda S.; SOUSA, Gleyton L.s.; ROCHA, Juliana C.; RIBEIRO, Frederico F.; OLIVEIRA, Márcia Rosa de; GRISI, Teresa Cristina Soares de Lima; ARAĐJO, Demetrius A.M.; NOBRE, Michelangela S. de C.; CASTRO, Rosane N.; AMARAL, Ian P.G. *In vitro* anti-*Leishmania* activity and molecular docking of spiro-acridine compounds as potential multitarget agents against *Leishmania infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 49, p. 128289, out. 2021.
- ALMEIDA et al. Nanotechnological Strategies for Treatment of Leishmaniasis—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 13, p. 117–133, 2017.
- ANITHA, A.; SOWMYA, S.; SUDHEESH KUMAR, P.T.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K.P.; EHRlich, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progr. Polym., Sci.**, 39 (9): 1644, 2014.
- AVADI, M. R., SADEGHI, A. M. M., MOHAMMADPOUR, N., ABEDIN, S., ATYABI, F., DINARVAND, R. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6, 58–63, 2009.
- BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology: Academic Press**, 64, p.1-458, 2007.
- BELO, Vinícius Silva; WERNECK, Guilherme Loureiro; BARBOSA, David Soeiro; SIMÕES, Taynãna César; NASCIMENTO, Bruno Warley Leandro; SILVA, Eduardo Sérgio da; STRUCHINER, Claudio José. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. 21-82, 25 abr. 2013.
- BERNAL-MERCADO, A. T.; JUAREZ, J.; VALDEZ, M. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L.; ENCINAS-BASURTO, D. Hydrophobic Chitosan Nanoparticles Loaded with Carvacrol against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 699, 21 jan. 2022.

BNYAN, I.; ABID, A.; OBIED, H. Antibacterial activity of carvacrol against different types of bacteria. **Journal of Natural Science Research**, 4, 13–16, 2014.

BRUNI et al. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **International Journal of Nanomedicine**, 12, p. 5289–5311, 2017.

CALVO, P., REMUNÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L., & ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan–polyethylene oxide nanoparticles as protein carrier. **Journal of Applied Polymer Science**, 63, 125–132, 1997.

CAMPOS, E. V. R.; PROENÇA, P. L. F.; OLIVEIRA, J. L.; PEREIRA, A. E. S.; RIBEIRO, L. N. M.; FERNANDES, F. O.; GONÇALVES, K. C.; POLANCZYK, R. A.; PASQUOTO-STIGLIANI, T.; LIMA, R. Carvacrol and linalool co-loaded in β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 76-23, 16 maio 2018.

CHAUBEY, P et al. Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against *Leishmania donovani*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 111, p.109-120, 2018.

CHAUBEY, P.; MISHRA, B. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1101-1108, jan. 2014.

CHEN, K. et al. Edible flower essential oils: A review of chemical compositions, bioactivities, safety and applications in food preservation. **Food Research International**, v. 139, p. 109809, 1 jan. 2021.

CIRO; ROJAS; SALAMANCA. Synthesis, Characterisation and Biological Evaluation of Ampicillin–Chitosan–Polyanion Nanoparticles Produced by Ionic Gelation and Polyelectrolyte Complexation Assisted by High-Intensity Sonication. **Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1758, 25 out. 2019.

CSABA, N., KÖPING-HÖGGÅRD, M., & ALONSO, M. J. Ionically crosslinked chitosan/ tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 382, 205–214, 2009.

DAS, S.; GHOSH, S.; DE, A.K.; BERA, T. Oral delivery of ursolic acid-loaded nanostructured lipid carrier coated with chitosan oligosaccharides: Development, characterization, in *vitro* and in *vivo* assessment for the therapy of leishmaniasis. **Int J Biol Macromol**, 102:996–1008, 2017.

DE-MATOS, S.P.; LUCCA, L.G., KOESTER, L.S. Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. **Talanta**, 195, p. 204-214, 2019.

DE-SOUZA, A. et al. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, 547, p. 421–431, 2018.

DE-SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 103, n. 4, p. 313-25, 2008.

DICKINSON, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1473-1482, ago. 2009.

EL-SABER BATIHA, G. et al. Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. **Food Control**, v. 126, p. 108066, 1 ago. 2021.

EZZ-ELDIN, Yousra M.; ABOSEIF, Ali A.; KHALAF, Marwa M. Potential anti-inflammatory and immunomodulatory effects of carvacrol against ovalbumin-induced asthma in rats. **Life Sciences**, v. 242, p.117-222, 2020.

FRANK, L.A. et al. Chitosan as a coating material for nanoparticles intended for biomedical applications. **Reactive And Functional Polymers**, v. 147, p.104-459, fev. 2020.

FREITAS-JUNIOR, L.H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2, p. 11–19, 2012.

GALVÃO, Juliana G.; SANTOS, Raquel L.; SILVA, Audrey R.s.T.; SANTOS, Jeferson S.; COSTA, Amanda M.B.; CHANDASANA, Hardik; ANDRADE-NETO, Valter V.; TORRES-SANTOS, Eduardo Caio; LIRA, Ana Amélia M.; DOLABELLA, Silvio. Carvacrol loaded nanostructured lipid carriers as a promising parenteral formulation for leishmaniasis treatment. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, p. 105335, jul. 2020.

GOKCE, Y., CENGIZ, B., YILDIZ, N., CALIMLI, A., & AKTAS, Z. Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. **Colloids and Surfaces a: Physicochemical and Engineering Aspects**, 462, 75-81, 2014.

GUERRA, Jorge Augusto de Oliveira et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 980, 2011.

GÜNES-BAYIR, A., KIZILTAN, H. S., KOCYIGIT, A., GÜLER, E. M., KARATAŞ, E., &TOPRAK, A. Effects of natural phenolic compound carvacrol onthe human gastric adenocarcinoma (AGS) cells *in vitro*. **Anti-CancerDrugs**,28(5), 522–530, 2017.

GUTIÉRREZ et al., New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis **Chem. Soc. Rev.** 45, p. 152-168, 2016.

GUO, Q. et al. Essential oils encapsulated by biopolymers as antimicrobials in fruits and vegetables: A review. **Food Bioscience**, v. 44, p. 101367, 1 dez. 2021.

HADIDI, M.; POURAMIN, S.; ADINEPOUR, F.; HAGHANI, S.; JAFARI, S. M. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: characterization, antioxidant and antibacterial activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 236, p. 116075, maio 2020.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p.50-56, 2013.

HU, B.; PAN, C.; SUN, Y.; HOU, Z.; YE, H.; HU, B.; ZENG, X. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan- tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7451-7458, 2008.

JHAVERI, Jhanvi; RAICHURA, Zarna; KHAN, Tabassum; MOMIN, Munira; OMRI, Abdelwahab. Chitosan Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications in Drug Delivery and Theranostics. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 272, 7 jan. 2021.

KAFSHGARI, Morteza Hasanzadeh; KHORRAM, Mohammad; MANSOURI, Mohsen; SAMIMI, Abdolreza; OSFOURI, Shahriar. Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system. **Iranian Polymer Journal**, v. 21, n. 2, p. 99-107, 3 jan. 2012.

KEAWCHAOON, L., & YOKSAN, R. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 84(1), 163–171, 2011.

KELLY, Shannon J.; HALASZ, Kathleen; SMALLING, Rudy; SUTARIYA, Vijaykumar. Nanodelivery of doxorubicin for age-related macular degeneration. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 45, n. 5, p. 715-723, 12 fev. 2019.

KHALIFA, AL-ZAHRAA M.; RASOOL, B. K. A. Optimized Mucoadhesive Coated Niosomes as a Sustained Oral Delivery System of Famotidine. **Aaps Pharmscitech**, v. 18, n. 8, p.3064-3075, 2017.

LARA-SILVA FDE O, MICHALSKY ÉM, FORTES-DIAS CL, FIUZA VDE O, PESSANHA JE, REGINA-SILVA S, DE AVELAR DM, SILVA MA, LIMA AC, DA COSTA AJ, MACHADO-COELHO GL, DIAS ES. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop*, 148:128-36, 2015.

LEI, Kai; WANG, Xinran; LI, Xiaozhou; WANG, Lin. The innovative fabrication and applications of carvacrol nanoemulsions, carboxymethyl chitosan microgels and their composite films. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 688-696, mar. 2019.

LIMA, Luís Spencer. Efeito Tyndall. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 3, p. 233-3, 30 out. 2014.

LIU, W. et al. Improved Physical and *in Vitro* Digestion Stability of a Polyelectrolyte Delivery System Based on Layer-by-Layer Self-Assembly Alginate–Chitosan-Coated Nanoliposomes. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p.4133-4144, 2013.

LUO, Y., ZHANG, B., WHENT, M., YU, L., & WANG, Q. Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol and its *in vitro* controlled release study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 85, 145–152, 2011.

LUQUE-ALCARAZ, A. G.; LIZARDI-MENDOZA, J.; GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; ARGÜELLES-MONAL, W.. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. **Rsc Advances**, v. 6, n. 64, p. 59250-59256, 2016.

MELO, J.O. et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, 128, p.110-115, 2013.

MIKUŠOVÁ, Veronika; MIKUŠ, Peter. Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9652, 6 set. 2021.

MIŁOS, M., & MAKOTA, D. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. **Food Chemistry**, 131(1), 296–299, 2012.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical journal of pharmaceutical research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MONZOTE L, GEROLDINGER G, TONNER M, SCULL R, DE SARKAR S, BERGMANN S, BACHER M, STANIEK K, CHATTERJEE M, ROSENAU T, GILLE L. Interaction of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. with mitochondria in *Leishmania* and other eukaryotes. *Phytother Res*. 32(9):1729-1740, 2018.

MONZOTE, L. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. **Experimental Parasitology**, 136, 20–26, 2014a.

MONZOTE, L. et al. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**, 21, p. 1048-1052, 2014b.

MORENO, E. et al. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 11, p. 2003–2012, 2015.

NASKAR, Sweet; KUOTSU, Ketousetuo; SHARMA, Suraj. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. **Journal Of Drug Targeting**, v. 27, n. 4, p. 379-393, 5 set. 2018.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. **Artmed**, Porto Alegre, 296 p, 2014.

NGAN, La Thi Kim; WANG, San-Lang; HIEP, Đinh Minh; LUONG, Phung Minh; VUI, Nguyen Tan; ĐINH, Tran Minh; DZUNG, Nguyen Anh. Preparation of chitosan nanoparticles by spray drying, and their antibacterial activity. **Research On Chemical Intermediates**, [S.L.], v. 40, n. 6, p. 2165-2175, 1 abr. 2014.

NO, J.H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, 155, p. 113-123, 2016.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. LEISHMANIOSES: Informe epidemiológico das Américas. Sistema de informação regional de leishmaniose (SisLeish) [Internet]. Washington, D.C.: OPAS; 2021. Disponível em: <
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>> Acessado em 15 de janeiro de 2022].

OPAS. Organización Pan-Americana de la Salud. Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. ISBN: 978-92-75-32190-4; 2020.

PASTOR, J. et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. **Acta Tropica**, 145, p. 31-38, 2015.

POHLMANN, A.R; FONSECA, F.N; PAESE, K; DETONI, C. B; CORADINI, K; BECK, R. C.R; GUTERRES; S. S. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, 10:623–638, 2013.

PRADO-AUDELO, María Luisa del; CABALLERO-FLORÁN, Isaac H.; SHARIFI-RAD, Javad; MENDOZA-MUÑOZ, Néstor; GONZÁLEZ-TORRES, Maykel; URBÁN-MORLÁN, Zaida; FLORÁN, Benjamín; CORTES, Hernán; LEYVA-GÓMEZ, Gerardo. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, v. 59, p. 101896, out. 2020.

RATHOD, N. B. et al. Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 733–748, 1 out. 2021.

REDDY, Dastagiri. Formulation and in vitro evaluation of antineoplastic drug loaded nanoparticles as drug delivery system. **African Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v. 7, n. 23, p. 1592-1604, 22 jun. 2013.

RIEZEK, Alaa et al. Activity of Chitosan and Its Derivatives against *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* In Vitro. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p.01772, 2019.

SANTOS, E.H. et al. Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. **LWT - Food Science and Technology**, 60, p. 583-592, 2015.

SAUNDERS, Eleanor C; MCCONVILLE, Malcolm J. Immunometabolism of *Leishmania* granulomas. **Immunology & Cell Biology**, v. 98, n. 10, p. 832-844, 8 set. 2020.

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

SERAFIM, Tiago D.; INIGUEZ, Eva; OLIVEIRA, Fabiano. *Leishmania infantum*. **Trends In Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 80-81, jan. 2020.

SHARIFI-RAD, Mehdi et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p.1675-1687, 2018.

SHETTA, Amro; KEGERE, James; MAMDOUH, Wael. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 731-742, abr. 2019.

SILVA, A.R.S.T. et al. Leishmanicidal Activity and Structure-Activity Relationships of Essential Oil Constituents. **Molecules**, 22, 815, p. 1-10, 2017.

SILVA, E. R. et al. Pharmacological Effects of Carvacrol in In vitro Studies: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 29, p.3454-3465, 2018.

SOUZA, Aline de; MARINS, Débora Soares Souza; MATHIAS, Samir Leite; MONTEIRO, Lis Marie; YUKUYAMA, Megumi Nishitani; SCARIM, Cauê Benito; LÖBENBERG, Raimar; BOU-CHACRA, Nádia Araci. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p. 421-431, ago. 2018.

SULLIVAN, D. J.; CRUZ-ROMERO, M.; COLLINS, T.; CUMMINS, E.; KERRY, J. P.; MORRIS, M. A. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 355-364, out. 2018.

SUNYOTO, T.; POLET, J. BOELAERT, M. Why miltefosine - a life-saving drug for - leishmaniasis is unavailable to people who need it the most. **BMJ Global Health**, 3, p. 1-10 2018.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J.C.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P.F.; DE-SOUZA, W. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. *PLoS Pathog.* 9(10):1003594, 2013.

TIAN, Z.; CHINNATHAMBI, A.; ALAHMADI, T. A.; MOHAN, S. K.; VEERARAGHAVAN, V. P.; JAGANATHAN, S. K. Anti-arthritis activity of Tin oxide-Chitosan-Polyethylene glycol carvacrol nanoparticles against Freund's adjuvant induced arthritis rat model via the inhibition of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 14, n. 9, p. 103293, set. 2021.

TRAPANI, A., DE GIGLIO, E., CAFAGNA, D., DENORA, N., AGRIMI, G., CASSANO, T. Characterization and evaluation of chitosan nanoparticles for dopamine brain delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 419, 296–307, 2011.

VERLEE, A; MINCKE, S; STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymer**, v. 164, p.268-283, 2017.
WANG, P.; WU, Y. A review on colloidal delivery vehicles using carvacrol as a model bioactive compound. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106922, 1 nov. 2021.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> Updated February 2022 (acessado em 15.01.2022).

YANAT, M.; SCHROËN, K. Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging. **Reactive And Functional Polymers**, v. 161, p. 104849, abr. 2021.

YANG, S. J., LIN, F. H., TSAI, H. M., LIN, C. F., CHIN, H. C., WONG, J. M. Alginate–folic acid-modified chitosan nanoparticles for photodynamic detection of intestinal neoplasms. **Biomaterials**, 32, 2174–2182, 2011.

YOUSSEFI, M. R. et al. *in vitro* and *in vivo* Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. **Molecules**, v. 24, n. 11, p.20-72, 2019.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, n. 43, v. 7, p. 2956-2966, 2007.

ANEXOS

Capítulo de Livro publicado no Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente

REVISÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E APLICAÇÕES DO
CARVACROL ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA

CAPÍTULO 25

**REVISÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E
APLICAÇÕES DO CARVACROL
ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA**

Joyce Cordeiro BORGES¹

Carlos Alberto Arcelly Santos BEZERRA²

Geórgia dos Santos ALBUQUERQUE²

Ulrich VASCONCELOS³

Elisângela Afonso De Moura KRETZSCHMAR^{3,4}

¹Mestranda do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, UFPB; ² Graduandos do curso de biotecnologia, UFPB; ³Professor do CBIOTEC/ UFPB;

⁴Orientadora/Professora do CBIOTEC/ UFPB
elisdob@gmail.com

RESUMO: O carvacrol é um monoterpene fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas como, por exemplo, orégano tomilho entre outros, responsável por atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-fúngica, imunomoduladora e anticancerígena. Todavia, o carvacrol apresenta algumas desvantagens, como insolubilidade em água, alta volatilidade, baixa biodisponibilidade e oxidação. As nanopartículas de quitosana podem ser consideradas promissoras no encapsulamento do carvacrol, sendo uma estratégia para proteger e melhorar a sua biodisponibilidade. O objetivo do presente artigo foi realizar uma revisão de literatura, através de um levantamento bibliográfico para analisar as atividades biológicas do carvacrol frente as nanopartículas de quitosana. A revisão da literatura foi realizada utilizando artigos científicos em inglês nas bases de dados eletrônicas Science Direct, PUBMED, Medline e Periódicos Capes publicados entre janeiro 2016 a outubro de 2021, através de uma combinação de