



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

IZABELE DE SOUZA ARAÚJO

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE NANOPARTÍCULAS DE PLA ENCAPSULADAS COM O DERIVADO 2 AMINO TIOFÊNICO SB83

João Pessoa

2024

Izabele de Souza Araújo

PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE NANOPARTÍCULAS DE PLA ENCAPSULADAS COM O DERIVADO 2 AMINO TIOFÊNICO SB83

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Coorientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

João Pessoa

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A663p Araújo, Izabele de Souza.

Preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da atividade anti-leishmania de nanopartículas de PLA encapsuladas com o derivado 2 amino tiofênico SB83 / Izabele de Souza Araújo. - João Pessoa, 2024.

98 f. : il.

Orientação: Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Nanopartícula poliméricas. 3. Derivado 2-amino tiofênico SB83. 4. Saúde pública. I. Mendonça Junior, Francisco Jaime Bezerra. II. Oliveira, Elquio Eleamen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.928.5(043)

Izabele de Souza Araújo

Preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da atividade anti-leishmania de nanopartículas de PLA encapsuladas com o derivado 2 amino tiofênico SB83

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Aprovada em: 19/09/2024

Documento assinado digitalmente
 FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIO
Data: 01/11/2024 15:06:33-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior
(Universidade Estadual da Paraíba)
Presidente/Orientador

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
(Universidade Federal da Paraíba)

Documento assinado digitalmente
 ELISANGELA AFONSO DE MOURA KRETZSCHMAR
Data: 01/11/2024 15:26:07-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dra. Elisangela Afonso de Moura Kretzschmar
(Universidade Federal da Paraíba)

*Dedico à minha mãe, cuja trajetória me ensinou que
nenhum desafio é insuperável quando enfrentado
com persistência e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder o discernimento necessário para trilhar os caminhos mais desafiadores, por iluminar minha mente nos momentos de incerteza e por renovar minha resiliência para recomeçar sempre que necessário.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior** por sua constante ajuda, paciência e disposição em cada etapa desta pesquisa. Suas palavras de incentivo e conselhos me guiaram nos momentos de incerteza. Minha eterna gratidão por todo o seu conhecimento compartilhado, que foi essencial para o desenvolvimento do meu senso crítico e para a concretização deste sonho.

Ao meu coorientador, **Professor Dr. Elquio Eleamen Oliveira**, que me acompanha desde a época da iniciação científica. Minha eterna gratidão, por me apresentar ao universo da nanotecnologia, despertando em mim uma paixão pela pesquisa que se tornou o alicerce deste trabalho. Sua paciência e dedicação foram fundamentais, especialmente no domínio do HPLC, onde cada detalhe aprendido, foi crucial para o sucesso desta pesquisa.

À minha mãe, **Mery Ruth Eustáquio Klingensmith**, minha eterna fonte de força e inspiração. Sou grata por tudo e por todo o incentivo por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu duvidava. Seus ensinamentos sobre trabalho árduo e dedicação me mostraram que é possível alcançar qualquer objetivo. Sua coragem e resiliência foram, e sempre serão, os pilares que guia minha vida.

Ao meu padastro **John Klingensmith**, cujo apoio foi inestimável durante todos esses anos de jornada acadêmica. Mesmo com seu jeito mais introspectivo, sempre demonstrou um imenso interesse e torcida pelo meu sucesso.

Ao meu noivo, **Carlos Henrique Lacerda Rodrigues**, meu mais sincero agradecimento pela paciência e por estar ao meu lado em cada etapa desta jornada. Obrigada por dividir comigo todos os desafios deste período, por ser minha âncora nos momentos de incerteza e minha força nas horas de cansaço. Por ser minha companhia constante, especialmente nas noites em que eu saía tarde do laboratório. Sua presença tornou tudo mais leve e possível.

À minha família, por compreenderem minha ausência em determinados momentos e por sempre me apoiar minhas escolhas, mesmo de longe.

A todos os meus colegas do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), **Alexia Dias, Janine Nunes, Natália Melo, Vitória Bernardo, Carlos, Luciana Maia, Priscilla Fernandes, Rodrigo Santos, Malu Reis, Adriana Alencar, Rodrigo Ribeiro,**

Ricardo e Michelle Pedrosa, minha gratidão por dividirem comigo toda esta jornada e pela grande amizade que construímos.

Às minhas amigas, **Alexia Dias**, minha dupla nas disciplinas e companheira de experimentos, sou grata pela troca de conhecimento e pela grande amizade que construímos. À **Camila Mello**, por estar ao meu lado em vários momentos nessa jornada científica, sua colaboração tornou essa caminhada mais rica. À **Carol Marinho**, que dividiu comigo grande parte dessa jornada, me fazendo companhia durante a escrita da dissertação. À **Jeniffer Venancio**, que, mesmo longe, sempre esteve presente me incentivando nesse processo.

À **Universidade Federal da Paraíba**, especialmente ao **Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB)**, a todo o corpo docente por todo o conhecimento compartilhado, que fizeram a diferença na minha formação.

À **Universidade Estadual da Paraíba**, especialmente ao **Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM)** e a **Central Multiusuário de Análises e Caracterização Químico-Biológica (CM-ACQuimBio)**, agradeço a estrutura física e por todos os recursos disponibilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Universidade Federal do Delta do Parnaíba**, especialmente ao Professor **Dr. Klinger Rodrigues**, pela parceria e pelas valiosas contribuições na realização dos testes biológicos.

Ao **Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA)**, e todos os professores e alunos do laboratório, pela colaboração. Especialmente ao professor Yuri e ao meu colega Luiz Henrique Amorim.

Aos Professores da banca examinadora, **Dr. Sócrates Golzio dos Santos e Dra. Elisângela Afonso** pela disponibilidade. Agradeço por todas as contribuições a este trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa (162314/2022-1), que foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (**PRONEX/FAPESQ**) pelo apoio financeiro (030/2023).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo suporte técnico científico através do Portal Periódicos.

*“A ciência progride quando as observações nos
forçam a mudar as nossas ideias preconcebidas.”*

Vera Rubin

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas globalmente, sendo um grave problema de saúde pública, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanoesferas poliméricas de poli (ácido láctico) (PLA) encapsuladas com o derivado 2-amino-tiofênico SB83, visando o aprimoramento da eficácia e/ou segurança do tratamento da leishmaniose cutânea. As nanoesferas foram preparadas utilizando o método da nanoprecipitação, seguido da validação de um método de quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme as diretrizes do ICH (Q2) e ANVISA. As nanoesferas foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação (EE) e cinética de liberação do fármaco. Ensaios *in vitro* foram realizados para determinar a citotoxicidade (CC₅₀) em macrófagos, a eficácia frente promastigotas (CI₅₀) e amastigotas axênicas (CE₅₀) em cepas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados indicaram que as nanoesferas com o SB83 em suspensão (NPSB83), liofilizadas (NPSB83FD) e liofilizadas com trealose (NPSB83TFD) apresentaram tamanhos médios de $205,7 \pm 4,75$ nm, $273,2 \pm 0,11$ nm e $207,6 \pm 0,08$ nm, respectivamente, com PDI de $0,274 \pm 0,04$, $0,425 \pm 0,03$ e $0,355 \pm 0,03$, e potenciais zeta (mV) de $-20,4 \pm 0,65$, $-19,6 \pm 0,12$ e $-18,1 \pm 0,19$, respectivamente. A EE foi de $64,92\% \pm 0,12$ e $88,43\% \pm 0,8$ para os métodos direto e indireto, respectivamente. Análises por microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a morfologia esférica e a distribuição uniforme das partículas, sem evidências de agregação. A cinética de liberação *in vitro* revelou uma liberação lenta do SB83 a partir das nanoesferas, alcançando 72,82% para NPSB83, 69,47% para NPSB83FD e 90,48% para NPSB83TFD durante 96 horas. O desenvolvimento do método analítico por CLAE para quantificação do SB83 foi linear (R^2 de 0,9999) e demonstrou seletividade com adição de excipiente das nanoesferas brancas. A repetibilidade e precisão intermediária demonstraram precisão, apresentando DPR% inferiores a 2%. O método foi exato e demonstrou taxas de recuperação entre 101,75% e 103,75%, com DPR% inferiores a 2%. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,12 µg/mL e 0,36 µg/mL, respectivamente, indicando sensibilidade na quantificação e detecção do SB83. Contudo, o método não foi robusto para variações no fluxo, temperatura e proporção da fase móvel. Os testes de citotoxicidade *in vitro* em macrófagos RAW 264.7 revelaram uma redução significativa ($p < 0,0001$) no efeito citotóxico do SB83 encapsulado nas nanoesferas (CC₅₀ entre $182,25 \pm 8,27$ e $194,63 \pm 9,42$) em comparação ao SB83 livre (CC₅₀ = $105,51 \pm 6,11$) e a miltefosina (CC₅₀ = $119,74 \pm 8,53$). Os ensaios de atividade anti-leishmania demonstraram que tanto o SB83 livre quanto encapsulado nas nanoesferas foram mais eficientes em inibir o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* do que a miltefosina, entretanto o SB83 apresentou os menores valores de CI₅₀ ($5,72 \pm 0,46$ µM). Frente as formas amastigotas axênicas não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as atividades do SB83 livre, nanoencapsulado e a miltefosina, entretanto todas as nanoesferas apresentaram índices de seletividade 50% superiores, promovendo um significativo ganho na segurança terapêutica. Portanto, as nanoesferas de PLA encapsuladas com SB83 são uma estratégia promissora para o tratamento da leishmaniose cutânea, oferecendo liberação sustentada do fármaco, estabilidade coloidal e ganhos na segurança terapêutica.

Palavras-chave: Nanopartícula Poliméricas; Derivado 2-amino tiofênico SB83; Leishmaniose cutânea.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease that affects millions of people globally and is a serious public health problem, especially in tropical and subtropical regions. This study aimed to develop and characterize polymeric nanospheres of poly(lactic acid) (PLA) encapsulated with the 2-amino-thiophene derivative SB83, aiming at improving the efficacy and/or safety of the treatment of cutaneous leishmaniasis. The nanospheres were prepared using the nanoprecipitation method, followed by the validation of a quantification method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to the ICH (Q2) and ANVISA guidelines. The nanospheres were characterized by size, polydispersity index (PDI), zeta potential, morphology, encapsulation efficiency (EE) and drug release kinetics. *In vitro* assays were performed to determine cytotoxicity (CC_{50}) in macrophages, efficacy against promastigotes (IC_{50}) and axenic amastigotes (EC_{50}) in *Leishmania amazonensis* strains. The results indicated that the nanospheres with SB83 in suspension (NPSB83), lyophilized (NPSB83FD) and lyophilized with trehalose (NPSB83TFD) presented average sizes of 205.7 ± 4.75 nm, 273.2 ± 0.11 nm and 207.6 ± 0.08 nm, respectively, with PDI of 0.274 ± 0.04 , 0.425 ± 0.03 and 0.355 ± 0.03 , and zeta potentials (mV) of -20.4 ± 0.65 , -19.6 ± 0.12 and -18.1 ± 0.19 , respectively. The EE was $64.92\% \pm 0.12$ and $88.43\% \pm 0.8$ for the direct and indirect methods, respectively. Transmission electron microscopy analyses confirmed the spherical morphology and uniform distribution of the particles, with no evidence of aggregation. The *in vitro* release kinetics revealed a slow release of SB83 from the nanospheres, reaching 72.82% for NPSB83, 69.47% for NPSB83FD and 90.48% for NPSB83TFD over 96 hours. The development of the analytical method by HPLC for SB83 quantification was linear (R^2 of 0.9999) and demonstrated selectivity with the addition of white nanosphere excipient. The repeatability and intermediate precision demonstrated precision, presenting RSD% lower than 2%. The method was accurate and demonstrated recovery rates between 101.75% and 103.75%, with RSD% lower than 2%. The detection and quantification limits were 0.12 $\mu\text{g/mL}$ and 0.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating sensitivity in the quantification and detection of SB83. However, the method was not robust to variations in flow, temperature and mobile phase ratio. *In vitro* cytotoxicity tests in RAW 264.7 macrophages revealed a significant reduction ($p < 0.0001$) in the cytotoxic effect of SB83 encapsulated in nanospheres (CC_{50} between 182.25 ± 8.27 and 194.63 ± 9.42) compared to free SB83 ($CC_{50} = 105.51 \pm 6.11$) and miltefosine ($CC_{50} = 119.74 \pm 8.53$). Anti-leishmanial activity assays demonstrated that both free SB83 and SB83 encapsulated in nanospheres were more efficient in inhibiting the growth of promastigote forms of *Leishmania amazonensis* than miltefosine; however, SB83 presented the lowest IC_{50} values (5.72 ± 0.46 μM). Against axenic amastigote forms, no statistically significant difference was observed between the activities of free SB83, nanoencapsulated SB83 and miltefosine, however all nanospheres presented selectivity indices 50% higher, promoting a significant gain in therapeutic safety. Therefore, PLA nanospheres encapsulated with SB83 are a promising strategy for the treatment of cutaneous leishmaniasis, offering sustained drug release, colloidal stability and gains in therapeutic safety.

Keywords: Polymeric Nanoparticles; 2-amino thiophene derivative SB83; Cutaneous leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do SB83	19
Figura 2 – Ciclo de vida do parasita	24
Figura 3- Representação esquemática das nanocápsulas e nanoesferas	30
Figura 4 - Síntese do PLA	37
Figura 5- Três formas estéreo de lactídeos de PLA	37
Figura 6 - Produção das nanoesferas de SB83 pelo método da nanoprecipitação	43
Figura 7- Morfologia das nanoesferas obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão: (A) BNP e (B) NPSB83	59
Figura 8- Cinética de liberação in vitro do SB83 das nanoesferas NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD ao longo de 96 horas.	60
Figura 9- Influência dos fatores A: proporção de metanol, B: volume de injeção, C: fluxo, nas variáveis dependentes: tempo de retenção, fator caudal e número de pratos teóricos.	65
Figura 10 - Avaliação de interferêntes utilizando o sobrenadante das BNP em MeOH.	66
Figura 11 - Avaliação de interferentes no cromatograma utilizando o sobrenadante das BNP com adição de 10 µg/ml de solução padrão de SB83 e MeOH	66
Figura 12 - Espectro UV-vis do SB83.....	67
Figura 13 – Gráfico de linearidade do SB83	68
Figura 14- Análise da distribuição normal dos resíduos do modelo de regressão linear para a concentração e resposta do método analítico.	71
Figura 15 - Avaliação da distribuição normal dos resíduos no modelo de regressão linear ...	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Modelos matemáticos para determinar o perfil de liberação.....	46
Tabela 2- Parâmetros do experimento de Box-Behnken.	49
Tabela 3 - Análise comparativa do tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta entre as NPSB83 com as BNP, NPSB83FD e NPSB83TFD	54
Tabela 4 – Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> do SB83 das NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD.....	61
Tabela 5 – Design experimental Box-Behnken com as variáveis independentes. A: Metanol, B: Volume de injeção, C: Fluxo) e as variáveis resposta (Tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos	63
Tabela 6 - Análise estatística da superfície de resposta do modelo quadrático para as variáveis: tempo de retenção, fator de cauda e números de prato teóricos.	64
Tabela 7 - Coeficientes do modelo de Regressão linear.....	69
Tabela 8- Avaliação das concentrações e dos DPR% da curva de calibração encontrados a partir da área do cromatograma do método de quantificação do SB83	69
Tabela 9- Análise Estatística dos Coeficientes do Modelo de Regressão Linear – IC 95% ...	70
Tabela 10 - Teste F-ANOVA para significância da curva de calibração do SB83	70
Tabela 11- Análise dos Resíduos e Resíduos Padronizados para as Observações do Modelo	71
Tabela 12 – Avaliação da repetibilidade (intra-dia) do analista 1.	74
Tabela 13 - Comparação da precisão intermediária inter-dia das concentrações testadas entre os analistas 1 e 2 em dois dias diferentes, utilizando o DPR% e o Teste t para médias.	75
Tabela 14 - Exatidão das concentrações de 8, 10 e 12 µg/mL através do DPR% e da taxa de recuperação (%).	76
Tabela 15 - Avaliação da robustez utilizando o ponto central da solução padrão do SB83 (10 µg/mL) através da variação do fluxo, temperatura da coluna e proporção da fase móvel.	77
Tabela 16 – Determinação da citotoxicidade (CC ₅₀) em macrófagos RAW 264.7 das BNP, NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD, em comparação com o fármaco livre (SB83), e o fármaco referência miltefosina.	79
Tabela 17 - Atividade anti-leishmania (CI ₅₀ e CE ₅₀) e índice de seletividade (IS) das NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD comparadas ao fármaco livre (SB83), e à miltefosina frente à <i>Leishmania amazonensis</i>	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AQbD – Desenvolvimento de Qualidade por Design – Quality by design
- ART-NLCs – Nanocarreadores lipídicos encapsulados com artemether
- BNP – Nanopartículas de PLA sem o fármaco
- BOD – Demanda biológica de oxigênio
- CC₅₀ – Concentração citotóxica média
- CE₅₀ – Concentração efetiva
- CI₅₀ – Concentração inibitória
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- DAD - Detector de arranjo linear de diodos
- DLS – Espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DOE – Design of Experiments (Planejamento de Experimentos)
- DPR% – Desvio padrão relativo
- EE – Eficiência de encapsulamento
- EMA – European Medicines Agency
- FBS – Soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
- Fc μ R – Receptor Fc da imunoglobulina M (fc β)
- FDA – Food and Drug Administration
- GI – Graus de liberdade
- ICH – International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
- IFAs – Insumos farmacêuticos ativos
- IFN- γ – Interferon-gama
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-4 – Interleucina 4
- IS – Índice de Seletividade
- LC – Leishmaniose cutânea
- LDPC – Leishmaniose dérmica pós-calazar
- LMC – Leishmaniose mucocutânea

- LOD – Limite de detecção
- LOQ – Limite de quantificação
- LPS – Lipopolissacarídeos
- LV – Leishmaniose visceral
- MeOH – Metanol
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MQ – Quadrado médio (Mean Square)
- MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- NPSB83 – Nanopartículas de PLA encapsulada SB83
- NPSB83FD – Nanopartículas de PLA encapsulada com o SB83 liofilizadas
- NPSB83TFD – Nanopartículas de PLA encapsulada com o SB83 liofilizadas com 5% de trealose
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
- PDI – Índice de polidispersão
- PDLA – Poli(D-lactídeo)
- PDLLA – Poli(DL-lactídeo)
- PLA – Ácido polilático
- PLGA – Copolímero de ácido polilático-co-ácido glicólico
- PLLA – Poli(L-lactídeo)
- PNPs – Nanopartículas poliméricas
- PVDF – Difluoreto de polivinilideno
- Rt – Tempo de retenção
- SB83 – 2-[5-bromo-indol-3-il]- amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4*H*-ciclo-hepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila
- SLA – Antígenos solúveis de *Leishmania*
- SQ – Soma dos quadrados
- TLRs – Receptores *Toll-like*
- UV-vis – Ultravioleta-visível
- ZnO – Óxido de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

- % – Porcentagem
- < – Menor que
- > – Maior que
- $\pm$ – Mais ou menos
- ® – Marca registrada
- μg – Micrograma
- μL – Microlitro
- μM – Micromolar
- Cpk – Índice de capacidade do processo
- F – Estatística F (utilizada em ANOVA e testes de significância)
- F de significação – Valor de significância associado ao teste F
- mg – Miligrama
- mL – Mililitro
- mV – Milivolt
- nm – Nanomêtro
- R^2 – Coeficiente de determinação
- Rpm – Rotações por minuto
- ζ – Potencial Zeta
- λ – Comprimento de onda
- σ – Desvio padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1.1	Manifestação clínica da doença	21
3.1.2	Epidemiologia.....	22
3.1.3	Ciclo de vida do parasita e patogênese	23
3.4.1	Características físico-químicas das Nanopartículas poliméricas	31
3.4.2	Principais metodologias para preparação de nanopartículas	33
3.4.3	Nanopartículas como sistemas de entrega de fármacos.....	34
3.4.4	Poli (ácido láctico)	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1.1	Preparação das nanoesferas de PLA contendo o SB83	43
4.1.2	Liofilização	44
4.1.3	Caracterização morfológica e físico-química das nanoesferas.....	44
4.1.4	Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	44
4.1.5	A eficiência de encapsulação (EE%).....	45
4.1.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	45
4.1.7	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	46
4.2.1	Cultura dos parasitas e células.....	47
4.2.2	Atividade anti-leishmania das formas promastigotas e amastigotas axênicas de Leishmania amazonensis	47
4.2.3	Determinação da citotoxicidade em macrófagos e índice de seletividade	48
4.3.1	Planejamento experimental.....	49
4.3.2	Preparo da solução padrão	49
4.3.3	Curva de calibração	50
4.3.4	Seletividade	50
4.3.5	Precisão.....	50
4.3.6	Exatidão	51
4.3.7	Robustez	51
4.3.8	Limites de detecção e de quantificação	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1.1	Determinação do tamanho médio, PDI e potencial zeta.....	53

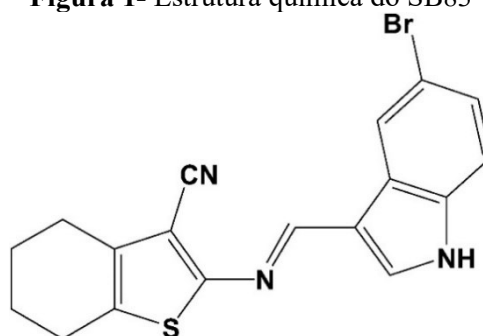
5.1.2	Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)	57
5.1.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	59
5.1.4	Cinética de liberação in vitro.....	60
5.2.1	Desenvolvimento e otimização do método.....	63
5.2.2	Seletividade	66
5.2.3	Linearidade	68
5.2.4	Limite de detecção e quantificação	74
5.2.5	Precisão.....	74
5.2.6	Exatidão	76
5.2.7	Robustez	76
5.3.1	Citotoxicidade em macrófagos	78
5.3.2	Atividade anti-leishmania.....	80
6	CONCLUSÃO	84

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são classificadas pela OMS como Doenças Tropicais Negligenciadas, causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada do flebotomíneo fêmea infectado (Mor; Gormez; Demirci, 2023; OMS, 2023). As doenças afetam milhões de pessoas globalmente, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, manifestando-se sob as formas cutâneas, mucocutâneas e viscerais (OMS, 2023). Anualmente, entre 700.000 e 1 milhão de novos casos são registrados, resultando em 26.000 a 65.000 óbitos (OMS, 2023). A distribuição geográfica é prevalente em países como Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Souza *et al.*, 2021). Os fatores de risco incluem pobreza, migração, desnutrição, higiene inadequada e imunossupressão (Mann *et al.*, 2021; OMS, 2023).

Os tratamentos para as leishmanioses incluem algumas poucas opções medicamentosas, a exemplo do antimoníato de meglumina (Glucantime®), paromomicina, miltefosina, pentamidina e anfotericina B (nas formas deoxicolato e lipossomal) (Freitas *et al.*, 2023). No entanto, esses tratamentos apresentam graves efeitos adversos e enfrentam resistência parasitária, além da ausência de uma vacina disponível (Ospina-Villa *et al.*, 2019). A eficácia do estibogluconato de sódio e da miltefosina tem diminuído, enquanto a anfotericina B, embora efetiva, é potencialmente tóxica, e sua formulação lipossomal, apesar de menos tóxica, é de alto custo, limitando o acesso ao tratamento. Além disso, as terapias combinadas também enfrentam desafios relacionados à resistência, complicando as abordagens terapêuticas recomendadas pela OMS (Barrie *et al.*, 2024; Ponte-Sucre *et al.*, 2017; Roatt *et al.*, 2020).

Neste contexto, os compostos derivados dos 2-amino-tiofênicos têm despertado interesse como candidatos promissores a fármacos contra as leishmanioses devido à simplicidade de síntese, ao baixo custo e sua eficiência mesmo frente a cepas resistentes. Pesquisas anteriores de nosso grupo evidenciaram a eficácia desses compostos contra as formas promastigotas e amastigotas de várias espécies de *Leishmania* (Félix *et al.*, 2020; Luna *et al.*, 2023; Sousa *et al.*, 2023). Em particular, o composto 2-[5-bromo-indol-3-il)- amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (SB83) (figura 1) que demonstrou atividade anti-leishmania *in vitro* superior ao Glucantime®, apresentando CI_{50} de 3,37 e 18,5 μ M para formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, respectivamente, com uma seletividade favorável (Rodrigues *et al.*, 2015), também se demonstrando ativo por via oral, em modelo de infecção *in vivo* (Rodrigues *et al.*, 2018).

Figura 1- Estrutura química do SB83

Fonte: Autor (2024)

Diante desses desafios, as nanopartículas de poli(ácido láctico) (PLA) surgem como veículos eficientes para o transporte de fármacos, permitindo que as moléculas sejam dissolvidas, encapsuladas, aprisionadas ou incorporadas em uma matriz de nanopartículas, facilitando a passagem por barreiras biológicas e a absorção celular (Ozdal *et al.*, 2022). A alta relação área-volume das nanopartículas poliméricas (PNPs) permite interação eficaz com alvos biológicos e alta capacidade de carga de medicamentos (Kapoor *et al.*, 2023; Ozdal *et al.*, 2022). Além disso, a administração convencional de medicamentos pode ser limitada pela baixa solubilidade e biodisponibilidade dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs). O encapsulamento de IFAs em nanoestruturas poliméricas é uma alternativa promissora, melhorando a eficácia terapêutica, prolongando a meia-vida do medicamento na circulação e reduzindo os efeitos colaterais (Koniuch *et al.*, 2023). O nanodimensionamento de medicamentos é uma estratégia promissora para melhorar a biodisponibilidade de medicamentos hidrofóbicos (Wang *et al.*, 2013), podendo ser uma estratégia interessante para o SB83 que também tem essa característica.

Polímeros sintéticos, como o poli (ácido láctico) (PLA), são comumente usados para encapsular medicamentos devido à sua eficácia como transportadores, liberação sustentada e propriedades favoráveis de biocompatibilidade e biodegradabilidade. O PLA permite a liberação prolongada de medicamentos e é aprovado para uso médico pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Glinka *et al.*, 2021; Jackman *et al.*, 2024; Lindner *et al.*, 2015; Ayyanaar *et al.*, 2023).

Nesse contexto, foram preparadas nanoesferas poliméricas de PLA encapsuladas com o SB83, realizada a validação analítica para quantificação do SB83 e efetuada a caracterização físico-química. Além disso, foi avaliada a citotoxicidade em macrófagos e a atividade *in vitro* frente as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*, visando otimizar a entrega do SB83 e aumentar sua eficácia terapêutica frente a leishmaniose cutânea.

2 OBJETIVOS

Preparar e caracterizar as nanoesferas de PLA encapsuladas com o SB83 visando o tratamento futuro da leishmaniose cutânea.

2.1 Objetivos específicos

- a) Caracterizar as nanoesferas poliméricas de PLA quanto às propriedades físico-químicas, como tamanho das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulação e cinética de liberação *in vitro*;
- b) Desenvolver uma metodologia analítica para quantificação do SB83 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de Uso Humano - ICH) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);
- c) Investigar a citotoxicidade em células de macrófagos RAW 264.7 diante das formulações das nanoesferas contendo o SB83, comparando-as com o SB83 livre e a Miltefosina;
- d) Avaliar a atividade anti-leishmania frente as formas promastigotas e amastigota de *Leishmania amazonensis*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta sessão, serão abordados os principais estudos relacionados às leishmanioses, à nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e as técnicas de caracterização de fármacos nas nanopartículas.

3.1 Leishmaniose

As leishmanioses são um conjunto de doenças crônicas causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, capazes de causar diversos quadros clínicos, variando desde manifestações cutâneas até infecções viscerais disseminadas. Esses parasitas são transmitidos pela picada de fêmeas infectadas de flebotomos que inclui mais de 20 espécies distintas. A doença é predominantemente zoonótica, com cães e roedores servindo como principais reservatórios (Abadías-Granado *et al.*, 2021).

As *Leishmanias* possuem um ciclo de vida digenético envolvendo o inseto vetor e um hospedeiro mamífero. O parasita alterna entre duas formas: a promastigota, alongada e móvel (10–20 μm), presente no vetor flebotomíneo, e a amastigota, oval e não móvel (3–7 μm), encontrada no hospedeiro mamífero. No vetor, a promastigota passa por várias etapas de diferenciação até se tornar a forma metacíclica infecciosa, que é transmitida aos mamíferos durante a picada. Dentro do hospedeiro, os amastigotas sobrevivem como parasitas intracelulares em células fagocíticas (Gupta *et al.*, 2022).

Os vetores responsáveis pela transmissão da *Leishmania* são os flebotomíneos, pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (Souza *et al.*, 2018). O *Phlebotomus* é encontrado principalmente na Europa, Ásia e África, e é o principal vetor de leishmaniose no Velho Mundo. Em contraste, *Lutzomyia* é predominante nas Américas, especialmente na América Latina, sendo o vetor principal de leishmaniose no Novo Mundo. Essa diferenciação geográfica dos vetores é essencial para o entendimento epidemiológico e controle da doença nas diferentes regiões do mundo (Pires *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2022).

3.1.1 Manifestação clínica da doença

As manifestações clínicas das leishmanioses variam amplamente, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro. A leishmaniose cutânea (LC),

a forma mais comum, apresenta-se com lesões na pele que podem evoluir para úlceras indolores com bordas elevadas, potencialmente resultando em cicatrizes permanentes. A leishmaniose mucocutânea (LMC) afeta as mucosas do nariz, boca e garganta, causando lesões destrutivas que podem levar a deformidades severas. A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é a forma mais grave, caracterizada por febre prolongada, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, perda de peso e pancitopenia, resultando da disseminação do parasita para órgãos internos. Além disso, a LV pode evoluir para a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), caracterizada por erupções cutâneas que podem variar de máculas a nódulos que ocorre com o tratamento inadequado da LV (Abirami *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022; Roatt *et al.*, 2020).

Em suma, a LC causa alterações na aparência da pele, no qual após a picada pelo flebotomíneo, pode haver formação de edema local, levando a uma mancha local que evolui para uma pápula e eventualmente evolui para um nódulo que evolui para necrose e ulceração. Por outro lado, na LV, o parasita se propaga sistematicamente do local primário da infecção, a pele, para órgãos como fígado, baço, medula óssea e gânglios linfáticos, causando hiperplasia e hipertrofia das células do sistema fagocitário mononuclear no qual gera um intenso parasitismo (Flores *et al.*, 2023).

3.1.2 Epidemiologia

Atualmente, entre 600.000 e 1 milhão de novos casos de LC ocorrem anualmente em todo o mundo, sendo 75% dos novos casos de LC detectados no Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque e Síria (Abirami *et al.*, 2023). Nas Américas, o Brasil é o país mais afetado pela LV, que pode ser letal se não tratada da forma correta (Rogério *et al.*, 2023).

Segundo os informes epidemiológicos das Américas, publicado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foram notificados na região Andina e no Brasil (2001-2021), 896.790 casos de LC e LCM, correspondendo respectivamente a 40,79% e 37,60%, dos casos das Américas. E os dados que correspondem a forma mais grave da doença, representada pela LV, registraram 69.665 casos novos na Região das Américas, com uma média de 2.488 casos por ano, com letalidade média de 8,2%. Em 2021, das notificações da LV em 13 países, (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Uruguai e Venezuela), 93,5 % destes, foram registrados no Brasil. No Brasil, em média 3.500 casos são registrados por ano, sendo Fortaleza (Ceará), Belo Horizonte (Minas Gerais), São Luís (Maranhão), Araguaína (Tocantins) e Parauapebas (Pará) os cinco municípios mais afetados pela doença (OPAS, 2022). Evidenciando, que as leishmanioses são

doenças negligenciadas e um problema de saúde público, notabilizada principalmente nas áreas mais pobres.

3.1.3 *Ciclo de vida do parasita e patogênese*

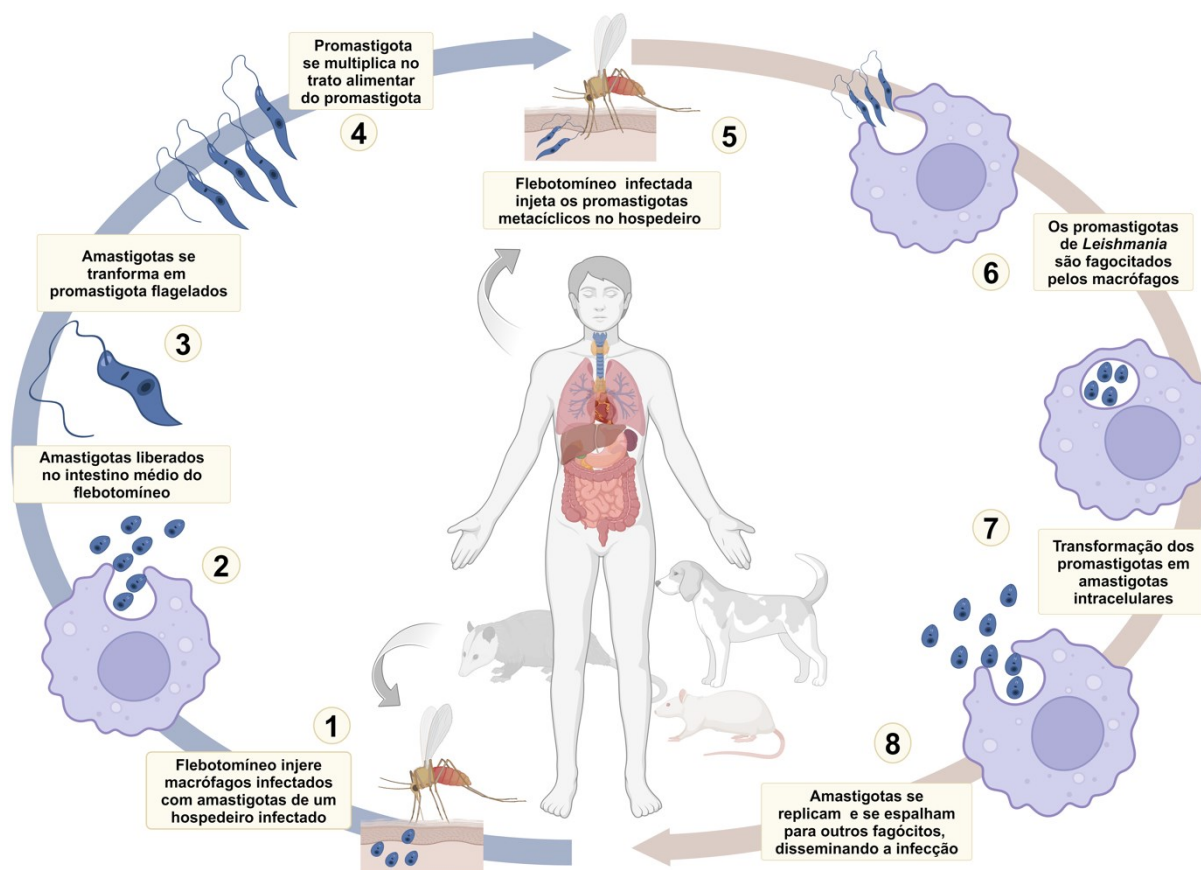
O ciclo das leishmanioses envolve dois principais hospedeiros: o mamífero definitivo, que pode ser o homem, canídeos domésticos e silvestres, e um vetor, o flebotomíneo. Este ciclo é dividido em dois estágios: a forma promastigota encontrada no inseto vetor e a forma amastigota do parasita (Barrie *et al.*, 2024; Dixit *et al.*, 2021). A fêmea do flebotomíneo adquire os parasitas *Leishmania* ao se alimentar do sangue de um vertebrado infectado. No intestino do vetor, os promastigotas se desenvolvem em formas infectantes que são transmitidas na próxima picada (Pires *et al.*, 2017).

O ciclo de vida do parasita está representado na figura 2. Inicialmente, quando um flebotomíneo pica um hospedeiro infectado, ele ingere amastigotas que, ao chegarem ao intestino médio do inseto, se transformam em promastigotas flageladas. Esses promastigotas se multiplicam por fissão binária no trato alimentar do vetor e depois migram para as glândulas salivares e o esôfago. Durante a próxima refeição do sangue, os promastigotas são transmitidos ao hospedeiro mamífero juntamente com a saliva do flebotomíneo fêmea (Gupta *et al.*, 2022). Sendo assim, a flebotomínea infectada pelas *Leishmanias* injeta os promastigotas metacíclicos no hospedeiro e no intestino do inseto, ocorre a replicação dos promastigotas, seguida pela metaciclogênese, processo no qual os parasitas adquirem fatores de virulência (Dixit *et al.*, 2021). No momento que os flebotomíneos infectados picam seus hospedeiros, os promastigotas de *Leishmania* são fagocitados por células como os macrófagos. Após 48 horas ocorrem mudanças no pH, aumento da acidez e da temperatura do fagolisossomo dentro dos macrófagos, promovendo a transformação dos promastigotas em amastigotas intracelulares, que se replicam e se espalham para outros fagócitos, disseminando a infecção. Em contraste, os parasitas que não são fagocitados são eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro ou morrem devido à falta de nutrientes essenciais (Abirami *et al.*, 2023; Barrie *et al.*, 2024; Dixit *et al.*, 2021). Cerca de três semanas depois, inicia-se uma cascata inflamatória com influxo de neutrófilos derivados de monócitos inflamatórios e células dendríticas, ativando células T específicas do antígeno (fase clínica) e provocando a resposta imune adaptativa contra a *Leishmania* (Dixit *et al.*, 2021).

Vale ressaltar que diferentes tipos de macrófagos, os receptores do sistema complemento, de manose, de fibronectina e os receptores Fc μ R, estão disponíveis para diversas

variantes de leishmaniose. Assim, o estágio promastigota atua por meio de sua estrutura flagelar em conjunto com várias células de defesa. Essa comunicação celular desencadeia a fagocitose intracelular do parasita. As mudanças no pH para valores mais baixos, aumento na temperatura e intensificação na absorção de ferro levam à transformação do vacúolo parasitário e à acidificação do promastigota, levando-o a assumir a forma de amastigota. O vacúolo parasitário na configuração amastigota é uma organela altamente interativa e dinâmica, sendo vital para a obtenção de nutrientes e para extrair membranas adicionais da célula do hospedeiro, a fim de proporcionar um ambiente propício para a reprodução do parasita. As formas amastigotas são subsequentemente transportadas novamente para os insetos flebotomíneos, de modo a infectar novos hospedeiros (Abirami *et al.*, 2023). Assim, o parasita continua seu ciclo de vida, culminando na infecção de células e tecidos circundantes na LC e em órgãos ricos em macrófagos, como a medula óssea, fígado e baço, na LV (Gupta *et al.*, 2022).

Figura 2 – Ciclo de vida do parasita



Fonte: Autor (2024)

O processo de diferenciação dos macrófagos é crucial para a resposta imune contra as *Leishmanias*. Os macrófagos M1, induzidos por IFN- γ e LPS, produzem óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS) para eliminar os parasitas. Enquanto os macrófagos M2,

induzidos por IL-4 e IL-10, promovem a sobrevivência do parasita e são associados à cronicidade da infecção (Almeida *et al.*, 2023).

3.2 Medicamentos Anti-leishmania

As terapias convencionais para as leishmanioses apresentam inúmeros efeitos adversos sistêmicos, elevado custo e potencial tóxico. Sendo assim, o desenvolvimento de novos medicamentos, mais eficientes contra as leishmanioses e com menos efeitos adversos é uma necessidade urgente (Prasanna *et al.*, 2021). O tratamento consiste em eliminar as formas amastigotas intracelulares, no entanto, a indústria farmacêutica encontra desafios de elevados potenciais tóxicos e resistência parasitária, uma vez que os fármacos devem se acumular no compartimento fagolisossomoal dos macrófagos do hospedeiro e matar seletivamente o parasita (Assolini *et al.*, 2022).

Nesse contexto, entre os tratamentos mais utilizados contra as leishmanioses, estão os antimoniais pentavalentes, que consiste em via de administração sistêmica, destacando-se o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e o antimoniato de meglumina (Glucantima[®]) (Ponte-Sucre *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2023). No entanto, esses medicamentos, interagem com proteínas da célula hospedeira, gerando perda de função e efeito tóxicos em órgãos como rim, fígado e coração e causam vários efeitos adversos, incluindo náuseas, vômitos, diarreia, erupções cutânea, tonturas, arritmia cardíaca, hipotensão, hepatite e pancreatite (Freitas *et al.*, 2023).

Os compostos como a miltefosina, (única opção disponível para administração oral), a paromomicina (reposicionamento de fármacos), utilizada por via parenteral, e a anfotericina B, apresentaram falha do tratamento em pacientes que foram tratados com a maioria desses antileishmaniais, indicando a necessidade de monitoramento contínuo e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Ponte-Sucre *et al.*, 2017). Os agentes terapêuticos alternativos contra as leishmanioses, como a paromomicina, sitamaquina e miltefosina apresentam efeito tóxico, aumento da resistência aos medicamentos e alto custo de produção (Prasanna *et al.*, 2021).

A miltefosina, primeiro medicamento oral eficaz contra a LV, exerce seus efeitos antimicrobianos ao comprometer a integridade da membrana fosfolipídica e interferir na função mitocondrial do microrganismo, resultando em danos celulares que levam à morte do parasita. Esses mecanismos são cruciais para sua eficácia no tratamento da leishmaniose, embora a resistência crescente esteja limitando sua aplicabilidade clínica (Tayyebi *et al.*, 2021). Além

disso, a miltefosina apresentou redução na eficácia após uma década de uso. Além de causar eventos adversos gastrointestinais como vômitos e diarreia, pode ocasionalmente levar efeitos tóxicos no tecido hepático e nos néfrons. Dessa forma, a sua longa meia-vida (aproximadamente 1 semana) aumenta o risco de desenvolvimento de resistência nos parasitas, e seu potencial teratogênico exige que mulheres em idade fértil usem contracepção durante e por três meses após o tratamento (Sundar; Singh, 2018).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que exerce sua ação interferindo na síntese de proteínas no ribossomo do organismo alvo e inibindo o processo de respiração (Sundar; Singh, 2018). Esse medicamento foi licenciado para tratamento de LV na Índia em 2006 e mostrou altas taxas de cura, embora sua eficácia como monoterapia seja limitada em algumas regiões. Os efeitos adversos incluem dor no local de aplicação e baixa hepatotoxicidade e o seu uso tópico tem eficácia variável, dependendo da espécie de *Leishmania* e da região geográfica (Roatt *et al.*, 2020). A sitamaquina por sua vez, tem sido avaliada como uma opção terapêutica para a LV, mas estudos recentes indicam que seu uso está associado a um maior número de eventos adversos em comparação com outros tratamentos, o que levanta questões sobre sua segurança e eficácia clínica (Bashir *et al.*, 2022).

O uso do antimoníato de meglumina está atrelado a um alto efeito tóxico e baixa adesão do paciente devido aos longos regimes posológicos (Freitas *et al.*, 2023). Por outro lado, o antifúngico anfotericina B (AmB) utilizado para tratamento da LV é eficaz frente as duas formas dos parasitas (promastigotas e amastigotas) que por meio de uma ligação ao ergosterol (na membrana celular do parasita), aumenta a permeabilidade celular e o influxo de íons, danificando a maquinaria celular e matando o parasita, porém, o que limita a sua eficácia é que este medicamento apresenta um elevado efeito tóxico. Vale ressaltar, que em algumas espécies, devido a uma diferença do precursor do ergosterol, pode ocasionar falha na ligação da AmB em se ligar à membrana do parasita, resultando em uma resistência aos medicamentos (Kammona; Tsanaktsidou, 2021; Singh *et al.*, 2019; Freitas *et al.*, 2023). Sendo assim, o tratamento com AmB tornou-se restrito devido à elevado efeito tóxico visto que causa reações adversas como: vasoconstrição renal e reações à infusão (Kumar Singh *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de uma formulação lipossomal (AmBisome[®]) menos tóxica para o tratamento da LV foi proposta pela OMS a fim de contornar os efeitos adversos do AmB, pois estrategicamente os lipossomas se acumulam no local infectado, aderindo à superfície celular do parasita, liberando AmB que está associado na bicamada lipídica, permitindo a administração de altas doses. No entanto, o elevado custo dessa formulação limita e dificulta

esse tratamento, principalmente para os indivíduos em situação mais vulnerável de pobreza, onde há uma maior incidência de casos de leishmaniose (Kammona; Tsanaksidou, 2021).

Desse modo, apesar dos avanços no tratamento das leishmanioses, atualmente, ainda não existem vacinas direcionadas para humanos disponíveis para esta doença (Assolini *et al.*, 2022). Portanto, o tratamento das leishmanioses apresenta efeitos pouco satisfatórios, pois a maioria dos medicamentos disponíveis exibem efeitos adversos graves e o aumento da resistência do parasita reduz muito sua sensibilidade a essas drogas (Rodrigues *et al.*, 2015).

Diante disso, a terapia combinada é escolhida por combinar medicamentos com diferentes mecanismos de ação em doses mais baixas, o que aumenta a eficácia, reduz o efeito tóxico, encurta o tratamento e melhora a adesão (Goswami *et al.*, 2020). Sendo assim, a terapia combinada tem se destacado como uma alternativa no tratamento da leishmaniose, especialmente em regiões endêmicas. A resistência aos medicamentos leishmanicidas convencionais, como os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a miltefosina, tem sido um dos principais fatores que impulsionam a pesquisa e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Bastos *et al.*, 2022). Nesse contexto, a combinação medicamentosa busca melhorar a eficácia do tratamento e mitigar a probabilidade de desenvolvimento de resistência nos parasitas, que é uma preocupação crescente que compromete os resultados terapêuticos.

Estudos comparando a terapia combinada com a monoterapia no tratamento da LV indicam que a combinação de anfotericina B lipossomal com uma administração de curta duração com miltefosina mostrou resultados promissores. A terapia combinada foi mais eficaz do que a monoterapia com miltefosina, resultando em menores taxas de recaídas e melhor controle parasitário. Além disso, o estudo destaca que nenhum paciente no grupo de terapia combinada desenvolveu LDPC durante os cinco anos de acompanhamento, enquanto houve casos de LDPC no grupo de monoterapia. Desse modo, os resultados sugerem que a terapia combinada melhora a eficácia clínica e prolonga a duração dos efeitos terapêuticos e reduz o risco de complicações a longo prazo (Goswami *et al.*, 2020).

No entanto, nem sempre essa estratégia resulta em um sucesso terapêutico, especialmente em casos de resistência medicamentosa. O estudo de Griensven e outros colaboradores (2024), analisou a eficácia da terapia combinada para LV em diferentes regiões, mostrando que a combinação de antimoniais e paromomicina foi eficaz na África Oriental, sendo adotada como tratamento de primeira linha. Entretanto, na América Latina, a baixa eficácia das combinações fez com que a monoterapia continuasse prevalente. Esse estudo destacou a necessidade de novos compostos para desenvolver um tratamento completamente oral e ressaltou a importância de monitorar a resistência emergente aos medicamentos

(Griensven *et al.*, 2020). Além disso, um estudo destacou que as análises proteômicas em *Leishmania infantum* resistentes revelaram que proteínas críticas, como a nucleosídeo difosfato quinase 3 (NDK3) e o receptor de transferrina (TFRC), estão associadas à persistência da resistência, mesmo sob terapia combinada. A NDK3, envolvida na síntese de nucleotídeos, foi detectada em linhas resistentes ao antimônio e à paromomicina, enquanto a TFRC, que facilita a captação de ferro, foi associada à resistência à miltefosina. Essas alterações proteômicas sugerem que o parasita desenvolve mecanismos adaptativos que lhe permitem sobreviver e manter a resistência, independentemente dos regimes terapêuticos utilizados, o que pode comprometer a eficácia tanto das monoterapias quanto das terapias combinadas (Tagliazucchi *et al.*, 2023).

As *Leishmanias* são parasitas intracelulares que conseguem sobreviver em macrófagos no retículo-endotelial, assim, o parasita se liga aos receptores da superfície do macrófago, gerando uma invasão fagocítica do promastigota. Os macrófagos expressam na sua superfície diversos receptores de engolfamento que podem se ligar a polissacarídeos modificados, lipoproteínas, células senescentes e apoptóticas (Kumar Singh *et al.*, 2020). Por isso a terapia de entrega direcionada de medicamentos ou moléculas bioativas é mais eficaz para o tratamento dessa parasitose. Dessa forma, objetivando o tratamento da LV, foi relatado em estudos que formulações à base de lipídios foram propostas, como por exemplo a AmBiossome® que apresentou eficácia superior contra os parasitas invasores comparada ao tratamento convencional da formulação anfotericina B e potencial de toxicidade reduzida para tecidos e células de mamíferos. Essa incorporação de AmB em pequenos lipossomas unilamelares (AmBisome®) modifica a farmacocinética do medicamento de forma que ele retém significativamente a atividade *in vitro* e *in vivo*. Além disso, os lipossomas são absorvidos com facilidade pelos macrófagos, representando uma estratégia na entrega de AmB (Singh *et al.*, 2019).

Portanto, as terapias atuais enfrentam desafios como a resistência aos medicamentos e efeito tóxico, bem como a necessidade de regimes de tratamento prolongados. E as estratégias inovadoras incluem o reposicionamento de fármacos, o uso de imunomoduladores e a aplicação de sistemas de liberação de medicamentos baseados em nanotecnologia, que têm mostrado promessas na melhoria da eficácia e redução dos efeitos adversos (Roatt *et al.*, 2020). De maneira alternativa, as nanopartículas têm sido amplamente exploradas para a entrega de medicamentos leishmanicidas devido à sua capacidade de encapsular fármacos, proteger compostos bioativos da degradação enzimática, e melhorar a biodisponibilidade no local da infecção. Alguns estudos recentes indicam que essas nanopartículas podem ser projetadas para

liberar o fármaco de forma controlada e sustentada, otimizando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos (Khan *et al.*, 2023; Esfandiari *et al.*, 2019).

3.3 Derivado 2-amino-tiofênico (SB83)

O composto 2-[(5-bromo-indol-3-il)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4*H*-ciclo-hepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB83) (figura 1) é um derivado da classe dos 2-amino-tiofênicos, que tem se destacado como uma promissora molécula no combate às leishmanioses. Esses compostos demonstraram eficácia frente as formas promastigotas e amastigotas de diversas espécies de *Leishmania* (Félix *et al.*, 2020; Luna *et al.*, 2023; de Sousa *et al.*, 2023). Descoberta por nosso grupo em 2015, a atividade anti-leishmania *in vitro* do candidato à fármaco SB83 foi observada como superior ao fármaco de referência, antimoniato de meglumina (Glucantime®). Nesse estudo inicial, o SB83 demonstrou valores de CI₅₀ de 3,37 µM e 18,5 µM frente as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*, respectivamente. Além disso, apresentou citotoxicidade em macrófagos com um CC₅₀ de 113,4 µM e um índice de seletividade de 33,6 (Rodrigues *et al.*, 2015).

A eficácia do SB83 foi atribuída à sua capacidade de induzir a morte celular via apoptose e à modulação imunológica, especialmente através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-12, bem como do óxido nítrico. Esses mecanismos contribuem para a potente atividade anti-leishmania do composto (Rodrigues *et al.*, 2015). Estudos subsequentes reforçaram o potencial do SB83, mostrando que, além de sua eficácia *in vitro*, o composto também é eficaz *in vivo*. Em modelos murinos infectados com *L. amazonensis*, a administração oral de SB83 resultou em uma significativa redução do tamanho das lesões e redução da carga parasitária em ambos os reservatórios (linfonodos poplíteos e no baço), sem causar efeitos bioquímicos e hematológicos significativos (Rodrigues *et al.*, 2018). Após 7 semanas de tratamento, numa dose oral de 200 mg/kg/dia, o SB83 reduziu mais de 50% das lesões, e reduziu a carga parasitária no baço a níveis não detectáveis, sendo esses resultados superiores aos observados com o tratamento efetuado com o medicamento de referência Glucantime®, administrado por via intraperitoneal, numa concentração de 100mg/kg/dia. A avaliação pré-clínica *in vivo* de SB83, indicou ainda ausência de toxicidade aguda abaixo de 2500 mg/kg, e ausência de alterações hematológicas e bioquímicas importantes, indicando, portanto, seu grande potencial para se tornar um novo fármaco anti-leishmania (Rodrigues *et al.*, 2018).

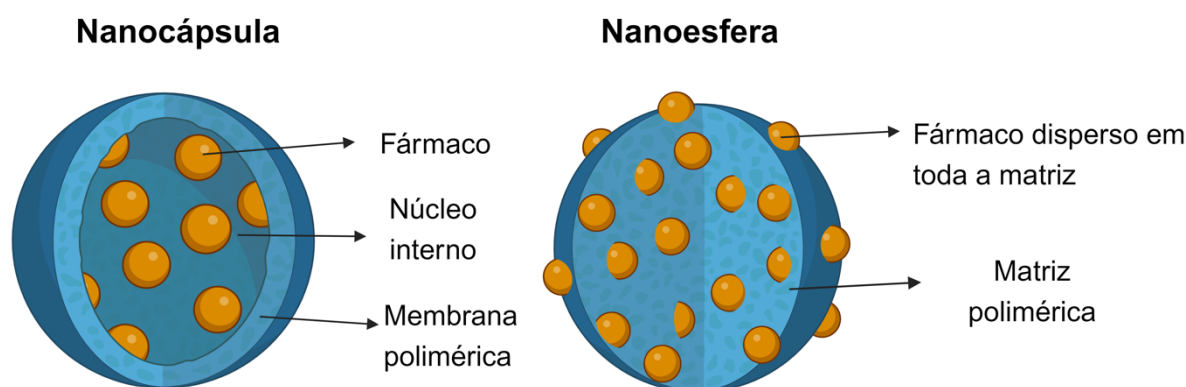
Sendo assim, essas descobertas torna o SB83 como um candidato multifuncional promissor para o desenvolvimento de novas terapias contra a leishmaniose.

3.4 Nanopartícula poliméricas

Nanopartículas são estruturas com dimensões na nanoescala, o que lhes confere propriedades únicas e uma ampla gama de aplicações. Nos últimos anos, têm se destacado especialmente na nanomedicina, onde são utilizadas para melhorar parâmetros farmacocinéticos de medicamentos, aumentando sua eficácia e reduzindo efeitos adversos (Gimondi *et al.*, 2024). Mais especificamente, as nanopartículas poliméricas (PNPs) são sistemas coloidais compostos de polímeros naturais ou sintéticos, geralmente com tamanhos inferiores a 1 μm , feitas de uma matriz polimérica biocompatível, com estabilidade significativa em fluidos biológicos (Gagliardi *et al.*, 2021; Vega *et al.*, 2023).

As PNPs englobam nanocápsulas e nanoesfera (figura 3), que diferem no aspecto morfológico. As nanocápsulas são envolvidas por uma membrana polimérica que controla a liberação do fármaco. Por outro lado, as nanoesferas são compostas por uma rede polimérica contínua, na qual o fármaco pode ser adsorvido na superfície ou disperso/dissolvido na matriz polimérica (Zielińska *et al.*, 2020).

Figura 3- Representação esquemática das nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Autor (2024).

Atualmente, as PNPs são amplamente utilizadas devido às suas várias funções terapêuticas e na administração de medicamentos. Compostas por polímeros biodegradáveis, oferecem benefícios significativos, como maior estabilidade dos agentes terapêuticos contra a degradação, liberação controlada de fármacos, tempo de retenção prolongado, biodisponibilidade aprimorada e direcionamento eficiente (Saha *et al.*, 2020; Gimondi *et al.*, 2024; Pulingam *et al.*, 2022). Os polímeros biodegradáveis utilizados na preparação das PNPs,

como poli(ácido láctico) (PLA), poli(*D,L*-glicolídeo) (PLG), copolímero poli(lactídeo-co-glicólico) (PLGA), polialquilcianoacrilatos e poli- ϵ -caprolactona, são considerados seguros e já foram aprovados para uso farmacêutico pela FDA e pela *European Medicines Agency* (EMA) (Gagliardi *et al.*, 2021).

Nesse aspecto, as PNPs compartilham benefícios como proteção contra degradação, melhoria da eficácia na entrega e aumento do índice terapêutico dos medicamentos, destacando-se pela facilidade de desenvolvimento e fabricação. Somado a isso, os polímeros utilizados na produção de PNPs, são materiais versáteis, manipuláveis para propriedades específicas, adequados para produção em larga escala e processáveis para encapsulamento de diversas aplicações biomédicas (Weng *et al.*, 2022).

Dessa forma, as PNPs atuam como sistemas carreadores eficazes, devido a fácil preparação, controle e direcionamento da liberação do medicamento, resultando em maior captação pelo tecido alvo, aumento da concentração do fármaco no local desejado e melhoria da atividade terapêutica dos medicamentos (Bhattacharya *et al.*, 2021; Pulingam *et al.*, 2022).

3.4.1 Características físico-químicas das Nanopartículas poliméricas

A atividade farmacocinética dos nanomedicamentos está diretamente associada com as características físico-químicas destes. Sendo assim, a compreensão dos parâmetros físico-químicos, como o tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação dessas partículas são essenciais para que haja uma potencialização na liberação do fármaco no sistema biológico indicado (Saha *et al.*, 2020).

O potencial zeta refere-se à carga elétrica das nanopartículas e é um indicador crucial de sua estabilidade coloidal. Ele pode ser influenciado pela natureza das nanopartículas e pelo meio de dispersão, e é considerado um indicador da magnitude da interação eletrostática entre partículas dispersas e, por isso, é amplamente utilizado como indicador da estabilidade coloidal (Pochapski *et al.*, 2021). O potencial zeta é calculado a partir da mobilidade eletroforética, no qual seu valor absoluto ideal é superior a $|30|$ mV (< -30 ou > 30 mV) para estabilização das nanopartículas e evitar que haja agregação durante o armazenamento (Elbrink *et al.*, 2023).

Um fator crucial no desenvolvimento de sistemas de nanopartículas poliméricas é o tamanho das partículas, que deve ser otimizado para evitar tanto a rápida incorporação nos vasos sanguíneos quanto a eliminação pelo sistema imunológico. As técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas precisam ser analisadas e adaptadas para cada substância ativa, a fim de atender a essas características específicas de tamanho (Hernández-Giottonini *et al.*,

2020). Estudos recentes indicam que a carga superficial e o tamanho dos nanocarreadores são fatores cruciais na formulação de medicamentos, pois influenciam a estabilidade, a adesão celular, a absorção celular e a liberação dos IFAs (Esfandiari *et al.*, 2019). Mandl *et al.*, (2019), relatou que nanopartículas de cerca de 120 nm têm maior eficiência na captação por células específicas em órgãos como pulmões e medula óssea, enquanto nanopartículas maiores são rapidamente eliminadas da circulação e acumuladas no fígado e baço. Similarmente, a pesquisa conduzida por Gimondi *et al.*, (2023) que mostrou que pequenas diferenças de tamanho, de 50 nm para 70 nm, pode resultar em diferenças significativas na absorção celular e na eficácia do tratamento, especialmente no contexto de células cancerígenas.

A faixa de PDI é um parâmetro essencial na caracterização de nanopartículas poliméricas, indicando a uniformidade da distribuição de tamanho das partículas no sistema. Um PDI baixo, geralmente inferior a 0,3, sugere uma distribuição de tamanho estreita, o que é desejável para aplicações biomédicas, pois proporciona uma liberação controlada e previsível dos fármacos. Por outro lado, um PDI alto indica uma maior variabilidade no tamanho das partículas, o que pode levar a uma liberação irregular e imprevisível dos medicamentos, afetando a eficácia terapêutica. Assim, a uniformidade no tamanho das nanopartículas é crucial para garantir uma biodistribuição consistente, minimizar a agregação e evitar a rápida eliminação pelo sistema imunológico. Estudos demonstram que nanopartículas com um PDI baixo apresentam maior estabilidade coloidal, melhor eficiência de encapsulamento (EE) e uma biodistribuição mais uniforme, fatores que são fundamentais para o sucesso de sistemas de entrega de fármacos (Mandl *et al.*, 2019; Mohan *et al.*, 2020).

O encapsulamento é um processo que envolve o aprisionamento de um agente ativo ou substância dentro da nanopartícula (Rahim *et al.*, 2019). Por sua vez, a EE refere-se à porcentagem do fármaco que é efetivamente encapsulado dentro das PNPs, influenciando diretamente a dose terapêutica que pode ser administrada. Assim, a nanoencapsulação é uma abordagem estratégica para proteger os fármacos de condições ambientais adversas, aumentando sua biodisponibilidade e estabilidade, o que é crucial para a eficácia terapêutica. Além disso, essa técnica reduz a volatilidade dos compostos, melhora suas estabilidades química e térmica. Portanto, a nanoencapsulação permite a liberação controlada do fármaco, melhora a solubilidade de compostos lipofílicos em meios aquosos e facilita a absorção prolongada, aspectos que são essenciais para o desenvolvimento de sistemas de entrega de drogas mais eficazes e seguros (Bazana; Codevilla; Menezes, 2019).

3.4.2 Principais metodologias para preparação de nanopartículas

Os métodos para preparação das PNPs envolvem diversas técnicas, cada uma com suas vantagens e aplicações específicas, variando conforme as características desejadas para o sistema de entrega de fármacos. Os diversos métodos utilizados para a produção de PNPs, destaca que a variação de parâmetros experimentais permite controlar suas propriedades. As PNPs têm seus métodos de preparação geralmente classificados em dois grupos principais: a polimerização direta de monômeros (incluindo polimerização em emulsão, polimerização em emulsão sem surfactante, polimerização em miniemulsão, polimerização em micro-emulsão e polimerização microbiana) e dispersão de polímeros pré-formados (como nanoprecipitação, emulsificação com evaporação de solvente, emulsificação com difusão de solvente e *salting-out*) (Pulingam *et al.*, 2022).

A polimerização de monômeros permite a formação de nanopartículas diretamente a partir dos monômeros, oferecendo um controle preciso sobre o tamanho e a uniformidade das partículas. Assim, este método é particularmente útil para a criação de nanopartículas com propriedades específicas, ajustando os reagentes e condições de polimerização (Gharieh; Khoe; Mahdavian, 2019). Por outro lado, a dispersão de polímeros pré-formados, envolve a preparação de nanopartículas a partir de polímeros já sintetizados, permitindo a encapsulação eficiente de fármacos e a formação de partículas com tamanhos controlados. Essas metodologias são vantajosas por sua simplicidade e eficiência na produção de nanopartículas para diversas aplicações na nanomedicina, como a liberação controlada de medicamentos e a redução de efeitos adversos (Hernández-Giottonini *et al.*, 2020; Jenjob *et al.*, 2019).

Entre essas metodologias citadas, a emulsificação-evaporação de solvente é amplamente utilizada devido à sua simplicidade e eficácia na encapsulação de fármacos hidrofóbicos, assim, este método consiste em dissolver o polímero em um solvente orgânico que é emulsificado em uma fase aquosa, seguido da evaporação do solvente orgânico, resultando na formação de nanopartículas (Gharieh; Khoe; Mahdavian, 2019). Para a encapsulação de fármacos hidrofóbicos, as técnicas mais utilizadas são a emulsificação-evaporação de solvente e a nanoprecipitação (Hernández-Giottonini *et al.*, 2020; Varga *et al.*, 2019). A nanoprecipitação consiste na preparação de uma fase aquosa e uma fase orgânica, na qual o polímero é dissolvido em um solvente orgânico miscível com água e adicionado à fase aquosa sob agitação, gerando as nanopartículas (Pulingam *et al.*, 2022). A emulsificação-difusão de solvente é similar à emulsificação-evaporação, mas utiliza um solvente parcialmente miscível com água, facilitando a formação de partículas de tamanho controlado ao diluir o sistema com água (Hernández-

Giottonini *et al.*, 2020). Além disso, técnicas como microemulsão e polimerização em emulsão são utilizadas para produzir nanopartículas com alta estabilidade e uniformidade de tamanho. A microemulsão envolve a formação de uma emulsão usando um sistema de alta energia de agitação, enquanto a polimerização em emulsão utiliza monômeros emulsificados em uma fase aquosa contendo surfactantes e iniciadores de polimerização (Jenjob *et al.*, 2019). Essas técnicas oferecem versatilidade na produção de nanopartículas, permitindo ajustar parâmetros como tamanho, estabilidade e EE para aplicações na nanomedicina.

Vale destacar que, a técnica de nanoprecipitação oferece várias vantagens na preparação de PNPs, especialmente para a entrega de fármacos. Este método é reconhecido por sua simplicidade e eficiência, não exigindo altas temperaturas, o que o torna adequado para substâncias sensíveis ao calor. A nanoprecipitação permite o controle preciso do tamanho das partículas, que pode ser ajustado alterando parâmetros como a concentração do polímero e a velocidade de adição do solvente. A EE dos fármacos tende a ser elevada, evitando a exposição prolongada dos fármacos a solventes agressivos. Além disso, a técnica permite produzir nanopartículas com distribuição de tamanho estreita, crucial para aplicações biomédicas, influenciando diretamente a biodistribuição e a liberação controlada dos fármacos. Alguns estudos demonstraram que a nanoprecipitação é eficaz na criação de morfologias complexas e multifuncionais de nanopartículas, aumentando seu potencial em diversas aplicações (Yan; Bernard; Ganachaud, 2021; Troitsky *et al.*, 2019).

3.4.3 Nanopartículas como sistemas de entrega de fármacos

A nanotecnologia desempenha um papel crucial no tratamento das leishmanioses. Primeiramente, ela permite o desenvolvimento de sistemas de administração em sistemas coloidais para medicamentos convencionais, melhorando suas propriedades farmacocinéticas, eficácia e reduzindo o efeito tóxico. Além disso, esses sistemas também proporcionam uma liberação controlada e uma maior duração na circulação sistêmica. A segunda abordagem envolve a produção de novos medicamentos em escala nanométrica, que são fagocitados por macrófagos e direcionados especificamente para os parasitas *Leishmania* nas células infectadas (Akbari; Oryan; Hatam, 2017; Vega *et al.*, 2023).

Assim, as PNPs são úteis em terapias para doenças como as leishmanioses, pois possuem a capacidade de ultrapassar barreiras biológicas e serem capturadas por células nos tecidos infectados (Vega *et al.*, 2023). Além disso, nanopartículas despertam interesse para uso clínico contra as leishmanioses devido a capacidade de serem fagocitados por macrófagos, que

é a principal célula envolvida na infecção por leishmanias, ocasionando assim um tratamento intracelular direcionado (Akbari; Oryan; Hatam, 2017; Souza *et al.*, 2018). Essas células possuem receptores que internalizam eficientemente nanopartículas na faixa de 50-500 nanômetros e pode ser uma estratégia para o acúmulo do fármaco em órgãos ricos em macrófagos como baço, medula óssea e fígado (Akbari; Oryan; Hatam, 2017).

Por fim, as PNPs tornam o tratamento das leishmanioses mais eficiente, pois podem melhorar a solubilidade e a estabilidade dos medicamentos, permitir uma liberação controlada e direcionada, e reduzir a toxicidade sistêmica. Essas propriedades são cruciais para aumentar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos, tornando o tratamento mais tolerável para os pacientes (Esfandiari *et al.*, 2019).

Vários estudos recentes demonstraram o potencial das PNPs no tratamento das leishmanioses, evidenciando avanços significativos na eficácia terapêutica e na redução dos efeitos adversos. Pesquisadores publicaram um estudo de desenvolvimento de nanopartículas encapsuladas com rifampicina e pentamidina, demonstrando melhorias significativas na eficácia do tratamento da LC. A formulação do fármaco incorporado nas nanopartículas apresentou os menores valores de inibição de crescimento (CI₅₀) frente as promastigotas de *Leishmania tropica* quando comparadas ao fármaco livre, indicando uma maior eficácia no combate ao parasita (Khan *et al.*, 2023).

Oyama *et al.*, (2019) publicaram um estudo em que nanocarreadores de agentes quimioterápicos (Pluronic[®], P-123 e F-127) contra a *Leishmania*, e foram considerados uma solução segura para tratamento futuro por causa de seu efeito anti-leishmania em amastigotas e promastigotas por meio de impactos na membrana mitocondrial. Outro estudo, com nanopartículas de poli(isobutilcianoacrilato) revestidas com quitosana foram investigadas para aplicação tópica na LC, mostraram uma redução significativa da carga parasitária e uma aceleração na cicatrização das lesões (Malli *et al.*, 2019). Logo, as nanoformulações proporcionaram uma abordagem menos invasiva e com menos efeitos adversos em comparação com os tratamentos sistêmicos convencionais.

Outro estudo, realizado por Valle *et al.*, (2019) investigou o uso de nanopartículas de PLGA carregadas com pentamidina administradas por via oral como uma abordagem alternativa para o tratamento da leishmaniose. Eles demonstraram por meio de testes *in vivo* que administração oral de 0,4 mg/kg de pentamidina livre não demonstrou eficácia no modelo experimental de LV. Em contraste, o nanossistema de PLGA carregado com pentamidina mostrou eficácia significativa quando administrado em cinco doses orais de 0,4 mg/kg, $p < 0,05$. Eles sugeriram que houve uma redução no peso relativo dos órgãos, especificamente no

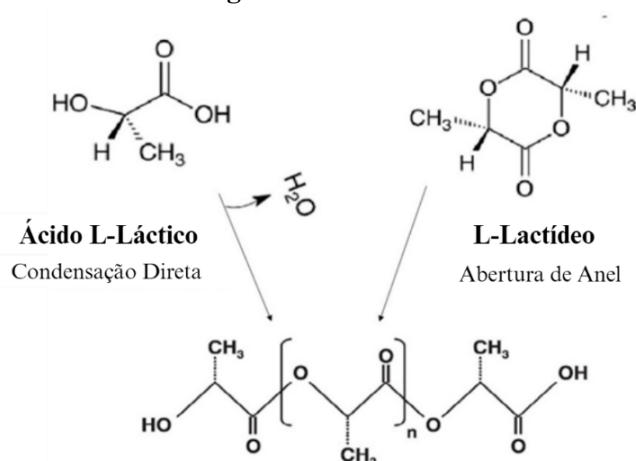
baço e fígado, indicativo de hepatoesplenomegalia, um sinal clássico da LV. Além disso, a carga parasitária no baço foi reduzida em 72,5% com as cinco doses de nanopartículas, demonstrando uma eficácia notável no controle da infecção, embora no fígado apenas uma tendência de redução da carga parasitária tenha sido observada (Valle *et al.*, 2019).

3.4.4 Poli (ácido láctico)

O poli (ácido láctico) PLA é derivado de recursos renováveis, como amido de milho e cana-de-açúcar, sendo uma alternativa sustentável aos plásticos derivados de petróleo (Nofar *et al.*, 2019). O PLA é frequentemente referido como o "polímero do século XXI" devido às suas características únicas, pois é um polímero produzido em larga escala que é simultaneamente de base biológica, biocompatível e biodegradável, destacando-se como uma solução sustentável em meio à crescente preocupação ambiental (Pretula; Slomkowski; Penczek, 2016).

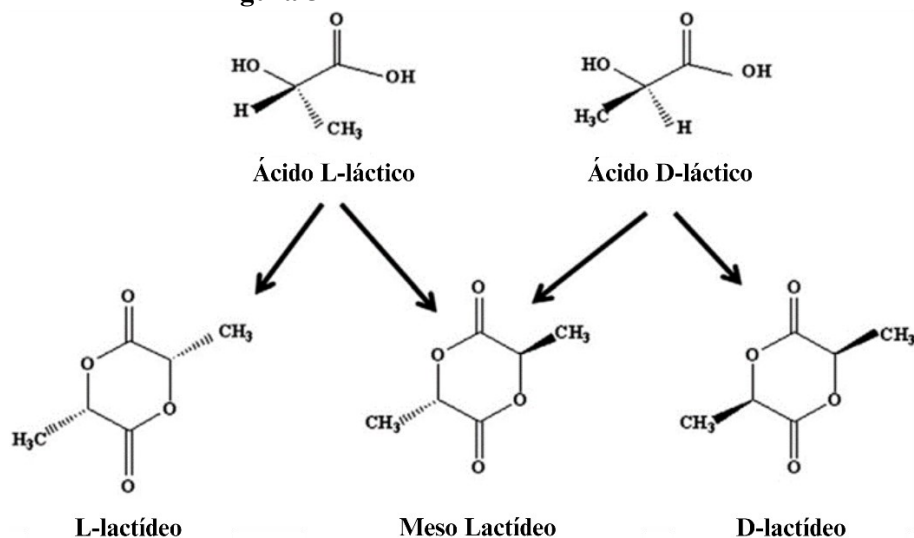
Os polímeros sintéticos biodegradáveis incluem uma variedade de materiais amplamente estudados e aplicados, como o PLA, poli(caprolactona), poli(ácido glicólico), polianidridos e poliuretanos. Esses polímeros são bastante utilizados por suas propriedades mecânicas ajustáveis, biocompatibilidade e capacidade de degradação em ambientes naturais, tornando-os ideais para aplicações biomédicas, como engenharia de tecidos, entrega de medicamentos e implantes temporários (Panchal; Vasava, 2020; Souza *et al.*, 2022). Ao contrário dos polímeros biodegradáveis naturais, eles oferecem porosidade ajustável, tempo de degradação e propriedades mecânicas adaptáveis, sendo frequentemente fabricados em grande escala com custo relativamente baixo e longa vida útil (Liu *et al.*, 2020). Além disso, a aprovação da *Food and Drug Administration* atesta a segurança e eficácia do PLA em aplicações biomédicas, classificado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro), consolidando-o como um material confiável para diversos usos clínicos (Mulla *et al.*, 2021).

A base do PLA é ácido láctico e lactídeo, com o ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico) sendo uma das moléculas orgânicas quirais mais simples, descoberta em 1780 pelo químico Scheele. Este polímero pode ser produzido quimicamente ou biologicamente nas formas isoméricas ácido *D*-láctico (ácido *R*, (-)-láctico) e ácido *L*-láctico (*S*, (+)-ácido láctico), além da mistura racêmica conhecida como ácido *D,L*-láctico (França *et al.*, 2022). A produção de PLA pode ser realizada via polimerização por condensação direta do ácido láctico ou por abertura de anel do dímero de lactídeo cíclico (figura 4), com esta última sendo a preferida para obtenção de PLA de alto peso molecular sem solventes (França *et al.*, 2022; Nofar *et al.*, 2019).

Figura 4 - Síntese do PLA

Fonte: Nofar *et al.*, 2019

O PLA possui três formas estereoquímicas distintas: poli(*L*-lactídeo) (PLLA), poli(*D*-lactídeo) (PDLA) e poli(*DL*-lactídeo) (PDLLA) (Buhecha *et al.*, 2019; Liu *et al.* 2020). Os polímeros baseados em ácido láctico, conhecidos como PLA, são derivados do ácido láctico que pode existir como ácido *L*(+) láctico ou *D*(-) láctico devido à presença de um átomo quiral (figura 5). A ciclização de duas moléculas de ácido láctico forma o dímero cíclico chamado lactídeo, que pode ser *L,L*-, *D,D*- ou *meso*-lactídeo. Os ácidos lácticos quirais são produzidos por fermentação, enquanto a síntese química gera uma mistura racêmica de *L*-Láctico e *D*-Láctico através de lactonitrila e hidrólise adicional (Pretula; Slomkowski; Penczek, 2016).

Figura 5- Três formas estereo de lactídeos de PLA

Fonte: Liu *et al.*, 2020

Os poliésteres alifáticos, incluindo policaprolactona, PLA e PLGA, são considerados os materiais mais promissores para diversas aplicações biomédicas. No entanto, o PLA destaca-se por seus produtos de degradação, que incluem monômeros de ácido *L*-láctico, os quais são

endógenos ao metabolismo humano e participam do ciclo de Cori, não se acumulando em órgãos vitais. Além disso, entre os polímeros sintéticos, os ésteres poli- α -hidroxil, especialmente o PLA, são amplamente utilizados na área biomédica, pois seus produtos de degradação, como água e dióxido de carbono, são inofensivos e completamente eliminados do corpo, tornando o PLA um dos materiais biomédicos mais populares (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2019; Buhecha *et al.*, 2019).

Estudos mostram que a degradação pode ser influenciada por vários fatores, como temperatura, pH, concentração de íons, presença de enzimas e a morfologia do material (Hegyesi *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020). Além disso, a modificação do PLA com nanocompósitos, como nanocristais de celulose, pode aumentar a taxa de degradação e desintegrar as amostras mais rapidamente, ao proporcionar mais caminhos para a penetração de água e agentes degradantes (Hegyesi *et al.*, 2019).

A química de superfície das nanopartículas é crucial para controlar suas interações tanto entre as próprias partículas quanto com a estabilidade. Sendo assim, a funcionalização das nanopartículas com revestimentos poliméricos, é uma estratégia eficaz para regular seus efeitos ambientais e biológicos (Zhang *et al.*, 2020). O PLA, na forma de micro e nanopartículas carregadas com diferentes medicamentos, tem grande potencial para uso em terapia tumoral e outras aplicações de administração de medicamentos (Balla *et al.*, 2021). Atualmente, nanopartículas de polímeros biodegradáveis são amplamente utilizadas para melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e tempo de retenção de vários medicamentos, sejam solúveis ou insolúveis em água, com as moléculas dos medicamentos encapsuladas dentro do polímero ou absorvidas na superfície (Buhecha *et al.*, 2019). Por outro lado, o PLA também é utilizado na fabricação de embalagens de alimentos, no entanto possui limitações, como baixa resistência térmica e fragilidade, que podem ser superadas pela incorporação de nanopartículas e pela formação de blendas poliméricas, melhorando suas propriedades térmicas, mecânicas e de barreira (Balla *et al.*, 2021; Mulla *et al.*, 2021).

Nesse sentido, o PLA oferece benefícios como sistema de entrega de medicamentos devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Assim, o PLA pode ser utilizado de forma segura no corpo humano sem causar efeitos tóxicos. Ele se degrada naturalmente em ácido lático, uma substância que o organismo metaboliza facilmente (Buhecha *et al.*, 2019). Sendo assim, a capacidade das nanoesferas de PLA de encapsular tanto medicamentos hidrofílicos quanto lipofílicos aumenta sua versatilidade e aplicabilidade em uma ampla gama de tratamentos, proporcionando uma liberação controlada e sustentada dos medicamentos encapsulados (Buhecha *et al.*, 2019).

3.5 Validação analítica através da CLAE equipada com o detector de arranjo linear de diodos (DAD) e espectro de absorção no Ultravioleta visível (UV-vis)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um detector de DAD é uma técnica essencial na análise de misturas complexas, sendo amplamente utilizada para a separação, identificação e quantificação de componentes em diversas matrizes. A CLAE se destaca por sua alta precisão, sensibilidade e capacidade de fornecer separações eficientes, tornando-se uma ferramenta indispensável em áreas como a química analítica, biotecnologia e controle de qualidade farmacêutica (Raydu, 2023; Isane; Waghmare; Kamble, 2022). A técnica cromatográfica, que teve sua origem na cromatografia por adsorção, foi desenvolvida pelo botânico Mikhail Tswett em 1906, estabelecendo-se como uma técnica essencial para a fracionamento de misturas complexas (Doifode *et al.*, 2021).

O cromatógrafo funciona com base na passagem de uma fase móvel líquida através de uma coluna preenchida com uma fase estacionária, onde ocorre a separação dos componentes da amostra. A fase móvel, geralmente composta por solventes orgânicos ou aquosos, é bombeada sob alta pressão, garantindo uma separação eficiente dos analitos devido às diferentes afinidades destes com as fases estacionária e móvel (Sadaphal; Dhamak, 2022; Isane; Waghmare; Kamble, 2022). Desse modo, a separação dos componentes individuais ocorre em uma coluna, com base na diferença no grau de interação entre os componentes da amostra e a coluna. Componentes que possuem menor interação com a coluna são eluídos primeiro, sendo essas interações influenciadas por fatores como adsorção, interações hidrofílicas, hidrofóbicas, eletroafinidade, penetração e exclusão (Dofoides *et al.*, 2021).

Um sistema de CLAE típico é composto por um reservatório de solventes, uma bomba, um injetor, uma coluna cromatográfica e um detector. A fase móvel, contida no reservatório, é bombeada através do sistema a alta pressão, levando a amostra injetada à coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos componentes com base em suas interações com a fase estacionária. O detector registra a eluição dos componentes, fornecendo dados que permitem sua identificação e quantificação (Isane; Waghmare; Kamble, 2022). Sendo assim, a escolha adequada dos solventes para a fase móvel e do material da coluna é crucial para o sucesso da separação, pois influencia na resolução, seletividade e eficiência. Solventes como acetonitrila e metanol são frequentemente usados devido à sua capacidade de dissolver uma ampla gama de compostos e promover interações eficazes com a fase estacionária, geralmente composta por partículas de sílica modificada (Sadaphal; Dhamak, 2022).

Existem diferentes modos de cromatógrafos, cada um adaptado a tipos específicos de separação. Na cromatografia de fase normal, a fase móvel é apolar e a fase estacionária é polar, no qual os analitos polares são retidos na fase estacionária, resultando em tempos de eluição mais longos. Essa técnica utiliza sílica quimicamente modificada como fase estacionária, e os compostos polares aderem à sílica por mais tempo, enquanto os compostos apolares são eluídos mais rapidamente. Enquanto na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar ou moderadamente polar. A separação baseia-se na interação hidrofóbica, onde os analitos menos polares são retidos por mais tempo na fase estacionária, enquanto os componentes mais polares são eluídos primeiro (Sadaphal; Dhamak, 2022).

Dessa forma, a CLAE é fundamental na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, onde é usada para validar métodos analíticos e assegurar a consistência e qualidade dos produtos farmacêuticos. A técnica de CLAE acoplada a um detector de DAD (CLAE-DAD) possui a capacidade de realizar análises precisas, com uma elevada sensibilidade para detectar pequenas quantidades de compostos (Gupta *et al.*, 2022). Os métodos analíticos cromatográficos são essenciais na indústria farmacêutica para a análise de substâncias, impurezas e excipientes, e são utilizados para a purificação e separação de compostos (Dofoidé *et al.*, 2021).

A validação analítica é um processo crítico que assegura que um método analítico seja adequado ao seu propósito, fornecendo resultados confiáveis e reproduzíveis (ANVISA, 2017). Esse processo é essencial para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos, conforme exigido pelas diretrizes (Gupta *et al.*, 2021). Nesse contexto, a validação de métodos analíticos é um processo essencial na indústria farmacêutica para garantir que os métodos utilizados na quantificação de fármacos sejam precisos, exatos, específicos e robustos. Esse processo é orientado por diretrizes estabelecidas por organismos reguladores como o *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Logo, esses parâmetros são fundamentais para assegurar a qualidade e segurança dos produtos farmacêuticos.

Além disso, a abordagem de Desenvolvimento de Qualidade por Design (AQbD) têm sido amplamente explorados no desenvolvimento de métodos analíticos, pois visa garantir que os métodos sejam robustos e confiáveis desde as etapas iniciais de desenvolvimento, permitindo um melhor entendimento das variáveis críticas que afetam o desempenho do método. Essa abordagem inclui a definição de um Espaço de Design Analítico, onde parâmetros como a seletividade, precisão e robustez são sistematicamente avaliados para garantir que o método funcione de forma consistente dentro de um intervalo controlado de condições. Além disso, a

AQbD facilita a identificação e mitigação de riscos associados ao método analítico, assegurando que ele seja capaz de fornecer resultados precisos e reprodutíveis em diferentes condições operacionais (Salwa; Kumar, 2023; Saha; Pandey, 2021).

Segundo as diretrizes do ICH Q2(R1) e ANVISA, a validação analítica deve abordar parâmetros críticos, incluindo seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) e robustez.

A seletividade de um método analítico é crucial para garantir que ele possa diferenciar e quantificar o analito de interesse, mesmo na presença de outros componentes da matriz, como impurezas ou produtos de degradação. Este parâmetro é particularmente importante em formulações como nanopartículas, onde a precisão do método pode ser comprometida pela interferência de excipientes. Estudos recentes têm demonstrado que, com o uso de técnicas avançadas de CLAE-DAD, é possível alcançar alta seletividade e especificidade, garantindo a confiabilidade dos resultados (Permana *et al.*, 2023).

Outro parâmetro estabelecido pelas diretrizes reguladoras, é a linearidade que avalia a capacidade do método em observar a relação da concentração com o tipo de detecção utilizada ao analito ao longo de uma faixa específica. Assim, os métodos validados seguindo as diretrizes da ICH e ANVISA geralmente apresentam excelente linearidade, com coeficientes de correlação (R^2) próximos de 1,0, o que assegura a precisão dos resultados em diferentes concentrações (Pardhi; Pant; Flora, 2020).

A precisão de um método analítico é avaliada pela sua reprodutibilidade sob condições idênticas, enquanto a exatidão mede a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro. Estudos mostram que métodos validados de acordo com as normas da ICH e ANVISA têm apresentado desvios padrões relativos (DPR%) inferiores a 2%, indicando alta precisão. A exatidão, frequentemente avaliada por meio de testes de recuperação, tem mostrado que os resultados estão dentro dos limites aceitáveis, reforçando a confiabilidade do método (Saha; Pandey, 2021).

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) são parâmetros que determinam a menor quantidade de analito que pode ser detectada e quantificada com precisão. Em estudos recentes, métodos desenvolvidos para a quantificação de compostos em matrizes complexas têm demonstrado valores de LOD e LOQ significativamente baixos, o que evidencia a alta sensibilidade e a adequação desses métodos para quantificação de fármacos em nanopartículas através da CLAE de fase reversa (Sathishbabu *et al.*, 2022).

Por fim, robustez é testada ao avaliar a capacidade do método em resistir a pequenas variações nos parâmetros operacionais, como mudanças na temperatura da coluna, na proporção

da fase móvel ou no fluxo da fase móvel. Dessa forma, esse parâmetro é essencial para garantir que o método seja confiável em diferentes condições experimentais. Estudos indicam que métodos analíticos robustos mantêm a consistência dos resultados mesmo quando submetidos a variações controladas, conforme as diretrizes da ICH (Salwa; Kumar, 2023).

O desenvolvimento de métodos analíticos frequentemente usa a abordagem "um fator de cada vez" (OFAT), que altera uma variável por vez, mas oferece um entendimento limitado da robustez do método. Em contraste, a abordagem AQbD fornece um processo sistemático e mais aprofundado para desenvolver métodos analíticos mais robustos (Salwa; Kumar, 2023).

Portanto, a validação analítica segundo as diretrizes ICH e ANVISA é um processo para garantir que os métodos utilizados na indústria farmacêutica sejam precisos, reprodutíveis e robustos e adequados para a suas aplicações específicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, será descrita a metodologia utilizada para a preparação, caracterização físico-química das nanoesferas, validação da metodologia analítica e os ensaios *in vitro*.

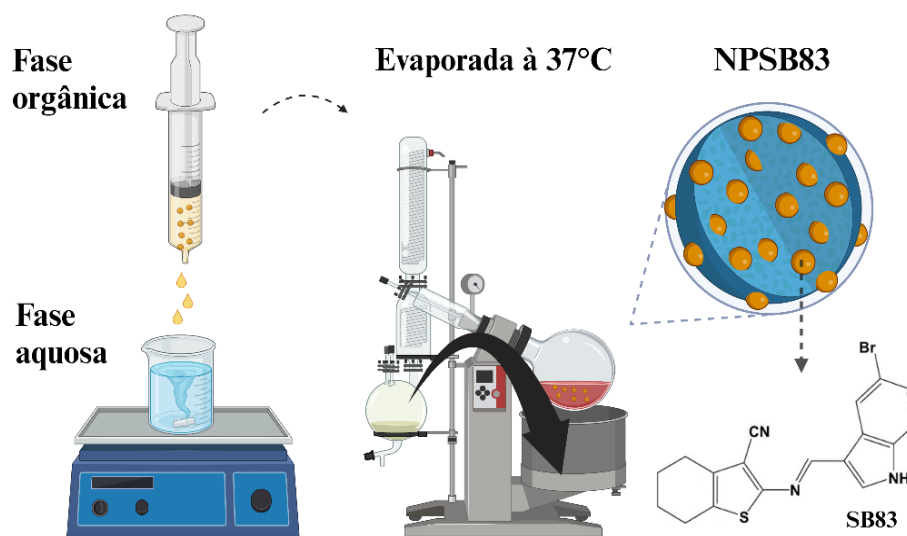
4.1 Materiais

Poly(*D,L*-lactide) (Sigma Alderich, USA); Acetona (Merck, Brasil); Acetonitrila grau analítico (Baker, USA); Pluronic-F68® (Sigma Alderich, USA); Lipoid® S-100; D-(+)-Trehalose dihydrate 99% (Alfa Aesar, USA); Metanol grau analítico (Biograde, Brasil); água ultra-pura tipo I, 2-[(5-bromo-indol-3-il)-amino]-5,6,7,8-tetra-hidro-4*H*-ciclo-hepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (SB83), (sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas); Soro fetal bovino (FBS); Dulbecco's modified eagle medium (DMEM); Meio Schneider; Metilfosina; solução de dodecil sulfato de sódio a 10%, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mallinckrodt Chemicals, USA); meio RPMI; Membrana de Diálise MWCO 12,000 (Sigma Aldrich, Brazil).

4.1.1 Preparação das nanoesferas de PLA contendo o SB83

As nanoesferas de PLA com SB83 (NPSB83) foram preparadas seguindo o método de nanoprecipitação descrito por Fessi *et al.*, (1989), ilustrado na figura 6.

Figura 6 - Produção das nanoesferas de SB83 pelo método da nanoprecipitação



Fonte: Autor (2024).

A metodologia da formulação das nanoesferas seguiu os procedimentos descritos por Melo (2018). A fase aquosa consistiu em 400 mg de Pluronic-F68[®] dissolvido em 40 mL de água destilada, agitando-se a 1200 rpm. A fase orgânica foi composta por 50 mg de PLA, 50 mg de Lipoid[®] (lecitina de soja) e 2 mg de SB83 em 8 mL de acetona. A fase orgânica foi adicionada lentamente à fase aquosa enquanto se agitava a 1.200 rpm a 25°C durante aproximadamente 10 minutos. Finalmente, a formulação obtida foi rota-evaporada a 37°C, sob pressão negativa por 30 minutos, para remoção do solvente orgânico, resultando na suspensão final (NPSB83). As nanoesferas brancas (BNP), foram preparadas sob a mesma condição sem a adição do SB83.

4.1.2 Liofilização

A liofilização das nanoesferas foi realizada através do liofilizador (Alpha 1-2 LDplus, CHRIST), com um volume de amostra limitado a 1,5 cm de altura. O crioprotetor trealose foi empregado em uma concentração de 5% (2 mL de amostra/100 mg de trealose). As etapas incluíram pré-congelamento *overnight* ($-20 \pm 5^\circ\text{C}$); congelamento durante 2 horas no condensador ($-60 \pm 5^\circ\text{C}$) e liofilização primária durante 24 horas. As NPSB83 foram liofilizadas sem trealose (NPSB83FD) e com 5% de trealose (NPSB83TFD). Em seguida, as NPs foram armazenadas em frascos de vidro fechado e refrigeradas a 4°C até posterior processamento.

4.1.3 Caracterização morfológica e físico-química das nanoesferas

As NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD foram analisadas quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e eficiência de encapsulação, a fim de avaliar a estabilidade do sistema.

4.1.4 Análise do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio e o PDI das nanoesferas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS, Dynamic Light Scattering) utilizando um equipamento Zetasizer Ultra Red (Malvern, Reino Unido). O potencial zeta das partículas foi avaliado através da mobilidade eletroforética sob um campo elétrico. As amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção 150 µl de NPs para 850 µl de água ultra-pura tipo I, e adicionadas em

células eletroforéticas com potencial de ± 150 mV. Todas as medições foram conduzidas em triplicata para cada tipo de amostra, as quais incluíram BNP, NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD. Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

4.1.5 A eficiência de encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação (EE) do NPSB83 foi avaliada utilizando espectroscopia UV-visível (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Alemanha) empregando os métodos indiretos e diretos. Após a preparação, os NPs foram ultracentrifugados a 20.000 rpm durante 20 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram recolhidos, diluídos com metanol e posteriormente analisados a um comprimento de onda de 392 nm.

No método direto, o pellet resultante da centrifugação foi ressuspensão em 2 mL de metanol e submetido a três ciclos de agitação em vórtice para quebrar as PNPs. Posteriormente, uma alíquota de 50 μ l foi removida e diluída em metanol até um volume final de 5 mL. Esta solução foi então analisada no comprimento de onda de 392 nm utilizando a equação da reta ($y = 0,0754x - 0,0018$). A EE foi determinada e calculada usando a equação (1):

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade final}}{\text{Quantidade inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Onde a quantidade inicial é a quantidade de SB83 inicialmente adicionada à formulação e a quantidade final é a quantidade de SB83 que foi encapsulada nas NPs.

Para o método indireto, 500 μ l do sobrenadante das NPs foram diluídos em 4.500 μ l de metanol. O EE% pelo método indireto foi calculado através da equação (2):

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade inicial} - \text{Quantidade não encapsulada}}{\text{Quantidade inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde a quantidade inicial é a quantidade de SB83 adicionada inicialmente à formulação. A quantidade não encapsulada é a quantidade de SB83 que não foi encapsulada e permanece no sobrenadante após a centrifugação das NPs.

4.1.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A caracterização morfológica das PNPs foi obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão (JEM-1230 JEOL) com voltagem de 120 kV. As amostras foram contrastadas com uma solução de ácido fosfotúngstico 2% (p/v) e depositadas em grids de cobre.

4.1.7 Estudo de liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* do SB83 das PNPs foi realizada através da metodologia da membrana de diálise, que foi previamente hidratada com água destilada e imersa em uma solução tampão de fosfato de sódio no pH 7,4. As análises foram realizadas para BNP, NPSB83, NPSB8FD e as NPSB83TFD e os resultados foram expressos como liberação cumulativa de fármaco. Foi utilizado 2 mL das formulações de nanoesferas e colocada em um banho-maria contendo 100 mL de solução tampão (agitação a 60 rpm, a 37°C). Em seguida, 1 mL da solução foi coletado em intervalos específicos (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas), e o mesmo volume de tampão fosfato de sódio foi adicionado. As amostras coletadas foram analisadas utilizando espectroscopia UV-visível, utilizando os mesmos parâmetros da metodologia de eficiência de encapsulação. Em seguida, os modelos de liberação zero-ordem, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Salim foram utilizados para ajustar o padrão de liberação do fármaco *in vitro* para avaliar o mecanismo de liberação. E os dados experimentais foram ajustados a diversos modelos cinéticos para determinar o perfil de liberação mais adequado (Tabela 1). Os modelos cinéticos avaliados incluíram: ordem zero (Equação 3), primeira ordem (Equação 4), Higuchi (Equação 5), Hixson-Crowell (Equação 6) e Korsmeyer-Peppas (Equação 7).

Tabela 1- Modelos matemáticos para determinar o perfil de liberação

Modelos cinéticos	Equação
Ordem zero	$\frac{M(t)}{M(\infty)} = k_0 t$ (3)
Primeira ordem	$\frac{M(t)}{M(\infty)} = e^{-k_1 t}$ (4)
Higuchi	$\frac{M(t)}{M(\infty)} = k H_2^1$ (5)
Hixson-Crowell	$\frac{M(t)}{M(\infty)} = 1 - (1 - k_{HC} t)^3$ (6)
Korsmeyer-Peppas	$\frac{M(t)}{M(\infty)} = k_{KP} t^n$ (7)

Onde M(t) representa a quantidade de SB83 liberada em um tempo específico (t), e M(∞) corresponde à quantidade total de SB83. As constantes k₀; k₁; k_H; k_{HC} e k_{KP} referem-se, respectivamente, às constantes dos modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Korsmeyer-Peppas, enquanto “n” é o expoente que caracteriza o mecanismo de liberação.

Os resultados de liberação ao longo do tempo foram plotados e ajustados a esses modelos utilizando o software (DDE Solver do Microsoft Office Excel). A análise consistiu na realização de regressão linear para cada modelo, com a determinação do coeficiente de correlação (R^2). O modelo com o maior coeficiente de correlação foi considerado o mais adequado para descrever a cinética de liberação observada.

4.2 Ensaios de atividade anti-leishmania *in vitro*

Na metodologia utilizada para os testes *in vitro* foi utilizada as formulações de nanoesferas (NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD) em comparação com o fármaco livre (SB83) e o medicamento de referência (Miltefosina). As BNP foram utilizadas como controle negativo.

4.2.1 Cultura dos parasitas e células

Os testes *in vitro* foram conduzidos com os parasitas *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider a 26 °C em uma incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD). O meio Schneider foi suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina ($\mu\text{g/mL}$). Em seguida, diferenciamos as formas promastigotas alterando as condições para o meio Schneider suplementado com 5% de FBS, pH 4,6, e uma temperatura de 32°C para obter formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*. Enquanto isso, macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em frascos de cultura celular de 750 cm^2 utilizando meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina 100 U/mL, e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (DMEM completo) e incubados a 37°C e 5% de CO_2 .

4.2.2 Atividade anti-leishmania das formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*

As culturas de formas promastigotas e amastigotas axênicas em crescimento logarítmico (1×10^6 parasitas/mL) foram incubadas em placas de 96 poços contendo 100 μL de meio Schneider suplementado, em triplicata. Foram adicionadas concentrações seriadas de NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD e SB83 livre (50–1,56 μM) e do medicamento de referência miltefosina (100–3,12 μM). BNP foram utilizados como controle negativo. As culturas foram

incubadas em um forno de demanda biológica de oxigênio (modelo Eletrolab EL202, São Paulo, Brasil) a 26°C para promastigotas e 32°C para amastigotas axênicas por 72 h. Em seguida, 10 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço para avaliação colorimétrica da inibição do crescimento. A placa foi incubada por mais 4 h, seguida da adição de 50 µL de solução de dodecil sulfato de sódio a 10% para a formação de cristais de formazan antes da leitura da densidade óptica da cultura em um leitor de espectrofotômetro de microplacas. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de teste e referência de 540 e 620 nm, respectivamente, utilizando um espectrofotômetro de microplacas. O controle negativo consistiu em 0,2% de meio Schneider com BNP, considerado 100% viabilidade.

4.2.3 Determinação da citotoxicidade em macrófagos e índice de seletividade

Inicialmente, 100 µL de meio DMEM completo com 1×10^6 macrófagos (RAW 264.7) foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços. A placa foi colocada em uma incubadora (37°C, 5% CO₂) (Sanyo, modelo COM-15A, Sanyo Electric Co., Japão) por 4 horas para promover a adesão celular. Após esse período, duas lavagens foram realizadas com meio DMEM previamente aquecido (37°C) para remover células não aderidas. As nanoesferas e miltefosina foram adicionadas aos poços em concentrações seriadas de 400 a 25 µM e incubadas por 48 horas. Em seguida, 10 µL de MTT a uma concentração final de 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e incubados por 4 horas. A placa foi então agitada por 30 minutos e lida nos comprimentos de onda de teste e referência de 550 e 620 nm, respectivamente, em um leitor de placas. As BNP foram utilizadas como controle negativo e considerado 100% de viabilidade dos macrófagos. O índice de seletividade para cada tratamento foi calculado como a razão entre a concentração de citotoxicidade dos macrófagos RAW 264.7 (CC₅₀) e a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) ou concentração efetiva (CE₅₀), conforme medido para as diferentes formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*.

4.3 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do SB83 nas nanoesferas utilizando a abordagem Quality by design (AQbD)

A abordagem analítica Quality by design (AQbD) foi realizada para o desenvolvimento de um método analítico através do cromatógrafo líquido de fase reversa acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrofotômetro UV-vis. Através da abordagem AQbD foi realizado um desenho experimental para avaliar múltiplos fatores críticos que influenciam a

robustez e a qualidade do método. Os seguintes parâmetros críticos foram considerados: composição da fase móvel (porcentagem de MeOH), volume de injeção e taxa do fluxo da fase móvel.

4.3.1 *Planejamento experimental*

O método de superfície de resposta via desenvolvimento Box-Behnken foi utilizado para determinar os melhores parâmetros no método de quantificação do SB83 por CLAE. Este modelo de experimento é uma poderosa ferramenta estatística para o desenvolvimento de métodos analíticos por CLAE. Os fatores independentes de A) MeOH (%), B) volume de injeção (μL) e C) fluxo (mL/min) foram otimizados para monitorar seu efeito nas variáveis de resposta: tempo de retenção (RT), fator de cauda (TF) e números de pratos teóricos (N). Os fatores independentes foram otimizados em 3 níveis: A: 80(-1), 90(0), 100 (1); B: 10(-1), 15(0), 20(1); C: 0,8(-1), 1,2(0), 1,6(1) de acordo com a tabela 2.

Tabela 2- Parâmetros do experimento de Box-Behnken.

Fatores independentes	Unidade	Símbolo	Níveis		
			-1	0	1
Metanol	%	A	80	90	100
Volume de injeção	μL	B	10	15	20
Fluxo	mL/min	C	0,8	1,2	1,6

Fonte: Autor (2024).

O desenvolvimento do método analítico foi realizado em um cromatógrafo líquido da Shimadzu (Modelo LC-20A Prominence) equipado com um detector de DAD e UV-Vis e uma coluna de sílica C_{18} . As análises cromatográficas foram realizadas no modo isocrático com um tempo de análise de 10 minutos. A fase móvel eluída foi 80% de metanol e 20% de água ultra-pura tipo I a um fluxo de 1,5 mL/min . O volume de injeção da amostra foi estabelecido em 10 μL e o comprimento de onda de detecção de 392 nm. O tempo de corrida estabelecido foi de 10 minutos com temperatura fixada em 40 °C. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software de dados de cromatografia *LabSolutions*.

4.3.2 *Preparo da solução padrão*

A solução padrão foi preparada na concentração final de 1mg/mL, em triplicata, foram realizadas diluições com metanol no balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, a solução foi

submetida ao banho de ultrassom durante 25 minutos e filtrada com um filtro de 0,22 μ M. Posteriormente, foi retirado 1 ml da solução filtrada para um balão de 10 mL para obter a solução na concentração de 100 μ g/mL, que foi a solução de trabalho para as diluições.

4.3.3 Curva de calibração

Através das alíquotas apropriadas da solução padrão do SB83, foram obtidas as seguintes concentrações para a curva de calibração: 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 μ g/mL para o SB83. Todas as amostras foram filtradas em filtros de seringa de PVDF (difluoreto de polivinilideno) de 0,22 μ m. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata. A curva de calibração foi plotada no plano cartesiano entre a área do pico versus a concentração conhecida do analito. Assim, a linearidade foi observada a partir da curva analítica nos respectivos níveis de concentração. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e determinado o coeficiente de correlação linear (R). O critério mínimo aceitável considerado do coeficiente de correlação (R) foi de 0,999, conforme recomendado pelo ICH (Q2) e ANVISA.

4.3.4 Seletividade

Para o ensaio de seletividade, a BNP foi inicialmente preparada e, em seguida, submetida à ultracentrifugação a 20.000 rpm durante 20 minutos. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi coletado e diluído na proporção de 500 μ L para 5 mL de metanol. A amostra diluída foi filtrada, e a solução resultante foi submetida à leitura no equipamento. Foram preparadas três soluções padrão de SB83 na concentração correspondente ao ponto médio da curva (10 μ g/mL). Em cada uma dessas soluções padrão, foram adicionados 500 μ L do sobrenadante das BNP para avaliar a interferência do sobrenadante das nanoesferas. As leituras no equipamento foram realizadas nas condições padronizadas.

4.3.5 Precisão

A precisão foi expressa numericamente por meio da estimativa da área do pico e do desvio padrão relativo (DPR%), também conhecido como coeficiente de variação de uma série de repetições de amostras em diferentes preparações e com dois analistas distintos. A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas considerando a injeção do analito em três níveis (baixo, médio e alto, ou seja, 8, 10 e 12 μ g/mL, ($n= 3$) em três dias

diferentes. Foram utilizadas 3 soluções mães independentes para as diluições na concentração final em triplicada, de um ponto baixo (8 µg/mL), um ponto médio (10 µg/mL) e um ponto alto (12 µg/mL). A repetibilidade (precisão intra-dia) foi avaliada com leituras realizadas em triplicatas nas concentrações definidas. A precisão intermediária (inter-dia) foi conduzida por 2 analistas, em 2 dias distintos da repetibilidade para avaliar a consistência dos resultados ao longo do tempo e entre operadores diferentes. Os resultados de precisão foram expressos como DPR % (Equação 8), conforme recomendado pelas diretrizes da ICH e ANVISA garantindo assim a confiabilidade do método analítico desenvolvido.

$$DPR (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média das áreas do cromatograma}} \times 100 \quad (8)$$

4.3.6 Exatidão

A exatidão foi verificada a partir de 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações, com três réplicas em cada nível: o ponto baixo (8µg/mL), médio (10µg/mL) e alto (12µg/mL). Por fim, foram realizados os cálculos de exatidão, a taxa de recuperação com desvio padrão aceitável de até 2% (Equação 9).

$$\text{Taxa de recuperação } (\%) = \frac{\text{Concentração real}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

Onde a concentração real é a concentração do SB83 calculada através das médias das áreas do cromatograma e concentração teórica a concentração conhecida.

4.3.7 Robustez

Segundo a ICH e a ANVISA, a robustez de um método analítico deve ser avaliada para determinar a sua capacidade de permanecer inalterado perante pequenas variações dos parâmetros do método. As análises foram realizadas através de uma mesma amostra da concentração do ponto central, 10µg/mL, variando parâmetros críticos do método, sendo alterado um parâmetro por vez: fluxo de fase móvel (1,6, 1,5 e 1,4), temperatura da coluna (38, 40 e 42°C) e proporção de fase móvel metanol:água (82:18, 80:20 e 78:22). Por fim, foram calculados a taxa de recuperação (%) (Equação 9).

4.3.8 Limites de detecção e de quantificação

Os LOD e LOQ foram estabelecidos utilizando a curva analítica, e os cálculos foram realizados através de um método que incorpora tanto a inclinação quanto o intercepto da curva de calibração. Esta abordagem segue as diretrizes da ICH e ANVISA. A partir da equação fornecida da curva de calibração e do desvio padrão dos resíduos, o LOD e o LOQ foram calculados utilizando as equações 10 e 11.

$$LOD = \frac{\sigma}{b} \times 3,3 \quad (10)$$

Onde, σ é o desvio padrão médio do intercepto y e b a inclinação da curva.

$$LOQ = \frac{\sigma}{b} \times 10 \quad (11)$$

Onde, σ é o desvio padrão médio do intercepto y e b a inclinação da curva.

4.4 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, e todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para avaliar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância bidirecional (ANOVA) seguida do teste pós-hoc de Tukey foi realizada para comparações entre os grupos, adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância estatística. Para a otimização dos parâmetros experimentais da validação analítica, empregou-se a metodologia de superfície de resposta por meio do Design de Experimentos (DoE) com o desenvolvimento Box-Behnken. A significância dos fatores e suas interações foi determinada pela ANOVA, e a adequação do modelo foi verificada através da análise dos resíduos. Utilizou-se a função de desejabilidade para otimização das condições experimentais, e os resultados foram validados experimentalmente. O teste de Shapiro-Wilk também foi aplicado para a avaliação da distribuição normal dos resíduos, com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A significância da curva de calibração foi testada utilizando o teste ANOVA F, com um intervalo de confiança de 95%. Nos ensaios *in vitro*, os valores de CI_{50} , CE_{50} e CC_{50} foram calculados (com intervalos de confiança de 95%) por meio de regressão não linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os resultados da caracterização físico-química das nanoesferas de SB83, a validação da metodologia analítica, além dos testes de citotoxicidade em macrófagos e da atividade anti-leishmania. Cada um desses aspectos será destacado as implicações dos achados para o desenvolvimento e a aplicação das nanopartículas encapsuladas com o fármaco como potencial terapêutico.

5.1 Preparação e caracterização das nanoesferas de PLA contendo SB83

As nanoesferas foram preparadas utilizando a metodologia da nanoprecipitação, conforme descrito por Fessi *et al.*, (1989) e caracterizadas utilizando os parâmetros: tamanho médio, PDI, potencial zeta, EE, morfologia e cinética de liberação *in vitro*.

A normalidade dos dados foi verificada através do teste do Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). E, os dados experimentais foram analisados utilizando ANOVA bidirecional, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, para comparação entre as médias para identificar diferenças significativas entre os grupos.

5.1.1 Determinação do tamanho médio, PDI e potencial zeta

Os dados da tabela 3 está representado pela média $\pm$ desvio padrão das amostras ao longo de 90 dias. O diâmetro médio das BNP foi comparado entre as nanoesferas encapsuladas com o SB83 (NPSB83), NPSB83 liofilizadas sem trealose (NPSB83FD) e liofilizadas com trealose (NPSB83FDT) através do teste ANOVA bidirecional seguido pelo teste de Tukey. Os dados indicaram que o diâmetro médio das PNPs variou significativamente entre as diferentes formulações, $p < 0,0001$, exceto para a comparação entre a formulação em suspensão (NPSB83) e a liofilizada com adição de trealose (NPSB83TFD) no qual as diferenças não foram significativas, $p = 0,3588$ (tabela 3).

Conforme demonstrado na tabela 3, as BNP apresentaram um tamanho médio de $180,6 \pm 0,75$ nm e PDI de $0,152 \pm 0,06$. Por outro lado, as NPSB83 apresentaram um tamanho médio de $205,7 \pm 4,75$ nm com um PDI de $0,274 \pm 0,04$. Esses resultados indicam que a incorporação do SB83 nas PNPs resultou em um aumento no tamanho médio e maior polidispersão ($p < 0,001$), ou seja, devido a presença do fármaco na matriz polimérica (Zielinska *et al.*, 2020). Além disso, as BNP e as NPSB83 apresentaram PDI inferior a 0,3 e as diferenças entre as

médias não foram significativas, sugerindo homogeneidade no diâmetro das nanoesferas em suspensão, o que pode ser favorável à sua circulação sanguínea e interação com macrófagos (Dalmolin; Khalil; Mainardes, 2016). Esses achados estão de acordo com estudos anteriores, como o de Singh *et al.*, 2018, que observaram um aumento no tamanho das nanopartículas de PLGA, correlacionado com a quantidade de anfotericina B encapsulada (Singh *et al.*, 2018). Além disso, o tamanho das PNPs próximo de 200 nm revela um aumento no direcionamento intracelular das PNPs (Mohan *et al.*, 2020).

Tabela 3 - Análise comparativa do tamanho médio (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta entre as NPSB83 com as BNP, NPSB83FD e NPSB83TFD

Formulações	Tamanho médio	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta
BNP	180,60 ± 0,75****	0,152 ± 0,06	- 19,3 ± 0,35
NPSB83	205,70 ± 4,75	0,274 ± 0,04	-20,40 ± 0,65
NPSB83FD	273,20 ± 0,11****	0,425 ± 0,03	-19,60 ± 0,12
NPSB83TFD	207,60 ± 0,08	0,355 ± 0,19	-18,10 ± 0,19

Autor (2024).

O tamanho das PNPs são fatores essenciais no desenvolvimento de nanoformulações, pois influenciam diretamente a estabilidade dos sistemas de liberação, a adesão às células, a liberação celular e a eficácia na liberação do fármaco. Além disso, nanopartículas com tamanhos menores são capazes de penetrar de maneira mais eficiente nas lesões cutâneas da leishmaniose, promovendo uma liberação sustentada do fármaco no local da infecção (Esfandiari *et al.*, 2019). Mohan *et al.*, (2020), relatou que a captação de PNPs no tamanho próximo a 200 nm foi significativamente maior em células inflamatórias em comparação com células saudáveis. Sendo assim, no contexto da LC que causa inflamação nos tecidos infectados, PNPs de tamanho próximo a 200 nm, mostram uma maior internalização em células inflamatórias, longo tempo de circulação e redução da opsonização, resultando em uma entrega direcionada do fármaco ao local de infecção e que as nanopartículas carregadas com fármacos atinjam eficientemente os macrófagos infectados pelo parasita *Leishmania*, que frequentemente se localizam em tecidos inflamados (Esfandiari *et al.*, 2019; Dalmolin; Khalil; Mainardes, 2016; Mohan *et al.*, 2020; Perry *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2023). Assim, um longo tempo de circulação e a redução da opsonização permitem que as nanopartículas carregadas com fármacos atinjam eficientemente os macrófagos infectados pelo parasita *Leishmania*, que frequentemente se localizam em tecidos inflamados (Owens; Peppas, 2006; Dalmolin; Khalil; Mainardes, 2016). Portanto, isso sugere que as NPSB83 podem ser particularmente eficazes no direcionamento de

tecidos inflamados onde a *Leishmania* está presente, melhorando a eficácia do tratamento e reduzindo a carga parasitária.

Após a liofilização, as NPSB83FD demonstraram um aumento no tamanho médio ($273,2 \text{ nm} \pm 0,11$, $p < 0,0001$) e PDI ($0,425 \pm 0,03$) (tabela 3). A técnica de liofilização foi empregada para remover a água da suspensão, preservando a estabilidade física e química das PNPs e evitando a liberação do fármaco durante o armazenamento em meio aquoso. No entanto, o processo de liofilização pode introduzir tensões desestabilizadoras nas PNPs e este aumento no tamanho das nanoesferas e na polidispersão pode ser atribuído à agregação das partículas durante o processo de liofilização (Pulingam *et al.*, 2022). Semelhante a esse aumento de tamanho das NPSB83FD, Amekyeh e Bila (2021), encontraram um aumento no tamanho individualmente das nanopartículas lipídicas de anfotericina B, paracetamol e sulfasalazina após a liofilização, que apresentou faixa de tamanho no intervalo de $265 \pm 40,7$ a $333,6 \pm 56,8$ nm. Nessa perspectiva, estudos mostram que a adição de crioprotetores, pode ajudar a minimizar esses efeitos e proteger os nanocarreadores durante esse processo, estabilizando as nanopartículas durante o congelamento e secagem (Elbrink *et al.*, 2023; Yacasi *et al.*, 2017).

Contudo, quando 5% de trealose foi adicionado como crioprotetor durante a liofilização das PNPs, o tamanho médio entre a NPSB83 e NPSB83FDT não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,3588$), enquanto a diferença do tamanho entre as NPSB83FD e NPSB83TFD foram altamente significativas ($p < 0,0001$), sugerindo a eficiência da trealose como crioprotetor (tabela 3). Outros estudos corroboram com esses resultados, e indicaram que 5% de trealose permite a liofilização de PNPs sem agregação ou aumento do tamanho das partículas após a reconstituição (Elbrink *et al.*, 2023). A trealose possui menor higroscopicidade, pouca reatividade química e temperatura elevada de transição vítrea, tornando um crioprotetor adequado (Esfandiari *et al.*, 2019). Este açúcar forma ligações de hidrogênio com grupos polares na superfície das PNPs durante o processo de secagem, atuando como substitutos da água (Elbrink *et al.*, 2023; Yacasi *et al.*, 2017). Essas descobertas estão alinhadas com esse estudo, em que a liofilização com 5% de trealose como crioprotetor foi investigada, e os resultados indicaram que NPSB83TFD ($207,6 \text{ nm} \pm 0,08$) mantiveram um tamanho médio próximo as das NPSB83 com PDI um pouco maior ($0,355 \pm 0,03$), e sem diferenças estatísticas significativas entre as PNPs em suspensão e a liofilizada com trealose. Sendo assim, este fenômeno ressalta a influência da liofilização, com e sem adição do crioprotetor, na estabilidade da nanoformulação.

Dessa forma, a trealose têm se mostrado eficaz na preservação das propriedades PNPs, especialmente devido à sua menor higroscopicidade, reduzida reatividade química e alta

temperatura de transição vítrea. Em estudos anteriores, foi demonstrado a eficácia da trealose como crioprotetor para PNPs de ácido hialurônico/quitosana, exigindo concentrações mais altas de trealose (2-5% p/v) para prevenir a agregação e manter a redispersibilidade das nanopartículas (Umerska *et al.*, 2018). Dessa forma, isso pode indicar que a trealose utilizada como crioprotetor durante a liofilização manteve efetivamente o tamanho das nanoesferas, evitando assim alterações significativas nas NPSB83.

Por fim, para avaliar a estabilidade coloidal PNPs, foram medidos os valores de potencial zeta das diferentes formulações (BNP, NPSB83, NPSB83FD e NPSB83FDT), e aplicado o teste estatístico ANOVA bidirecional, seguido do teste de Tukey. Na tabela 3, observa-se que todas as formulações (BNP, NPSB83, NPSB83FD e NPSB83FDT) apresentam potenciais zeta negativos, variando aproximadamente de -18,1 mV a -20,4 mV, e as diferenças estatísticas não foram significativas, apresentando variações mínimas em cada triplicata.

Os resultados indicam que as BNP apresentaram um potencial zeta de $-19,3 \pm 0,35$ mV (Tabela 3). Após a incorporação do SB83 nas NPSB83, observou-se um potencial zeta de $-20,4 \pm 0,65$ mV, sem diferenças estatisticamente significativas em relação às BNP. As formulações liofilizadas, NPSB83FD e NPSB83TFD, exibiram potenciais zeta de $-19,6 \pm 0,12$ mV e $-18,1 \pm 0,19$ mV, respectivamente, também sem diferenças significativas. Esses valores indicam que todas as formulações possuem uma carga superficial negativa suficiente para garantir a estabilidade coloidal, prevenindo a agregação e mantendo as nanoesferas dispersas em suspensão aquosa, o que é essencial para a eficácia em aplicações terapêuticas.

O potencial zeta mede a carga na superfície das partículas, que é influenciada por mudanças na interface com o meio dispersante devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou à adsorção de espécies iônicas no meio aquoso (Zielinska *et al.*, 2020). As repulsões eletrostáticas entre as nanopartículas desempenham um papel crucial ao impedir a agregação, garantindo que elas permaneçam dispersas na solução (Amekyeh; Billa, 2021). Assim, potencial zeta é uma medida quantitativa da estabilidade coloidal induzida por carga. Em geral, a faixa do potencial zeta entre $|20|$ e $|30|$ mV são considerados indicativos de estabilidade eletrostática moderada, enquanto valores acima/baixo de ± 30 mV indicam alta estabilidade eletrostática das nanopartículas. Diante disso, o potencial zeta é um critério essencial para estimar a estabilidade ou instabilidade coloidal das dispersões de nanopartículas (Pochapski *et al.*, 2021; Elbrink *et al.*, 2023; Amekyeh; Billa, 2021).

Como relatado anteriormente, os potenciais zeta negativos abaixo de -20 mV podem ser suficientes para garantir uma estabilidade coloidal, mantendo as nanopartículas dispersas em suspensão aquosa (Pochapski *et al.*, 2021). Portanto, os valores de potencial zeta observados

sugerem que todas as formulações de PNPs apresentam uma estabilidade coloidal adequada, essencial para aplicações terapêuticas, especialmente na administração de fármacos.

Vale ressaltar, que os valores negativos do potencial zeta observados, podem ser atribuídos à presença de grupos terminais carboxila de PLA na superfície das PNPs e a incorporação do SB83 pode ser atribuído à natureza do fármaco e suas interações com a superfície das nanopartículas (Dalmolin; Khalil; Mainardes, 2016). Esse fato é decorrente da ionização desses grupos carboxila em solução aquosa, que resulta na formação de grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$), conferindo uma carga negativa à superfície das PNPs, contribuindo para a estabilidade coloidal ao impedir a agregação das nanoesferas encapsuladas com o SB83 (Titkov *et al.*, 2019). Esses valores negativos de potencial zeta também podem estar associados à dissociação das cadeias de poliéster do polímero dispersas na suspensão das PNPs (Zielińska *et al.*, 2020; Ostolska; Wiśniewska). Logo, esses resultados fornecem evidências de repulsão eletrostática entre as partículas, o que pode impedir a agregação e manter a desejável estabilidade das PNPs.

5.1.2 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE)

A EE das PNPs é crucial para garantir a estabilidade e a eficácia dos compostos encapsulados, destacando a importância de estratégias avançadas para melhorar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica desses sistemas de entrega (Rahim *et al.*, 2019). A EE direto e indireto, foi avaliada através do método através das NPSB83 preparadas através da técnica de nanoprecipitação. Os resultados exibiram eficiências de encapsulação de $64,92\% \pm 0,12$ e $88,43\% \pm 0,87$ para os métodos direto e indireto, respectivamente, demonstrando uma significativa incorporação do SB83 nas PNPs.

A nanoprecipitação é empregada para encapsular drogas hidrofóbicas, demonstrando que o método foi eficaz em encapsular o SB83 (Wang *et al.*, 2016; Neerooa *et al.*, 2021). A eficiência de encapsulação observada para a formulação NPSB83 é consistente com estudos anteriores que utilizaram a técnica de nanoprecipitação para preparar nanopartículas (Holley *et al.*, 2019; Pandey *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2024). Holley *et al.*, (2019) comparou a técnica de emulsão simples com a nanoprecipitação para encapsulação do fármaco anti-tumorantitumoral Dp44mT em nanopartículas de PLGA, revelando uma EE de até $77,5 \pm 12\%$ utilizando nanoprecipitação, demonstrando que as nanopartículas poliméricas podem ser uma alternativa eficaz para encapsulação de fármacos (Holley *et al.*, 2019).

A discrepância entre as EE, podem ser atribuídas às diferenças nos princípios de cada método e nas condições experimentais específicas. Além disso, há uma notável disparidade nos níveis de incorporação das substâncias ativas nas PNPs produzidas por nanoprecipitação (Tibúrcio *et al.*, 2024). Enquanto nos métodos diretos a eficiência de encapsulação é calculada diretamente a partir da quantidade de fármaco carregado nas PNPs, no método indireto considera-se a quantidade não aprisionada do fármaco (Amini *et al.*, 2017).

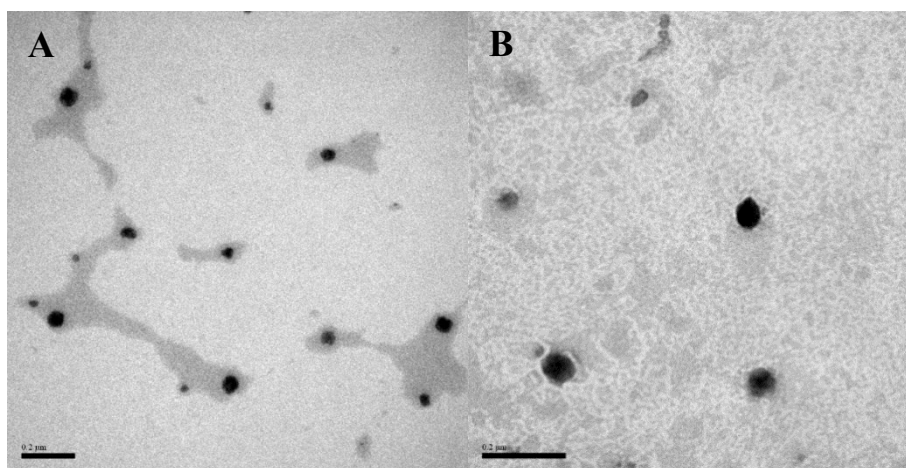
A característica hidrofóbica do PLA pode potencializar as taxas de liberação do fármaco e melhorar a eficácia do encapsulamento, atribuindo-se à interação entre o fármaco e as moléculas de PLA. Assim, a carga negativa na superfície do PLA pode facilitar a adsorção eletrostática de polycations (Paswan *et al.*, 2024). Estudos anteriores mostraram que formulações contendo PLA apresentam eficiência de encapsulação semelhante ao do SB83, indicando que o revestimento do PLA contribui para garantir que o fármaco encapsulado não seja liberado prematuramente no ambiente biológico antes de atingir os locais desejados (Lindner *et al.*, 2015; Ayyanaar *et al.*, 2023; Fernández *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2015).

Além disso, a encapsulação de fármacos hidrofóbicos, como o SB83, tende a ser mais eficiente em comparação com fármacos hidrofílicos, uma vez que estes últimos possuem maior afinidade pela fase aquosa externa, resultando em uma menor EE. No estudo publicado por Buhecha *et al.*, (2019), foi encontrado uma maior EE para o fármaco hidrofóbico (budesonida) do que para o fármaco hidrofílico (teofilina), utilizando a metodologia do método de difusão de solvente de dupla emulsificação, com a maior EE de $48,20\% \pm 27,57$ representado pela budesonida, sugerindo que a encapsulação de fármacos hidrofóbicos em nanopartículas é uma ótima estratégia. Similarmente, Varga *et al.*, (2019) analisaram a encapsulação de três fármacos com diferentes hidrofobicidades em sistemas de entrega de fármacos baseados em PLA e PLGA, e a EE foi significativamente controlada pela hidrofobicidade dos fármacos e pela modificação da hidrofobicidade do transportador de nanopartículas. Dessa forma, a alta EE apresentada pelo SB83 nas nanoesferas, indica que uma quantidade significativa do fármaco pode ser direcionada ao local-alvo, aumentando assim a eficácia terapêutica (Bhattacharya *et al.*, 2023). Adicionalmente, a baixa solubilidade de fármacos frequentemente resulta em eficácia limitada. Sendo assim, as PNPs encapsuladas com o SB83 surgem como alternativa para encapsulação de fármacos insolúveis em água podem mitigar esse problema, melhorando a eficácia terapêutica do fármaco (Liu *et al.*, 2020).

5.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das PNPs desempenha um papel crucial na eficácia de sistemas de liberação de fármacos. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é amplamente utilizada para caracterizar a morfologia dessas nanopartículas, permitindo a observação detalhada de suas formas, tamanhos e uniformidades. Neste estudo, a MET foi utilizada para caracterizar as BNP (figura 7A) e as NPSB83 (figura 7B). Conforme observado na figura 7, ambas as formulações exibiram uma morfologia esférica, com partículas bem distribuídas, sem sinais de agregação e tamanho próximo de 200 nm, corroborando com os dados obtidos por DLS. Essa característica morfológica é consistente com estudos anteriores de PNPs obtidas por nanoprecipitação (Silva *et al.*, 2024; Bhattacharya *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2020) e por outras metodologia (Fernández *et al.*, 2016; Bhattacharya *et al.*, 2022; Ozdal *et al.*, 2022; Jackman *et al.*, 2024), onde foram evidenciados a forma esférica e a uniformidade das partículas, relatadas como características desejáveis para aplicações em liberação de fármacos e outras técnicas de produção de PNPs, corroborando com as BNP e NPSB83.

Figura 7- Morfologia das nanoesferas obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão: (A) BNP e (B) NPSB83



Fonte: Autor (2024).

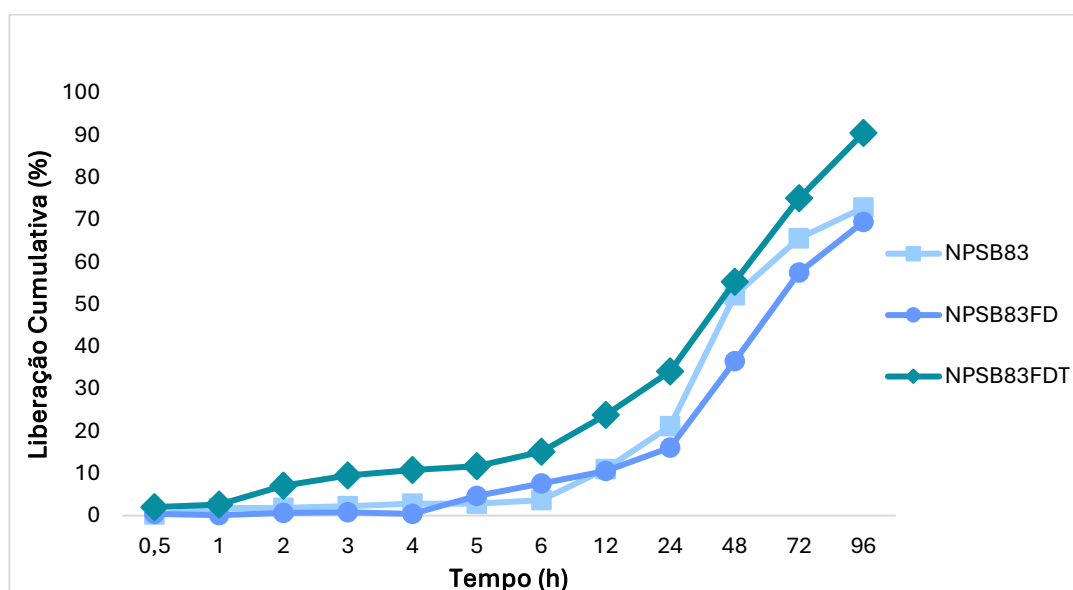
Dessa forma, a presença de partículas não agregadas e bem distribuídas demonstrada neste estudo, indica que a técnica de nanoprecipitação utilizada foi eficaz em produzir nanoesferas com morfologia ideal para a aplicação em sistemas de liberação de fármacos, o que é fundamental para correlacionar essas características com suas propriedades físico-químicas.

5.1.4 Cinética de liberação *in vitro*

A cinética de liberação foi realizada através da metodologia da membrana de diálise. A cinética de liberação de fármacos a partir de nanoesferas é um aspecto fundamental na avaliação da eficácia desses sistemas de entrega. A figura 8 mostra a liberação cumulativa do SB83 a partir das nanoesferas NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD, que apresentaram uma liberação ao longo de 96 horas. Observa-se uma liberação lenta nas primeiras 24 horas, seguida por um aumento significativo da liberação do SB83 a partir desse ponto.

Em contrapartida, diversos estudos, indicaram que as formulações de fármacos encapsulados em nanopartículas investigadas, demonstraram uma fase inicial de liberação rápida, seguida de uma fase de liberação sustentada (Karthick *et al.*, 2024; Bhattacharya *et al.*, 2022; Ozdal *et al.*, 2022; Amekyeh; Billa, 2021). No entanto, esse comportamento de liberação inicial lenta do SB83 das nanoesferas, pode ser atribuído à natureza hidrofóbica do polímero PLA, que inicialmente dificulta a entrada de água nas nanoesferas, retardando a difusão e, portanto, a liberação do SB83. Sendo assim, conforme a matriz polimérica é gradualmente hidratada, a água começa a penetrar no sistema, abrindo poros na estrutura do PLA e permitindo uma difusão mais eficiente do fármaco após aproximadamente 24 horas (Proiakakis; Tarantili; Andreopoulos, 2006).

Figura 8- Cinética de liberação *in vitro* do SB83 das nanoesferas NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD ao longo de 96 horas.



Fonte: Autor (2024).

Além disso, os resultados demonstraram uma liberação evidente do SB83 a partir das nanoesferas, alcançando 72,82% para NPSB83, 69,47% para NPSB83FD e 90,48% para

NPSB83TFD ao longo de 96 horas. Esses achados sugerem que a eficiência de liberação do fármaco aumenta com a adição de trealose (NPSB83TFD), corroborando estudos anteriores. Elbrink *et al.*, (2023) compararam a liberação *in vitro* de celecoxib de nanopartículas lipídicas sólidas antes e depois da otimização do processo da liofilização com trealose, demonstrando um perfil de liberação controlada e sustentada, com a presença de trealose potencializando essa liberação. Isso confere às nanoesferas de SB83 um potencial promissor para aplicações terapêuticas de longo prazo.

Amekeyeh e Billa (2021), avaliaram os efeitos da liofilização com adição de 10% de trealose para a cinética de liberação das nanopartículas lipídicas sólidas que encapsulou a anfotericina B, paracetamol e sulfassalazina. As nanopartículas da anfotericina B recém preparadas e liofilizadas, apresentaram um padrão similar e a liberação foi sustentada, com cerca de 11-12% do fármaco liberado em 8 horas. O paracetamol teve liberação rápida, com a formulação liofilizada liberando 76,04%, comparado a 65,9% da formulação fresca. A sulfassalazina teve liberação intermediária, com 31,6% nas formulações liofilizadas e 31,4% nas frescas. Esses resultados destacam que a presença de trealose não apenas mantém a integridade das nanopartículas durante a liofilização, mas também potencializa ou mantém a liberação controlada do fármaco, similar ao que foi observado com o paracetamol e outras substâncias estudadas. Assim, as NPSB83TFD mostram um desempenho superior em termos de liberação prolongada, alinhando-se com os achados de Elbrink *et al.*, (2023) e Amekeyeh e Billa (2021), e sugerem um potencial significativo para aplicações terapêuticas prolongadas e eficazes.

Os dados foram modelados utilizando diferentes modelos cinéticos, como ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin, para melhor compreensão dos mecanismos de liberação, conforme indicado na tabela 4. Os coeficientes de determinação (R^2) foram calculados para cada modelo, permitindo avaliar o melhor ajuste para descrever a liberação do fármaco das nanoesferas (tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da cinética de liberação *in vitro* do SB83 das NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD

Formulação	Ordem zero R^2	Primeira-ordem R^2	Higuchi R^2	Korsmeyer-Peppas R^2	Peppas-Sahlin R^2
NPSB83	0.9718	0.9834	0.8714	0.9712	0.9782
NPSB83FD	0.9929	0.9778	0.8579	0.9809	0.9936
NPSB83TFD	0.9425	0.9847	0.9610	0.9902	0.9983

Fonte: Autor (2024).

Os resultados indicam que a liberação de fármacos das PNPs segue predominantemente uma cinética de primeira ordem para a formulação NPSB83, onde a taxa de liberação do fármaco é proporcional à quantidade restante nas nanoesferas. Corroborando com estudos anteriores que mostram que a liberação de fármacos de sistemas de nanopartículas pode ser descrita adequadamente pelo modelo de primeira ordem, especialmente quando a liberação é influenciada por processos de difusão (Siepmann; Peppas, 2011). Para a formulação NPSB83FD, que representa a formulação liofilizada, o melhor ajuste foi obtido ao modelo de ordem zero e Peppas-Sahlin, que sugere uma liberação constante do SB83 ao longo do tempo. A combinação de difusão e relaxação da matriz, como sugerido pelo modelo Peppas-Sahlin, indica que a estrutura da matriz polimérica liofilizada mantém a integridade necessária para uma liberação eficiente do fármaco. Por fim, a formulação NPSB83TFD, com o melhor ajuste aos modelos Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin, demonstra que a adição de trealose não só protege as nanoesferas durante a liofilização, mas também interfere na eficiência de liberação do fármaco, proporcionando um perfil de liberação mais controlado e sustentado.

O perfil de liberação da formulação NPSB83TFD mostrou-se mais desenvolvido projetado aos modelos de Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin, resultando em uma exposição de liberação (n) de 0,72. Esse valor sugere que a difusão do fármaco ocorre de forma não Fickiana, caracterizando um transporte anômalo, que envolve tanto a difusão do fármaco quanto a dissolução da matriz polimérica (Korsmeyer *et al.*, 1983). No modelo de Peppas-Sahlin, a liberação do fármaco é controlada por uma combinação de mecanismos de difusão e relaxamento da cadeia polimérica, considerando os efeitos da difusão Fickiana e da relaxação polimérica na liberação do fármaco (Peppas; Sahlin, 1989). Essas descobertas indicam que o mecanismo de liberação do SB83 nas nanoesferas segue um padrão anômalo (Serra; Doménech; Peppas, 2006). Além disso, as evidências apontam que o processo de liofilização pode ter um impacto significativo no mecanismo de liberação do SB83 a partir das nanoesferas estudadas.

5.2 Validação analítica pela CLAE-DAD e UV-vis

A validação da metodologia analítica para quantificação do SB83 foi realizada através da CLAE acoplada a detector de DAD e Uv-vis, e foram avaliados quanto as diretrizes do ICH Q2 (R1) e ANVISA RDC nº 166/2017.

5.2.1 Desenvolvimento e otimização do método

No estudo de otimização do método de quantificação por Box-Behnken foram realizados 17 experimentos, incluindo uma quintuplicada do ponto central. Os efeitos das variáveis independentes nas variáveis resposta estão apresentados a tabela 5.

Diferentes testes estatísticos foram conduzidos para encontrar os melhores valores das variáveis independentes. O modelo que melhor se adequou em todas as variáveis resposta foi o modelo quadrático. A análise estatística revelou que o modelo quadrático apresentou valores elevados de R^2 , R^2 predito e R^2 ajustado (tabela 6). De acordo com a tabela 6 é possível notar que a falta de ajuste foi significativa para o tempo de retenção e fator caudal. A falta de ajuste pode ser significativa devido a presença de ruídos. Mas no presente trabalho a significância na falta de ajuste nestas duas variáveis pode ser explicada devido à alta precisão na leitura dos pontos centrais e a variação maior nos outros pontos. Isto se explica devido à realização de todos os pontos centrais em um mesmo dia para reduzir os gastos e contaminação com solvente. Este fato então não inviabiliza o modelo que pode ser utilizado para a escolha dos parâmetros otimizados (Taheri, 2022).

Tabela 5 – Design experimental Box-Behnken com as variáveis independentes. A: Metanol, B: Volume de injeção, C: Fluxo) e as variáveis resposta (Tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos

Corrida	A: Metanol (%)	B: Volume de injeção (µL)	C: Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (RT)	Fator de cauda (TF)	Pratos teóricos (N)
1	80	10	1,2	10,62	1,058	9369
2	100	10	1,2	3,13	1,206	5379
3	80	20	1,2	10,48	1,057	8277
4	100	20	1,2	3,14	1,203	5114
5	80	15	0,8	15,30	1,069	1061
6	100	15	0,8	4,67	1,290	6640
7	80	15	1,6	7,95	1,053	7345
8	100	15	1,6	2,36	1,195	4358
9	90	10	0,8	7,17	1,150	8154
10	90	20	0,8	7,16	1,140	6904
11	90	10	1,6	3,65	1,107	5327
12	90	20	1,6	3,67	1,097	4978
13	90	15	1,2	4,67	1,124	5750
14	90	15	1,2	4,82	1,124	6082
15	90	15	1,2	4,82	1,123	6068
16	90	15	1,2	4,82	1,123	6046
17	90	15	1,2	4,82	1,121	6062

Fonte: Autor (2024).

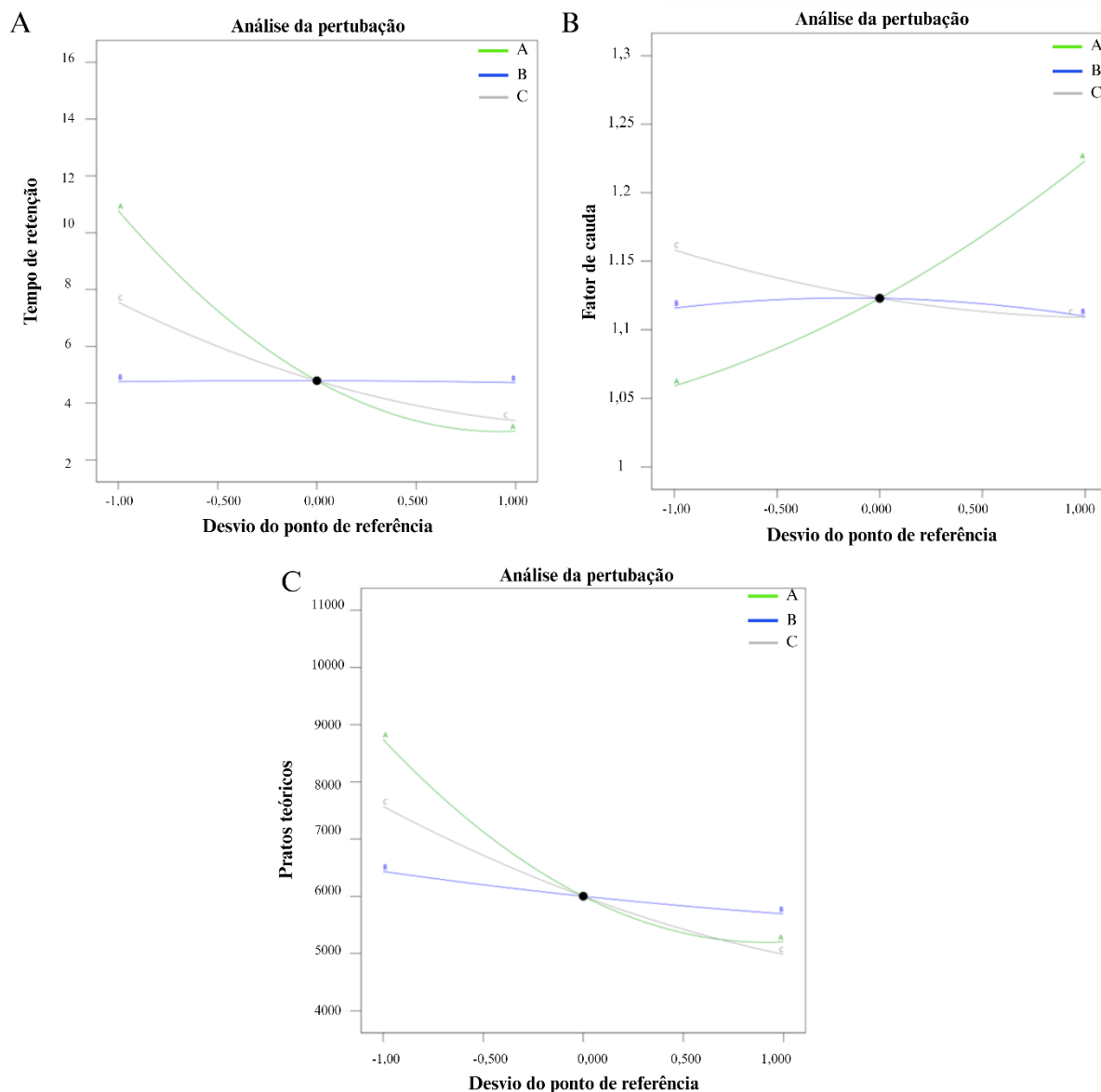
Tabela 6 - Análise estatística da superfície de resposta do modelo quadrático para as variáveis: tempo de retenção, fator de cauda e números de prato teóricos.

Variável		
Tempo de retenção (RT)	R^2	0,9938
	R^2 ajustado	0,9859
	R^2 predito	0,9027
	p	<0,0001
	Falta de ajuste	0,0005
Fator de cauda (TF)	R^2	0,9888
	R^2 ajustado	0,9744
	R^2 predito	0,8219
	p	0,01
	Falta de ajuste	0,0001
Pratos teóricos (N)	R^2	0,9960
	R^2 ajustado	0,9910
	R^2 predito	0,9624
	p	<0,0001
	Falta de ajuste	0,32

Fonte: Autor (2024).

A figura 9 mostra a influência dos fatores independentes nas variáveis de resposta do método de CLAE para quantificação do SB83, demonstrando o R_t (Figura 9A), o fator de cauda (TF) (Figura 9B) e o número de pratos teóricos (N) (Figura 9C). Observa-se que o volume de injeção exerceu pouca influência no RT, que foram predominantemente afetado pela proporção de MeOH, seguido da taxa fluxo. Onde o aumento destas variáveis induziu uma redução no R_t . Já o TF sofreu um aumento com o aumento da proporção de MeOH e uma redução com o aumento do fluxo. Por fim, o número de pratos teóricos foi reduzido com o aumento de todas as variáveis independentes, sendo a proporção de MeOH o principal fator na perturbação de todas as variáveis dependentes.

Figura 9- Influência dos fatores A: proporção de metanol, B: volume de injeção, C: fluxo, nas variáveis dependentes: tempo de retenção, fator caudal e número de pratos teóricos.



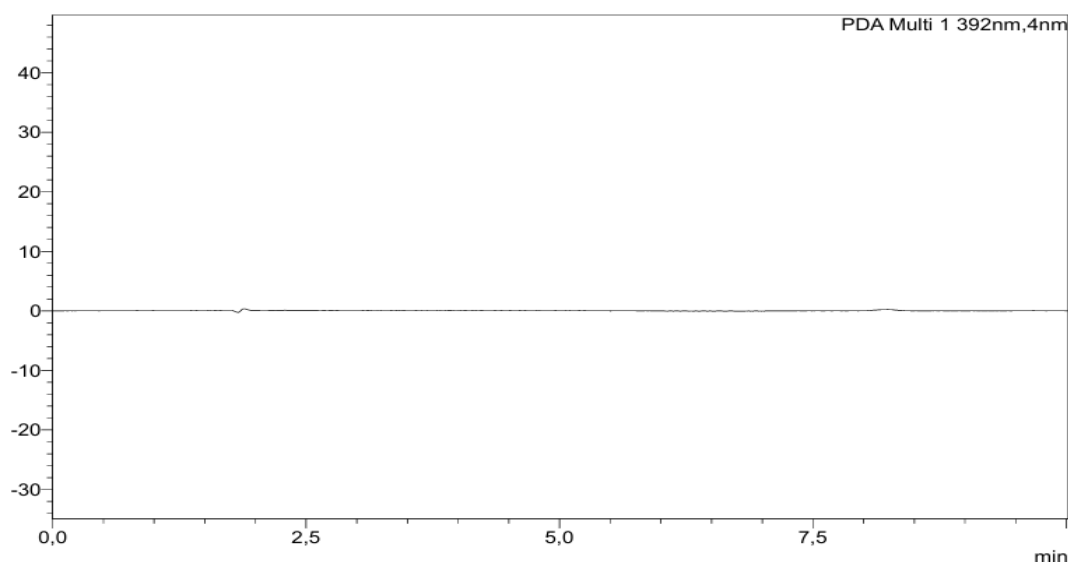
Fonte: Autor (2024).

Os parâmetros para otimização do método de quantificação do SB83 por CLAE foram selecionados através da ferramenta de otimização numérica do software Design Expert, selecionando o menor tempo de retenção, o menor fator de cauda e o maior número de pratos teóricos. Os valores selecionados foram 80% de MeOH, 10 μ L de volume de injeção e taxa de fluxo de 1,5 mL por minuto com um tempo de retenção de 8,639 minutos, análise total de 10 minutos, fator de cauda de 1,054 e 8204,384 pratos teóricos.

5.2.2 Seletividade

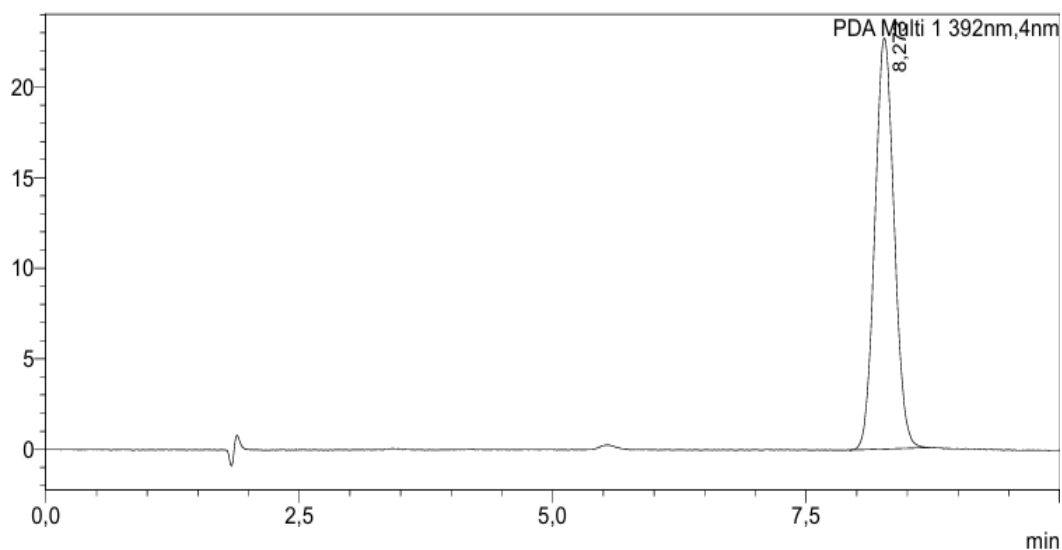
O sobrenadante das BNP diluído em MeOH foi submetido a avaliação da interferência de outros componentes da matriz. Conforme esperado, não foi observado nenhum pico significativo no comprimento de onda (λ) de 392 nm (figura 10), o que indica a ausência de interferência das PNPs na detecção do analito. Este resultado é consistente com as exigências das diretrizes regulatórias, que enfatizam a importância de assegurar que a matriz do excipiente ou nanopartícula não interfira na resposta do detector para o analito de interesse.

Figura 10 - Avaliação de interferêntes utilizando o sobrenadante das BNP em MeOH.



Fonte: Autor (2024).

Figura 11 - Avaliação de interferentes no cromatograma utilizando o sobrenadante das BNP com adição de 10 $\mu\text{g/ml}$ de solução padrão de SB83 e MeOH



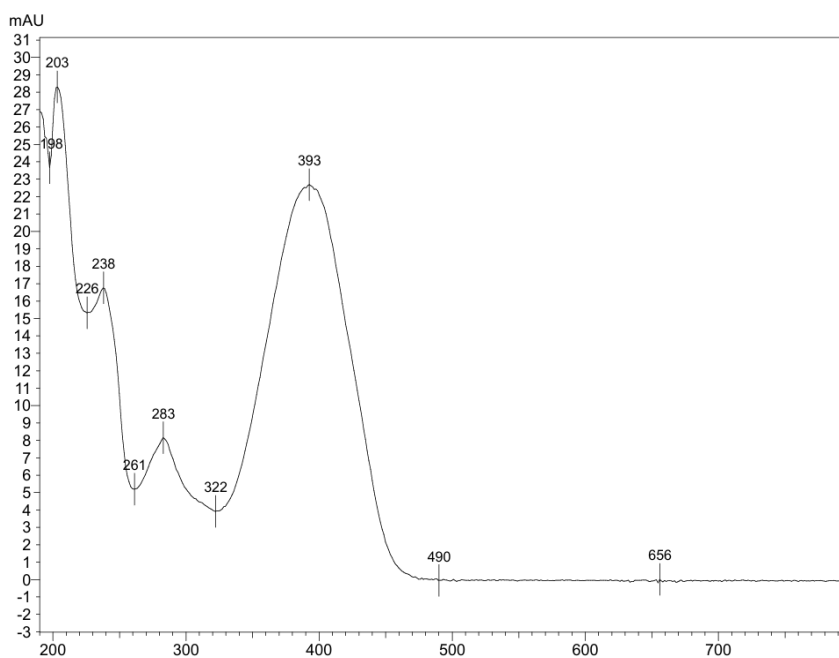
Fonte: Autor (2024).

Adicionalmente, foi acrescentado uma solução de SB83 (10 µg/mL) ao sobrenadante das BNP e diluída com metanol, e posteriormente realizada outra leitura. Diante disso, a análise resultante demonstrou um cromatograma claramente com tempo de retenção (Rt) definido em 8,2 minutos, com 6175 pratos teóricos e 1,054 de fator de cauda (figura 11), correspondente ao tempo de retenção previamente estabelecido para o SB83.

A presença de um pico bem-resolvido e consistente com o Rt do SB83, mesmo na presença da matriz nanoparticulada, confirma a seletividade do método. De acordo com as diretrizes do ICH e da ANVISA, esse tipo de teste é fundamental para garantir que o método seja adequado para a quantificação precisa do analito em presença de potenciais interferentes, como excipientes e adjuvantes.

Assim, os resultados obtidos, demonstram que o método desenvolvido através do cromatógrafo é seletivo, sendo capaz de detectar e quantificar o SB83 na presença dos excipientes da nanoesfera sem que haja interferência significativa. Dessa forma, a seletividade é crucial para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos nas formulações de nanopartículas, atendendo plenamente aos requisitos estabelecidos pelas diretrizes regulamentadoras.

Figura 12 - Espectro UV-vis do SB83



Fonte: Autor (2024).

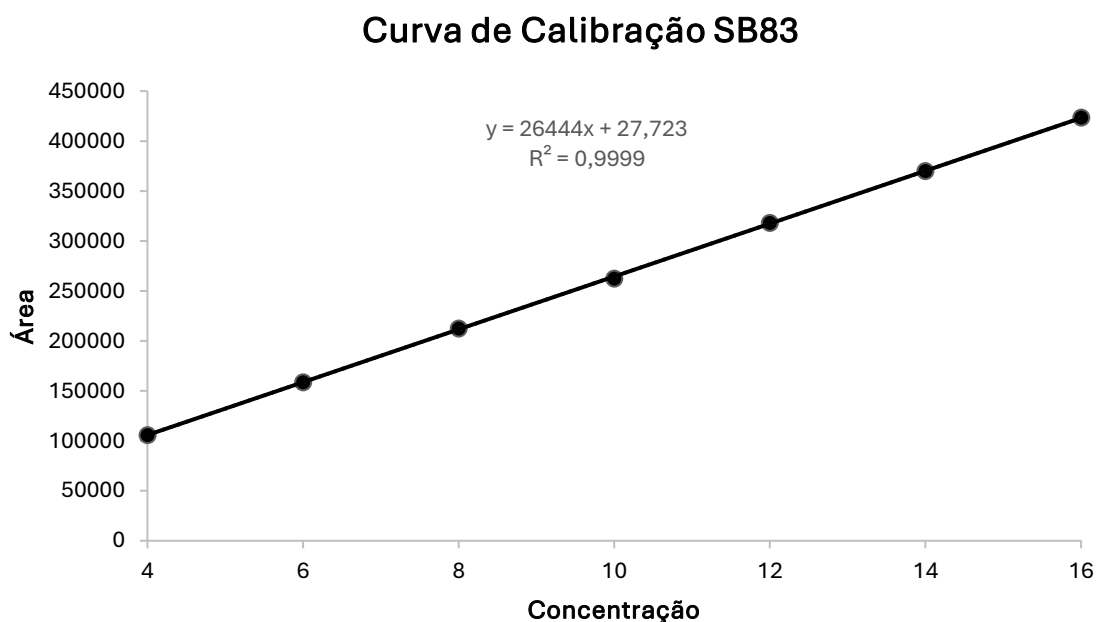
Na figura 12 é representado o espectro UV-vis do SB83. Os picos de absorção do SB83 em torno de 203 nm, 238 nm, 283 nm e 393 nm no espectro UV-Vis podem ser atribuídos a essas transições eletrônicas, particularmente envolvendo o anel indólico e a conjugação

estendida com o grupo nitrila do fármaco. A absorção máxima no espectro UV em 392 nm é consistente com a presença de uma cadeia conjugada extensa que inclui o anel aromático e o grupo nitrila, que são conhecidos por deslocar a absorção para comprimentos de onda mais longos devido à estabilização do sistema conjugado.

5.2.3 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada para a quantificação do SB83 em metanol utilizando o cromatógrafo líquido. Seguindo as diretrizes do ICH Q2(R1) e da ANVISA RDC nº 166/2017, a curva de calibração foi construída utilizando sete níveis de concentração variando de 4 µg/mL a 16 µg/mL. A relação entre a concentração do SB83 e a área do cromatograma foi analisada por regressão linear, conforme mostrado na figura 13. Além disso, o DPR% foi calculado. A linearidade é avaliada pela construção de uma curva de calibração utilizando padrões de concentração conhecida do fármaco. Os dados são analisados para determinar a relação linear entre a concentração do analito e a resposta do detector. A equação da linha de regressão foi determinada como, $y = 26444x + 27,723$.

Figura 13 – Gráfico de linearidade do SB83



Fonte: Autor (2024).

Os resultados da regressão linear indicam uma correlação extremamente forte entre a concentração (variável independente) e a área (variável dependente), com um R múltiplo de

0,9999. O R^2 de 0,9999 sugere que 99,99% da variação nas áreas observadas é explicada pela concentração, sugerindo uma forte linearidade entre a concentração e a resposta. O R^2 ajustado de 0,9999 reflete a alta proporção da variação explicada mesmo considerando a complexidade do modelo. O erro padrão de 1068,3267 indica que os pontos de dados estão muito próximos da linha de regressão (tabela 7). A curva com 7 pontos de concentração, estabelece uma relação confiável entre a concentração e a resposta analítica. A ANVISA e o ICH recomendam que o coeficiente de correlação (R) seja próximo de 1, geralmente acima de 0,99, indicando uma linearidade do método (ANVISA, 2017; ICH, 2023). O erro padrão da estimativa representa a média dos desvios das observações em relação à linha de regressão, um erro padrão relativamente baixo, em comparação com as magnitudes das áreas observadas, indica que os pontos de dados estão muito próximos da linha de regressão.

Tabela 7 - Coeficientes do modelo de Regressão linear

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99996357
R^2	0,999927141
R^2 ajustado	0,999912569
Erro padrão	1068,32658
Observações	7

Fonte: Autor (2024).

A tabela 8 apresenta a análise DPR% das áreas dos cromatogramas e suas respectivas concentrações medida em $\mu\text{g/mL}$. Os DPR% de todas as concentrações estão inferiores a 2%, como preconiza as diretrizes reguladores, indicando precisão das diluições.

Tabela 8- Avaliação das concentrações e dos DPR% da curva de calibração encontrados a partir da área do cromatograma do método de quantificação do SB83

Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Média da área	Desvio padrão	DPR%	Concentração real ($\mu\text{g/mL}$)
4	105970	528,4840	0,4987	4,0062
6	158757,5	1560,0368	0,9826	6,0024
8	212456,5	1556,2976	0,7325	8,0331
10	262453	1358,2667	0,5175	9,9238
12	318092,75	1669,6942	0,5249	12,0278
14	369935,5	4842,4623	1,3090	13,9883
16	423588,5	1684,8419	0,3977	16,0172

Fonte: Autor (2024).

Os coeficientes do modelo de regressão linear foram analisados e apresentaram os seguintes valores: intercepto de 27,72 (não significativo, $p = 0,9806$) e inclinação de 26443.71

(muito significativo, $p < 0.001$) (tabela 9). Em contraste, a inclinação é altamente significativa com um valor de ($p = 1.54^{-11}$), e confirma a existência de uma relação linear entre a concentração do SB83 e a resposta (área do cromatograma), conforme esperado. A inclinação positiva confirma que a concentração explica a variação observada nos dados, validando a adequação do modelo de regressão linear para descrever essa relação.

Tabela 9- Análise Estatística dos Coeficientes do Modelo de Regressão Linear – IC 95%

Parâmetros	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	27,7232	1087,2364	0,0254	0,9806	-2767,1071	2822,553569
Variável x	26443,70	100,94737	261,9554	$1,54^{-11}$	26184,2163	26703,20331

Fonte: Autor (2024).

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a significância estatística da curva de calibração. Os resultados estão apresentados na tabela 10. De acordo com a ANOVA, a curva de calibração é estatisticamente significativa, com uma estatística F de 68620,6331, com um valor de $p = 1,539^{-11}$, indicando que o modelo é altamente significativo, reforçando a linearidade do método e confirmando a eficácia do método analítico para quantificação do SB83 por CLAE.

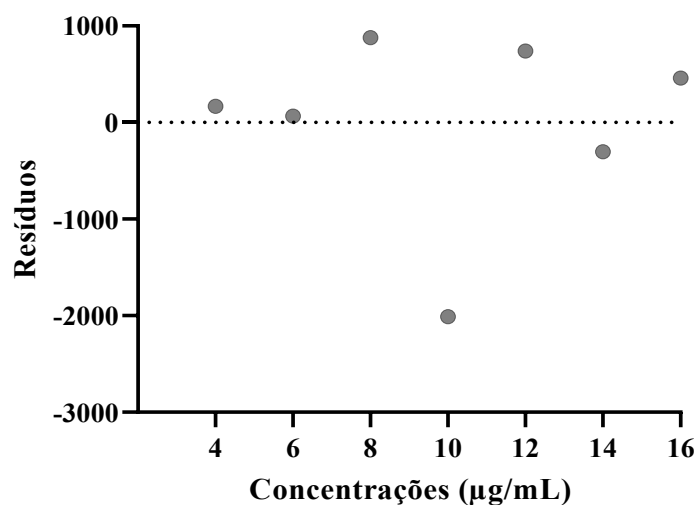
Tabela 10 -Teste F-ANOVA para significância da curva de calibração do SB83

ANOVA	(Teste F - ANOVA) - Significância da curva de calibração				
	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	78318216381	78318216381	68620,6331	$1,53851^{-11}$
Resíduo	5	5706608,408	1141321,682		
Total	6	78323922990			

Fonte: Autor (2024).

Através da figura 14 e tabela 11, é possível observar que os resíduos variam de -2011,82 à 879,10, uma faixa relativamente pequena comparada às respostas. O gráfico dos resíduos em relação às concentrações (figura 14) mostrou que os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno de zero, sem padrão evidente, o que é um bom indicativo de que os pressupostos do modelo linear foram atendidos, sugerindo homocedasticidade (variância constante dos resíduos).

Figura 14- Análise da distribuição normal dos resíduos do modelo de regressão linear para a concentração e resposta do método analítico.



Fonte: Autor (2024).

Tabela 11- Análise dos Resíduos e Resíduos Padronizados para as Observações do Modelo

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	105802,5625	167,4375	0,171687754
2	158689,9821	67,51785714	0,069231739
3	211577,4018	879,0982143	0,901413353
4	264464,8214	2011,821429	-2,062889754
5	317352,2411	740,5089286	0,759306099
6	370239,6607	304,1607143	-0,311881568
7	423127,0804	461,4196429	0,473132377

Fonte: Autor (2024).

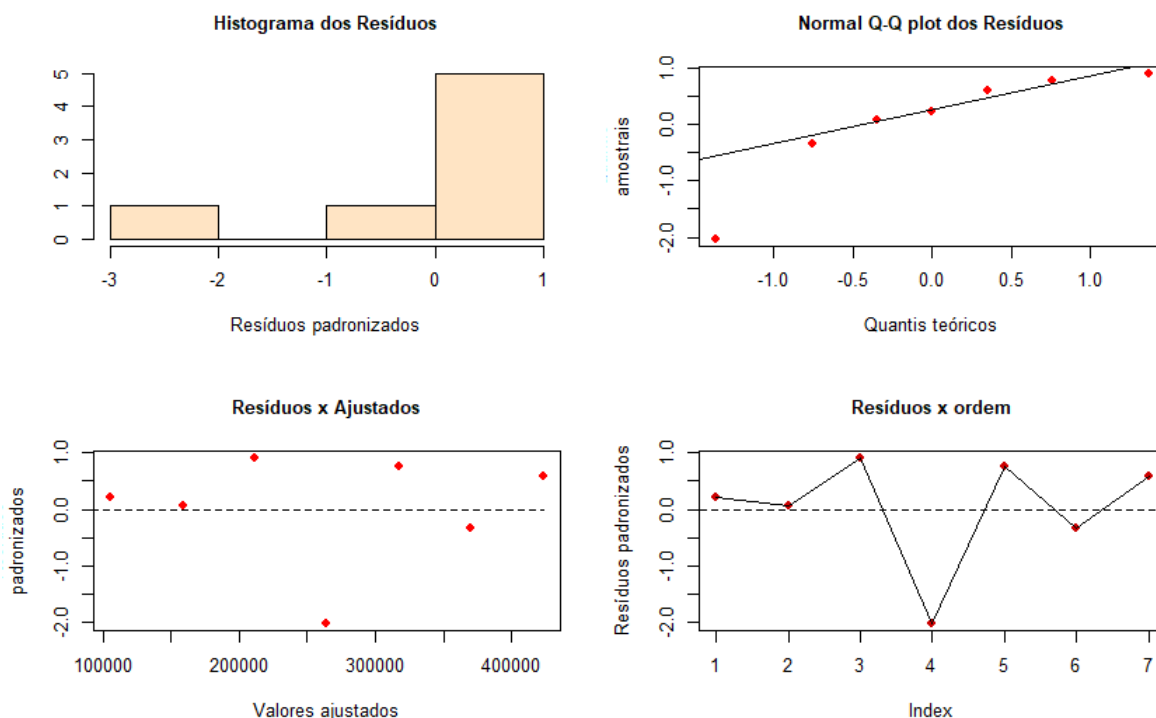
Para análise da distribuição normal dos resíduos, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, que apresentou um valor de $p = 0,076$. Como o valor de p é maior que 0.05 ($p > 0,05$), não rejeita a hipótese nula, indicando que os resíduos são normalmente distribuídos. Assim, os resíduos seguem uma distribuição normal, o que é um pressuposto importante para a regressão linear conforme as diretrizes da ICH e ANVISA. Kovács *et al.*, (2020) também observaram a importância da normalidade dos resíduos na validação de métodos por CLAE, ressaltando que a distribuição normal dos resíduos garante a validade das inferências estatísticas e a precisão dos resultados.

O histograma dos resíduos (figura 15) apresenta a distribuição dos resíduos padronizados. Observa-se que a distribuição dos resíduos é assimétrica, com uma concentração maior de resíduos em torno de 1 e alguns resíduos dispersos negativamente. A normalidade dos resíduos é uma suposição importante na regressão linear, pois garante que as inferências estatísticas sejam válidas (Montgomery; Peck; Vining, 2012). Apesar da assimetria observada

no histograma, o teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,07$) sugere que a normalidade dos resíduos é razoavelmente atendida, indicando que não há evidências suficientes para rejeitar a hipótese de normalidade.

O gráfico Quantil-Quantil dos resíduos (figura 15) compara os quantis dos resíduos padronizados com os quantis teóricos de uma distribuição normal. Observa-se que os pontos seguem a linha diagonal em grande parte, indicando que os resíduos são aproximadamente normais. No entanto, alguns desvios nos extremos podem indicar a presença de outliers ou uma leve violação da normalidade, possivelmente no ponto 10 $\mu\text{g/mL}$ da curva. Essa observação é consistente com o histograma dos resíduos, reforçando que, embora a normalidade não seja perfeita, a suposição é razoavelmente atendida. Adicionalmente, o gráfico de resíduos versus valores ajustados (figura 15) plota os resíduos padronizados contra os valores ajustados pelo modelo. Assim, os resíduos estão distribuídos aleatoriamente em torno da linha horizontal em zero, sem padrões claros, sugerindo que a suposição de homocedasticidade (variância constante dos resíduos) é atendida.

Figura 15 - Avaliação da distribuição normal dos resíduos no modelo de regressão linear



Fonte: Autor (2024).

Além disso, a ausência de um padrão sistemático indica que o modelo linear está capturando bem a relação entre as variáveis. Adicionalmente, para confirmar esses dados, foi realizado o teste de Breusch-Pagan ($bp = 0,1054$, $p = 0,7454$) que indicou que não há evidência significativa de heterocedasticidade nos resíduos do modelo de regressão. Dessa forma, o valor de p sugere que a variabilidade dos resíduos não varia sistematicamente com a concentração do fármaco, confirmando a adequação do modelo de regressão linear sob a suposição de homocedasticidade, reforçando a adequação dessa suposição. Por fim, o gráfico de resíduos versus ordem dos dados (figura 15) plota os resíduos padronizados na ordem em que os dados foram coletados, assim, não se observa um padrão claro ao longo do tempo, o que sugere que não há autocorrelação significativa nos resíduos (Montgomery; Peck; Vining, 2012).

Dessa forma, os resultados obtidos indicam que o método analítico apresenta linearidade ($R^2 = 0,9999$) dentro da faixa de concentrações 4 à 16 $\mu\text{g/mL}$, que está conforme alguns estudos recentes, que também demonstram que a linearidade de métodos desenvolvidos por CLAE pode ser mantidos com precisão e exatidão, mesmo em concentrações baixas. Dessa forma, a análise dos gráficos de resíduos indica que o modelo de regressão linear simples é adequado para os dados fornecidos e as suposições de normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos são razoavelmente atendidas, embora haja uma leve indicação de assimetria na distribuição dos resíduos. No geral, o modelo sugere uma representação da relação entre a variável preditora e a variável resposta.

Diante do exposto, alguns estudos semelhantes corroboram esses achados. A análise de regressão realizada em um estudo recente de validação de um método para quantificar tartrato de hidrogênio de rivastigmina, mostrou um valor F de 211506,31 e um valor de significância F de $7,13348 \times 10^{-15}$, indicando uma forte relação linear entre a concentração e o sinal, indicando um alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9999$) para suas curvas de calibração, similar aos resultados obtidos para o SB83, o que destaca a repetibilidade e confiabilidade do método (Salwa; Kumar, 2023). De modo semelhante, Kovács *et al.*, (2020), desenvolveu um método analítico para quantificação da fampridina e forneceu uma visão detalhada do modelo de regressão, com R^2 muito alto (0,9996) e o valor F significativo (22.132,69) com $p < 0,05$, que similarmente ao encontrado no método do SB83, indicam que há uma forte relação linear entre a concentração do analito e a resposta do detector, reforçando a validade do método analítico.

Além disso, os coeficientes de regressão linear, com um intercepto não significativo ($p = 0,981$) e uma inclinação altamente significativa ($p < 0,001$), confirmam a existência de uma relação linear robusta entre a concentração e a resposta e a F -estatística alta e significativa do SB83 reforça a adequação do modelo de regressão linear, alinhando-se com os achados de Saha

e Pandey (2021), que validaram um método para quantificação de efavirenz por CLAE de fase reversa com forte correlação linear e alta significância estatística, demonstrando a eficácia do método desenvolvido. Outros estudos também estão consistentes com esses dados, e indicaram um alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9999$) para suas curvas de calibração no desenvolvimento do método analítico para quantificação de fármacos (Permana *et al.*, 2023; Sathisbabu *et al.*, 2022; Kovács *et al.*, 2020; Saha; Pandey, 2020).

5.2.4 Limite de detecção e quantificação

Neste estudo, LOD e LOQ foram calculados utilizando o desvio padrão do intercepto e a inclinação da equação da reta, aplicando-se as fórmulas $3,3\sigma/s$ e $10\sigma/s$ respectivamente, onde σ representa o desvio padrão da resposta e s a inclinação. Os valores de LOD e LOQ foram de 0,121 $\mu\text{g/mL}$ e 0,368 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, calculados de acordo com a equação 3 e 4. Estes resultados são consistentes com estudos recentes na literatura que validaram métodos analíticos por CLAE, indicando que o método desenvolvido é adequado para detectar e quantificar com precisão concentrações muito baixas do analito (Kovács *et al.*, 2020; Elagamy *et al.*, 2022).

5.2.5 Precisão

A análise de precisão foi conduzida para avaliar a reprodutibilidade do método analítico, conforme as diretrizes do ICH e ANVISA. Para a repetibilidade, a precisão foi avaliada em condições de repetição para os três níveis de concentração (8, 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$). Foram preparadas diluições a partir de três soluções mães independentes, e cada diluição foi analisada em triplicata, onde o mesmo operador utilizou o mesmo equipamento. Os resultados obtidos para repetibilidade e precisão intermediária estão apresentados nas tabelas 12 e 13. Conforme exposto na tabela, todos os DPR (%) foram inferiores a 2%, conferindo repetibilidade ao método.

Tabela 12 – Avaliação da repetibilidade (intra-dia) do analista 1.

Repetibilidade			
Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	Média das áreas	DPR (%)	Concentração encontrada ($\mu\text{g/mL}$)
8	209488,3333	0,7061	7,920912507
10	260892,3333	0,4000	9,864793917
12	317364	0,3100	12,000313

Fonte: Autor (2024).

Na análise de precisão intermediária, dois analistas distintos realizaram a avaliação em dois dias diferentes, sob as mesmas condições. Para cada um dos três níveis de concentração (8, 10 e 12 µg/mL), foram preparadas diluições a partir de três soluções mães independentes, e cada diluição foi analisada em triplicata. Os DPR% foram calculados.

Tabela 13 - Comparação da precisão intermediária inter-dia das concentrações testadas entre os analistas 1 e 2 em dois dias diferentes, utilizando o DPR% e o Teste t para médias.

Concentrações (µg/mL)	Analista	Média das áreas	DPR (%)	Concentração real (µg/mL)	Shapiro-Wilk (valor-p)	Teste t (valor-p)
8	1	222433,33	0,7740	8,41043	$p = 0,5731$	$p = 0,0884$
8	2	217353	0,5075	8,2183	$p = 0,9670$	
10	1	275898	1,9056	10,4322	$p = 0,7060$	$p = 0,4046$
10	2	279082,33	0,6865	10,5526	$p = 0,0503$	
12	1	334729,33	1,8978	12,6569	$p = 0,6834$	$p = 0,3189$
12	2	340217,66	0,4566	12,8645	$p = 0,7301$	

Fonte: Autor (2024).

A tabela 13 resume os resultados da análise de precisão intermediária para os dois analistas diferentes, avaliando a reprodutibilidade. Os DPR% estão inferiores a 2%, e estão dentro dos parâmetros aceitáveis pelos órgãos reguladores (ICH e ANVISA), indicando que o método é preciso.

Para avaliar as diferenças estatísticas entre os analistas, primeiramente foi aplicado o teste de normalidade do Shapiro-Wilk, $p < 0,05$, seguido do teste t de comparação de médias entre os analistas. Os testes de normalidade Shapiro-Wilk realizados para cada concentração e analistas confirmaram que os dados seguem uma distribuição normal, com valores de p maiores que 0,05. O teste T entre as médias, revelou que as concentração de 8, 10 e 12 µg/mL, foram estatisticamente equivalentes para ambos os analistas, ou seja, a diferença não foram estatisticamente significativa entre as médias das áreas dos dois analistas (tabela 13) indicando consistência entre os analistas e reforçando a reprodutibilidade do método, no qual os valores de DPR% foram menor que 2%, confirmando a precisão do método analítico.

Sendo assim, corroborando com os DPR%, os resultados da repetibilidade e precisão intermediária mostram que o método analítico possui precisão e reprodutibilidade e está em conformidade com as diretrizes do ICH e ANVISA, e com outros estudos (Kovács *et al.*, 2020; Martins; Khalil; Mainardes, 2017; Pardhi; Pant; Flora, 2020; Saha; Pandey, 2020).

5.2.6 Exatidão

Os resultados da exatidão para as concentrações de 8, 10 e 12 µg/mL indicam que o método analítico avaliado está dentro das faixas aceitáveis recomendadas pelas diretrizes da ICH e ANVISA. A exatidão variou entre 101,7485% e 103,7544%, com baixo DPR%, confirmando tanto a precisão quanto a exatidão do método analítico (tabela 14).

Tabela 14 - Exatidão das concentrações de 8, 10 e 12 µg/mL através do DPR% e da taxa de recuperação (%)

Concentrações (µg/mL)	Média	DPR (%)	Concentração real (µg/mL)	Taxa de recuperação (%)
8	219522,3	0,2655	8,3003	103,7544
10	269091,7	0,9894	10,1748	101,7485
12	324403,3	1,1462	12,2665	102,2209

Fonte: Autor (2024).

Os DPR% obtidos para as diferentes concentrações da curva de calibração do SB83 mostraram valores inferiores a 2%, conforme exigido pelos órgãos reguladores, indicando precisão. Estudos corroboram esses achados, onde métodos validados por CLAE apresentaram DPR% inferiores a 2%, indicando precisão e confiabilidade dos métodos analíticos (Kovács *et al.*, 2020; Pardhi; Geetanjali; Sjs, 2020).

5.2.7 Robustez

A robustez de um método analítico refere-se à sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações nos parâmetros do método. De acordo com as diretrizes da ANVISA e do ICH, um método robusto deve demonstrar consistência em suas medições e resultados apesar dessas pequenas variações. A tabela 15, refere-se a robustez analisada através da concentração 10 µg/mL, variando o fluxo da fase móvel, temperatura da coluna, e proporção de metanol e fornece uma análise detalhada de diversos parâmetros, como Rt, área do pico, taxa de recuperação, concentração real, N e TF, todos essenciais para avaliar a robustez do método.

Tabela 15 - Avaliação da robustez utilizando o ponto central da solução padrão do SB83 (10 µg/mL) através da variação do fluxo, temperatura da coluna e proporção da fase móvel.

Parâmetros variados	Rt (min)	Área do pico	Taxa de recuperação (%)	Concentração real (µg/mL)	Pratos teóricos (N)	Fator de cauda (TF)
1,6	7,731	275860	104,3080763	10,43080763	7881	1,06
1,5	8,283	294486	111,3516401	11,13516401	8386	1,058
1,4	8,832	314143	118,7850843	11,87850843	8703	1,063
38°C	8,628	292926	110,7617142	11,07617142	8177	1,058
40°C	8,668	293229	110,8762959	11,08762959	8251	1,061
42°C	7,970	293605	111,0184832	11,10184832	8357	1,058
82:18	6,890	291999	110,4111621	11,04111621	7649	1,067
80:20	8,267	292237	110,5011636	11,05011636	8180	1,057
78:22	10,017	292346	110,5423828	11,05423828	8784	1,056

Fonte: Autor (2024).

Os resultados indicaram variações (> 2%) em vários parâmetros críticos. Assim, modificações no método devem ser cuidadosamente manejadas, pois pequenas alterações modificaram a taxa de recuperação do SB83. O Rt variou de 7,731 a 10,017 minutos, uma amplitude considerável que pode impactar a identificação e quantificação dos analitos. A taxa de recuperação variou de 104,31% a 118,79%, com alguns valores acima da faixa aceitável de 98-102%, sugerindo que o método pode não ser suficientemente robusto (ANVISA, 2017, ICH, 2023).

Por outro lado, a eficiência da coluna durante a robustez, medida pelos pratos teóricos, apresentou valores entre 7649 e 8784, indicando uma eficiência de separação, embora com algumas variações. O fator de cauda variou levemente entre 1,057 e 1,067, valores próximos de 1, o que sugere simetria adequada dos picos.

Segundo as diretrizes da ICH Q2(R1) e da ANVISA, um método analítico robusto deve apresentar variações mínimas ($\pm 2\%$) em parâmetros críticos como o tempo de retenção e a taxa de recuperação. A ICH especifica que o tempo de retenção deve variar no máximo $\pm 2\%$, enquanto a ANVISA aceita variações na taxa de recuperação dentro da faixa de 98-102%.

Estudos como o de Pardhi; Pant; Flora (2020), também variaram os mesmos parâmetros de temperatura, fluxo e proporção da fase móvel, e demonstram variações significativas no tempo de retenção, exceto na mudança de $\pm 1^\circ\text{C}$ da temperatura, que assim como a robustez do SB83, mostrou uma tolerabilidade considerável no tempo de retenção, quando variou a temperatura. A falta de robustez no tempo de retenção observada nos resultados pode ser atribuída a fatores como variações na composição da fase móvel e no fluxo, similares às conclusões destes estudos. Kitamura *et al.*, (2021) e Trinanes *et al.*, (2020) destacam a

importância da predição do tempo de retenção e da utilização de funções de desejabilidade bilaterais para manter a estabilidade dos picos cromatográficos. Comparando esses achados com os resultados obtidos na tabela 15, observa-se que as variações significativas no R_t e na taxa de recuperação indicam que o método estudado não atende plenamente aos critérios de robustez estabelecidos pelas diretrizes regulamentares.

Sendo assim, a avaliação da robustez do método analítico revelou variações significativas em parâmetros críticos ($< 2\%$), particularmente no tempo de retenção e na taxa de recuperação. Esses resultados sugerem que o método não é robusto para as variáveis (fluxo, temperatura da coluna e proporção de fase móvel). Sendo assim, é necessário a otimização e testes adicionais ao método para garantir que ele permaneça confiável e consistente sob pequenas variações nas condições operacionais, de forma a ajustar os parâmetros de variação, para assim, a conformidade com as diretrizes da ICH e da ANVISA, ser assegurada, garantindo a precisão e a validade dos resultados analíticos em aplicações farmacêuticas.

5.3 Ensaios *in vitro*

Nesta sessão, foram destacados os ensaios *in vitro* que foram realizados a fim de avaliar a citotoxicidade em células de macrófagos RAW 264.7 frente a formulações das nanoesferas em comparação com o fármaco livre e o medicamento de referência, bem como a atividade anti-leishmania frente as formas promastigotas e amastigota de *Leishmania amazonensis*.

5.3.1 Citotoxicidade em macrófagos

Os resultados apresentados na tabela 16 indicam a citotoxicidade de diferentes formulações avaliados em macrófagos RAW 264.7, medida como a concentração que causa 50% de inibição celular (CC_{50}). O controle positivo utilizado foi a miltefosina, um fármaco bem estabelecido no tratamento da leishmaniose e as BNP foram utilizadas como controle negativo. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão realizados em três réplicas independentes. A significância estatística foi determinada através do teste ANOVA bidirecional seguida pelo teste de Tukey em comparação com Miltefosina.

Tabela 16 – Determinação da citotoxicidade (CC_{50}) em macrófagos RAW 264.7 das BNP, NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD, em comparação com o fármaco livre (SB83), e o fármaco referência miltefosina.

Macrófagos RAW 264.7	
Formulação	CC_{50} (μ M)
BNP	SA
NPSB83	$182,25 \pm 8,27^{****}$
NPSB83FD	$194,63 \pm 9,42^{****}$
NPSB83TFD	$190,88 \pm 6,50^{****}$
SB83	$105,51 \pm 6,11^{****}$
Miltefosina	$119,74 \pm 8,53$

Fonte: Autor (2024).

De acordo com os resultados, o controle negativo, representado pelas BNP não apresentaram atividade citotóxica (SA) significativa, indicando que não interferiu na viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7. Os resultados de comparação indicado pelo teste de Tukey revelam que todas as formulações de nanoesferas (NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD) e o SB83 livre apresentam valores de CC_{50} significativamente maiores em comparação com a miltefosina ($p < 0,0001$), indicando uma menor citotoxicidade nos macrófagos RAW 264.7. A comparação entre as diferentes formulações de nanoesferas encapsuladas com o SB83 mostra que não há diferença significativa entre NPSB83FD e NPSB83TFD, mas ambas são significativamente menos citotóxicas que SB83 e miltefosina ($p < 0,0001$). No entanto, o SB83 demonstrou que possui valor ligeiramente superior, porém ainda significativamente mais baixo do que miltefosina ($p < 0,0001$). Esses dados indicam que o encapsulamento de SB83 nas PNP pode ser fundamental para manter a função celular dos macrófagos durante o tratamento. Dessa forma, os resultados sugerem que a utilização de nanopartículas poliméricas encapsuladas com o fármaco pode ser uma estratégia promissora para otimizar a administração de medicamentos e aumentar a segurança terapêutica do SB83.

Esses resultados corroboram com estudos anteriores que indicam que formulações baseadas em nanopartículas podem reduzir a citotoxicidade e melhorar a eficácia de tratamentos contra a leishmaniose (Assolini *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2017; Kansal *et al.*, 2012; Mazur *et al.*, 2019). Nesta perspectiva, Assolini *et al.*, (2020) revelaram que o encapsulamento de 4-nitrochalcona (4NC) em nanopartículas de cera de abelha protegeu os macrófagos dos efeitos tóxicos causados pelo composto livre, destacando a eficácia das nanopartículas na redução da toxicidade celular. Outro estudo similar demonstrou a eficácia de nanopartículas de doxorubicina revestidas com fosfatidilserina para o direcionamento de macrófagos, o que resultou em uma redução significativa da carga parasitária com menor citotoxicidade em

comparação com a doxorrubicina livre (Kansal *et al.*, 2012). Nesse mesmo sentido, Mazur *et al.*, (2019) demonstraram que o tratamento com dietilditiocarbamato (DETC) livre reduziu a viabilidade dos macrófagos peritoneais murinos. Contudo, quando o DETC foi encapsulado em nanopartículas de cera de abelha e óleo de copaíba, não houve impacto significativo na viabilidade celular, sugerindo que o encapsulamento em nanopartículas pode proteger as células saudáveis e reduzir a toxicidade do composto. Da mesma forma, Monteiro *et al.*, (2017) desenvolveram nanopartículas de poli(butil cianoacrilato) revestidas com dextrana encapsuladas com hidroximetilnitrofurazona, que mostraram uma citotoxicidade reduzida das nanopartículas encapsuladas em comparação com o fármaco livre e uma eficácia melhorada contra *Leishmania amazonensis*. Por fim, Katebi *et al.*, (2021) avaliaram a segurança das nanopartículas de PLGA de três componentes, contendo antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) e ligantes TLR, incluindo R848 e Pam3CSK4, em células de macrófagos J774A.1, e mostraram que até 2000 µg/mL, as nanopartículas de PLGA sem carga não afetaram a viabilidade celular. Além disso, as nanopartículas de PLGA contendo SLA, R848 e Pam3CSK4 não apresentaram diferenças significativas na viabilidade dos macrófagos em comparação ao controle, em concentrações de 0,003 a 1 mg/mL, comprovando a segurança dessas nanopartículas em estudos *in vitro*. Portanto, a abordagem de encapsulamento do SB83 em nanopartículas de PLA mostra-se promissora para otimizar a administração de fármacos e preservar a função celular dos macrófagos durante o tratamento da leishmaniose.

5.3.2 Atividade anti-leishmania

A tabela 17 resume a atividade anti-leishmania de diferentes formulações de nanoesferas (NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD e SB83) comparadas ao fármaco livre (SB83), e à miltefosina frente as formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão realizados em três réplicas independentes. A significância estatística foi determinada através do teste ANOVA bidirecional seguida pelo teste de Tukey em comparação com Miltefosina. A atividade é medida pelas concentrações inibitórias (CI₅₀) e efetivas (CE₅₀) médias e os índices de seletividade (IS).

Tabela 17 - Atividade anti-leishmania (CI_{50} e CE_{50}) e índice de seletividade (IS) das NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD comparadas ao fármaco livre (SB83), e à miltefosina frente à *Leishmania amazonensis*.

Formulação	Promastigotas		Amastigotas axênicas	
	CI_{50} (μM)	IS	CE_{50} (μM)	IS
BNP	SA	-	SA	-
NPSB83	$8.03 \pm 0.93^*$	22.7****	19.6 ± 1.2	9.3
NPSB83FD	10.47 ± 0.8	18.6**	21.08 ± 0.83	9.2
NPSB83TFD	9.62 ± 0.25	19.8***	19.3 ± 1.79	9.9
SB83	$5.72 \pm 0.46^{**}$	18.4**	17.4 ± 0.94	6.1
Miltefosina	17.25 ± 1.73	6.9	18.5 ± 1.05	6.5

Fonte: Autor (2024).

Os dados apresentados mostram que as formulações de nanoesferas encapsuladas com o fármaco (NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD) e o SB83 exibem atividades anti-leishmania superiores ao fármaco referência miltefosina frente as duas formas evolutivas do parasita (promastigotas e amastigotas axênicas). Não foram encontradas atividades citotóxicas (SA) para as nanoesferas sem fármaco (BNP), o que indica que os componentes da formulação são inertes. Em termos de CI_{50} , o SB83 livre destacou-se com o menor valor ($5.72 \pm 0.46 \mu M$), indicando uma maior eficácia contra as formas promastigotas. A análise estatística utilizando ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey revelou diferenças significativas entre as formulações. As três formulações (NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD) apresentaram atividade superior a miltefosina, porém inferior ao fármaco livre.

Notavelmente, os IS de todas as nanoformulações com SB83 (NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD) foram ligeiramente superiores ao SB83 livre e significativamente maiores em comparação à miltefosina ($p < 0,0001$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, respectivamente), indicando um potencial terapêutico promissor dessas nanoformulações com impacto mínimo e maior segurança nas células hospedeiras.

A CE_{50} foi testada para as Amastigotas axênicas e está representada na tabela 17. A significância estatística foi determinada através do teste ANOVA bidirecional seguida pelo teste de Tukey em comparação com Miltefosina. Os resultados para a CE_{50} das diferentes formulações de NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD e SB83 em comparação à miltefosina demonstram que estatisticamente essas nanoformulações contra as formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* não obtiveram diferenças significativas. No entanto, as formulações NPSB83, NPSB83FD e NPSB83TFD não reduziram a eficácia do SB83 encapsulado quando comparado ao SB83 livre. Todos os valores de CE_{50} foram estatisticamente

equivalentes (não significativo), o que demonstra que o processo de encapsulamento não comprometeu a eficiência terapêutica do SB83 contra as amastigotas.

Vale ressaltar que apesar das três formulações de PNPs encapsuladas com o SB83 não apresentarem uma eficácia superior significativa em ensaios *in vitro*, estas possuem um grande potencial para terapias de longa duração, especialmente contra as formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Isso é evidenciado pelos resultados da cinética de liberação *in vitro* do SB83 apresentados na figura 8, que mostra uma liberação inicial lenta seguida por uma liberação sustentada. A liberação sustentada de fármacos encapsulados em nanopartículas pode ser benéfica para manter níveis terapêuticos prolongados, o que é crucial para o tratamento eficaz da leishmaniose, uma vez que as amastigotas são as formas patogênicas no hospedeiro (Silva *et al.*, 2024; Sarwar *et al.*, 2020). O valor de CE_{50} entre as formulações das nanoesferas e a miltefosina, sem diferenças estatisticamente significativas, reforça a ideia de que a cinética de liberação sustentada do SB83 é crítica para esses resultados, pois, embora a eficácia *in vitro* do SB83 nas nanoesferas possa parecer ligeiramente inferior, devido à liberação mais lenta do SB83, essa característica pode ser altamente benéfica em um cenário *in vivo*, proporcionando uma ação prolongada do fármaco e potencialmente reduzindo a necessidade de doses frequentes.

Estudos como o de Valle *et al.*, (2019) destacam que a liberação controlada pode melhorar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica, especialmente em doenças como a leishmaniose. Além disso, o SB83 encapsulado nas PNPs mostrou índices de seletividade superiores para formas promastigotas e amastigotas em comparação com a miltefosina e o SB83 livre, evidenciando o potencial dessas nanopartículas em proporcionar uma terapia mais segura e seletiva

Estudos recentes como os de Khatami *et al.*, (2020) demonstraram que nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas biologicamente exibem uma atividade anti-leishmania contra *Leishmania major*, com CI_{50} de aproximadamente 0,001 mg/mL de forma que ao aumentar a concentração de NPs de ZnO, a viabilidade dos parasitas testados diminuiu significativamente. Em outra pesquisa, Katebi *et al.* (2021) mostraram que nanopartículas de PLGA encapsulando antígenos solúveis de *Leishmania* (SLA) e agonistas de TLRs aumentam a resposta imunológica de macrófagos infectados, reduzindo significativamente a carga parasitária. Rahnema *et al.*, (2021) desenvolveram nanocarreadores lipídicos encapsulados com artemether (ART-NLCs) e observaram uma significativa melhora na atividade anti-leishmania em comparação com o artemether livre. Igualmente ao SB83 incorporados nas PNPs, as ART-NLCs apresentaram um índice de seletividade maior e menor citotoxicidade em macrófagos,

sugerindo que as nanopartículas é uma alternativa promissora no tratamento contra as *Leishmanias*. De forma semelhante, Lima *et al.*, (2012) investigaram a eficácia de derivados de bisnaftalimidopropil encapsulados em nanopartículas peguiladas contra *Leishmania infantum*. Os resultados sugerem que as nanopartículas incorporadas com esses derivados apresentaram uma atividade anti-leishmania significativamente maior e menor citotoxicidade em células de mamíferos em comparação com os compostos livres, indicando um potencial terapêutico elevado dessas formulações peguiladas. Outro estudo relevante foi conduzido por Casa *et al.*, (2018), que desenvolveram nanopartículas de albumina de soro bovino contendo anfotericina B para tratar a LC. As nanopartículas demonstraram uma redução significativa da carga parasitária e menor toxicidade em comparação com a anfotericina B livre, evidenciando o potencial das nanopartículas de albumina para melhorar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos adversos. Logo, esses estudos demonstram os avanços na encapsulação de compostos anti-leishmania em nanopartículas, representando uma abordagem inovadora e eficaz no tratamento da leishmaniose.

Diante disso, os resultados do presente estudo indicam que as formulações de nanoesferas encapsuladas, especialmente NPSB83, NPSB83FD, NPSB83TFD e SB83, são estratégias promissoras para o tratamento da leishmaniose, oferecendo maior segurança quando comparado ao SB83 livre e o medicamento referência miltefosina.

6 CONCLUSÃO

As nanopartículas de PLA contendo o SB83 foram desenvolvidos com sucesso pela técnica de nanoprecipitação, com a adição da trealose exercendo uma influência positiva nos parâmetros físico-químicos e na cinética de liberação do SB83 das PNPs. Nesse estudo, foi apresentado nanopartículas esféricas, bem distribuídas e sem sinais de agregação, com liberação sustentada, o que é importante para garantir a eficiência, estabilidade e a consistência do sistema de liberação de fármacos.

O método analítico por CLAE para a quantificação do SB83, desenvolvido utilizando a abordagem de AQB_D, mostrou-se eficaz para detectar concentrações do SB83 das concentrações de 4 a 16 µg/mL, cumprindo os padrões estabelecidos pelas diretrizes do ICH Q2 (R1) e ANVISA RDC nº 166/2017. No entanto, as descobertas deste estudo incentivam a continuação da pesquisa para melhorar a robustez dos métodos analíticos em diversas condições operacionais.

Os ensaios *in vitro* em macrófagos RAW 264.7 revelaram que as PNPs encapsuladas com SB83 são menos citotóxicas em comparação ao SB83 e a miltefosina, enfatizando a segurança aprimorada do SB83 nas nanopartículas, potencializando sua aplicabilidade como um tratamento mais seguro. A avaliação frente as formas amastigotas axênicas revelou que o SB83 encapsulado nas PNPs manteve uma eficácia comparável ao fármaco livre, indicando que a encapsulação preserva a atividade terapêutica do SB83 frente as amastigotas de *L. Amazonensis*. Embora as PNPs incorporadas com o SB83 não tenham exibido superioridade nos ensaios *in vitro*, elas demonstram um grande potencial para tratamentos de longa duração devido à sua cinética de liberação prolongada, o que é essencial para manter níveis terapêuticos efetivos contra as amastigotas patogênicas da leishmaniose. Além disso, a capacidade das nanopartículas de controlar a liberação do SB83 e aprimorar a segurança do tratamento é particularmente uma alternativa relevante, visto que a utilização dos medicamentos disponíveis atualmente, exigem regimes posológicos prolongados.

Portanto, encapsular o SB83 em nanopartículas de PLA emerge como uma abordagem valiosa, potencializando a redução da citotoxicidade e aprimorando a segurança do tratamento. Logo, esse estudo contribuiu para o avanço das terapias baseadas em nanotecnologia para doenças negligenciadas e sugere a necessidade de estudos adicionais para avaliar a eficácia em modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABADÍAS-GRANADO, I.; DIAGO, A.; CERRO, P. A.; PALMA-RUIZ, A. M.; GILABERTE, Y. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, v. 112, p. 601-618, 2021. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- ABIRAMI, M., KARAN KUMAR, B., FAHEEM, DEY, S., JOHRI, S., REGUERA, R. M., BALAÑA-FOUCE, R., GOWRI CHANDRA SEKHAR, K. V., SANKARANARAYANAN, M. Molecular-level strategic goals and repressors in Leishmaniasis – Integrated data to accelerate target-based heterocyclic scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 257, p. 1-24, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115471>
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. *Acta Tropica*, v. 172, p. 86–90, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.029>
- ALMEIDA, F. S., VANDERLEY, S. E. R., COMBERLANG, F. C., ANDRADE, A. G. DE, CAVALCANTE-SILVA, L. H. A., SILVA, E. DOS S., PALMEIRA, P. H. DE S., AMARAL, I. P. G. DO, KEESEN, T. S. L. Leishmaniasis: Immune Cells Crosstalk in Macrophage Polarization. *In Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 8, n.5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050276>
- AMEKYEYEH, H.; BILLA, N. Lyophilized drug-loaded solid lipid nanoparticles formulated with beeswax and theobroma oil. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26040908>.
- AMINI, Y.; AMEL, S. J.; SADRI, K.; ZARE, S.; MUSAVI, D.; TAFAGHODI, M. Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v. 28, n. 6, p. 613-620, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/BME-171705>.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União: seção 1**, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.
- ASSOLINI, J. P.; SILVA, T. P. da; SILVA, B. T. da; GONÇALVES, M. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; SAHD, C. S.; CARLOTO, A. C. M.; FEUSER, P. E.; CORDEIRO, A. P.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. de; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; PAVANELLI, W. R. 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, v. 884, p. 1-11, 2020. Disponível em: [10.1016/j.ejphar.2020.173392](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173392).
- AYYANAAR, S.; KESAVAN, M. P. Magnetic iron oxide nanoparticles@lecithin/poly (l-lactic acid) microspheres for targeted drug release in cancer therapy. *International Journal of*

Biological Macromolecules, v. 253, p. 1-13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127480>.

BALLA, E.; DANIILIDIS, V.; KARLIOTI, G.; KALAMAS, T.; STEFANIDOU, M.; BIKIARIS, N.; VLACHOPOULOS, A.; KOUMENTAKOU, I.; BIKIARIS, D. Poly(lactic Acid): A Versatile Biobased Polymer for the Future with Multifunctional Properties—From Monomer Synthesis, Polymerization Techniques and Molecular Weight Increase to PLA Applications. *Polymers*, v. 13, p. 1-50, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym13111822>

BARRIE, U., FLOYD, K., DATTA, A., WETZEL, D. M. MAPK/ERK activation in macrophages promotes Leishmania internalization and pathogenesis. *Microbes and Infection*, v.26, p. 1-12, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2024.105353>-

BASHIR, A.; SAHU, G.; RASHID, I.; TIWARI, P. Efficacy and safety of pharmacotherapeutic interventions used in visceral leishmaniasis clinical trials: A systematic review and network meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 15, n. 8, p. 343–353, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1995-7645.354419>.

BASTOS, D. S. S.; SILVA, A. C.; NOVAES, R. D.; SOUZA, A. C. F.; SANTOS, E. C.; GONÇALVES, R. v.; MARQUES-DA-SILVA, E. A. Could combination chemotherapy be more effective than monotherapy in the treatment of visceral leishmaniasis? A systematic review of preclinical evidence. *Parasitology*, v. 149, n. 6, p. 751–764, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182022000142>.

BAZANA, M. T., CODEVILLA, C. F., MENEZES, C. R. de. Nanoencapsulation of bioactive compounds: challenges and perspectives. *Food Science*, v. 26, p. 47–56, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.005>

BHATTACHARYA, S. Fabrication of poly(sarcosine), poly (ethylene glycol), and poly (lactic-co-glycolic acid) polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 61, p. 1-14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102194>

BHATTACHARYA, S., SINGH, D., AICH, J., AJAZUDDIN, SHETE, M. B. Development and characterization of hyaluronic acid surface scaffolds Encorafenib loaded polymeric nanoparticles for colorectal cancer targeting. *Materials Today Communications*, v. 31, p.1-21, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103757>

BHATTACHARYA, S.; BONDE, S.; HATWARE, K.; SHARMA, S.; ANJUM, M. M.; SAHU, R. K. Physicochemical characterization, in vitro and in vivo evaluation of chitosan/carrageenan encumbered with Imatinib mesylate-polysarcosine nanoparticles for sustained drug release and enhanced colorectal cancer targeted therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 245, p. 1-23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125529>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 jul.

2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/17331406.

BUHECHA, M. D.; LANSLEY, A. B.; SOMAVARAPU, S.; PANNALA, A. S. Development and characterization of PLA nanoparticles for pulmonary drug delivery: Co-encapsulation of theophylline and budesonide, a hydrophilic and lipophilic drug. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 53, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101128>.

CASA, D. M.; SCARIOT, D. B.; KHALIL, N. M.; NAKAMURA, C. V.; MAINARDES, R. M. Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. *Experimental Parasitology*, v. 192, p. 12-18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.003>

DALMOLIN, L. F., KHALIL, N. M., MAINARDES, R. M. Delivery of vanillin by poly (lactic acid) nanoparticles: Development, characterization and in vitro evaluation of antioxidant activity. *Materials Science and Engineering: C*, v. 62, p. 1-8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.056>.

DIXIT, U. G., RODRÍGUEZ, N. E., POLANDO, R., MCDOWELL, M. A., WILSON, M. E. Complement receptor 3 mediates ruffle-like, actin-rich aggregates during phagocytosis of *Leishmania infantum* metacyclics. *Experimental Parasitology*, v.220, p. 1-9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107968>

DOIFODE, D. S., JAWARKAR, S. G., JADHAO, M. P., BODE, M. M. A REVIEW ON METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION BY USING HPLC. *International Journal Of Scientific Research*, v. 10, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.36106/ijsr>

ELBRINK, K.; HEES, S. V.; HOLM, R.; KIEKENS, F. Optimization of the different phases of the freeze-drying process of solid lipid nanoparticles using experimental designs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 635, p. 1-17, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122717>

ELAGAMY, S. H.; MANSOUR, F. R.; ELBASTAWISSY, A. B. B.; EL-MALLA. S. F. Development of stability indicating reversed-phase high-performance liquid chromatography method for determination of elobixibat in pure form and laboratory prepared tablets: Application to dissolution study. *Journal of Separation Science*, v. 45, p. 3378-3645, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.202200322>

ESFANDIARI, F.; MOTAZEDIAN, M. H.; ASGARI, G.; MOROWVAT, M. H.; MOLAEI, M.; HELI, H. Paromomycin-loaded mannosylated chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and targeted drug delivery against leishmaniasis. *Acta Tropica*, v. 197, p. 1-25, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105045>.

FÉLIX, M. B.; ARAÚJO, R. S. A. de; BARROS, R. P. C.; SIMONE, C. A. de; RODRIGUES, R. R. L.; NUNES, T. A. de L.; RODRIGUES, K. A. da F.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; MURATOV, E.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. Computer-Assisted Design of Thiophene-Indole Hybrids as *Leishmanial Agents*. *Current Topics in Medicinal*

Chemistry, v. 20, n. 19, p. 1704-1719, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.2174/1568026620666200616142120>.

FERNÁNDEZ, K.; ABURTO, J.; VON PLESSING, C.; ROCKEL, M.; ASPÉ, E. Factorial design optimization and characterization of poly-lactic acid (PLA) nanoparticle formation for the delivery of grape extracts. *Food Chemistry*, v. 207, p. 75-85, 2016. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.083>.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 55, n. 1, p. 1-4, 1989.

FLORES, G. V. A, SANDOVAL PACHECO, C. M., FERREIRA, A. F., TOMOKANE, T. Y., NUNES, J. B., COLOMBO, F. A., SOSA-OCHOA, W. H., ZUNIGA, C., SILVEIRA, F. T., CORBETT, C. E. P., LAURENTI, M. D. *Leishmania (L.) infantum chagasi* isolated from skin lesions of patients affected by non-ulcerated cutaneous leishmaniasis lead to visceral lesion in hamsters. *Parasitology International*, v. 93, p. 1-9, 2023. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102723>

FRANÇA, J. O. C. de; SILVA VALADARES, D. da; PAIVA, M. F.; DIAS, S. C. L.; DIAS, J. A. Polymers Based on PLA from Synthesis Using D,L-Lactic Acid (or Racemic Lactide) and Some Biomedical Applications: A Short Review. *Polymers*, v. 14, n. 12, p. 1-35, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym14122317>

FREITAS, C. S., SANTIAGO, S. S., LAGE, D. P., ANTINARELLI, L. M. R., OLIVEIRA, F. M., VALE, D. L., MARTINS, V. T., MAGALHAES, L. N. D., BANDEIRA, R. S., RAMOS, F. F., PEREIRA, I. A. G., DE JESUS, M. M., LUDOLF, F., TAVARES, G. S. V., COSTA, A. V., FERREIRA, R. S., COIMBRA, E. S., TEIXEIRA, R. R., & COELHO, E. A. F. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity, mode of action and cellular response induced by vanillin synthetic derivatives against *Leishmania* species able to cause cutaneous and visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 251, p. 1-9, 2023. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108555>

GAGLIARDI, A.; GIULIANO, E.; VENKATESWARARAO, E.; FRESTA, M.; BULOTTA, S.; VIBHUDUTTA, A.; AWASTHI, V.; COSCO, D. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 1-24, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>

GHARIEH, A., KHOEE, S., MAHDAVIAN, A. Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 269, p. 152-186, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.010>.

GIMONDI, S.; FERREIRA, H.; REIS, R. L.; NEVES, N. M. Intracellular Trafficking of Size-Tuned Nanoparticles for Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 312, p. 1-17, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25010312>.

GLINKA, M.; FILATOVA, K.; KUCIŃSKA-LIPKA, J.; BERGEROVA, E. D.; WASIK, A.; SEDLAŘÍK, V. Encapsulation of Amikacin into Microparticles Based on Low-Molecular-Weight Poly(lactic acid) and Poly(lactic acid-co-polyethylene glycol). *Molecular*

Pharmaceutics, v. 18, n. 8, p. 2986–2996, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00193>

GOSWAMI, R. P.; RAHMAN, M.; DAS, S.; TRIPATHI, S. K.; GOSWAMI, R. P. Combination therapy against Indian visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (Fungisome™) and short-course miltefosine in comparison to miltefosine monotherapy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 1, p. 308–314, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0931>.

GRIENSVEN, J. V.; DORLO, T. P.; DIRO, E.; COSTA, C.; BURZA, S. The status of combination therapy for visceral leishmaniasis: an updated review. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 24, n. 1, p. 36–46, 2024. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00353-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00353-5).

GUPTA, A. K., DAS, S., KAMRAN, M., EJAZI, S. A., & ALI, N. (2022). The pathogenicity and virulence of Leishmania - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence*, v.13, p. 903–935, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2074130>

GUPTA, M. K., GHUGE, A., PARAB, M., AL-REFAEI, Y., KHANDARE, A., DAND, N., WAGHMARE, N. A comparative review on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) High-Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) with current updates. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, v.35, p. 224–228, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/cipms-2022-0039>

GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, M.; ESCOBAR-BARRIOS, V. A.; POZOS-GUILLÉN, A.; ESCOBAR-GARCÍA, D. M. RGD-functionalization of PLA/starch scaffolds obtained by electrospinning and evaluated in vitro for potential bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, v. 96, p. 798–806, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.003>.

HEGYESI, N.; ZHANG, Y.; KOHÁRI, A.; POLYÁK, P.; SUI, X.; PUKÁNSZKY, B. Enzymatic degradation of PLA/cellulose nanocrystal composites. *Industrial Crops and Products*, v. 141, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111799>.

HERNÁNDEZ-GIOTTONINI, K. Y., RODRÍGUEZ-CÓRDOVA, R., GUTIÉRREZ-VALENZUELA, C. A., PENUNURI-MIRANDA, O., ZAVALA-RIVERA, P., GUERRERO-GERMÁN, P., LUCERO-ACUÑA, A. PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: effects of formulation parameters. *RSC Advances*, v. 10, p. 4218–4231, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c9ra10857b>.

HOLLEY, C. K.; SINQUEFIELD, B.; MAJD, S. Optimization of single emulsion method for encapsulation of Dp44mT in PLGA nanoparticles. *2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, Berlin, Germany, p. 1078–1081, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/EMBC.2019.8857458>

ICH, INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva: ICH, 2005. Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.

ISANE, S. P., WAGHMARE, S. A., & KAMBLE, H. v. (2022). A Review on Method Development, Validation, Optimization and Applications of HPLC. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, v.10, n.5, p.1860–1867. Disponível em: <https://doi.org/10.22214/ijraset.2022.42685>

JACKMAN, M. J.; LI, W.; SMITH, A.; WORKMAN, D.; TREACHER, K. E.; CORRIGAN, A.; ABDULRAZZAQ, F.; SONZINI, S.; NAZIR, Z.; LAWRENCE, M. J.; MAHMOUDI, N.; CANT, D.; COUNSELL, J.; CAIRNS, J.; FERGUSON, D.; LENZ, E.; BAQUAIN, S.; MADLA, C. M.; VAN-PELT, S.; MAZZA, M. Impact of the physical-chemical properties of poly(lactic acid)–poly(ethylene glycol) polymeric nanoparticles on biodistribution. *Journal of Controlled Release*, v. 365, p. 491-506, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.11.043>.

JENJOB, R., PHAKKEEREE, T., SEIDI, F., THEERASILP, M., CRESPIY, D. Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*, v. 19, n. 6, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mabi.201900063>.

KAMMONA, O.; TSANAKTSIDOU, E. Nanotechnology-aided diagnosis, treatment and prevention of leishmaniasis. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 605, p. 1-51, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34081999/>

KAPOOR, D. U.; GARG, R.; GAUR, M.; PRAJAPATI, B. G.; AGRAWAL, G.; BHATTACHARYA, S.; ELOSSAILY, G. M. Polymeric nanoparticles approach and identification and characterization of novel biomarkers for colon cancer. *Results in Chemistry*, v. 6, p. 1-16, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101167>

KANSAL, S.; TANDON, R.; DWIVEDI, P.; MISRA, P. VERMA, P.R.P., DUBE, A.; MISHRA, P. R. Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p.2650-2660, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dks286>

KARTHICK, V.; ZAHIR, A. A.; ANBARASAN, K.; RAHUMAN, A. A.; THAMARAI, R. Nano-encapsulation and characterizations of glimepiride drug with chitosan nanoparticles and its in vitro drug release kinetics and antidiabetic activity. *Materials Today Communications*, v. 39, p. 1-14, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2024.109333>.

KATEBI, A.; Varshochian, R.; RIAZI-RAD, F. GANJALIKHAMI-HAKEMI, Ajdary, S. Combinatorial delivery of antigen and TLR agonists via PLGA nanoparticles modulates *Leishmania major*-infected-macrophages activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 137, p. 1-10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111276>

KHAN, M. M.; ZAIDI, S. S.; SIYAL, F. J.; KHAN, S. U.; ISHRAT, G.; BATOOL, S.; MUSTAPHA, O.; KHAN, S.; DIN, F. UD. Statistical optimization of co-loaded rifampicin and pentamidine polymeric nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 79, p.1-16, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104005>.

KHATAMI, M.; KHATAMI, S.; Mosazade, F.; Raisi, M.; Haghighat, M.; Sabaghan, M.; Yaghoubi, S.; Sarani, M.; Bamorovat, M.; Malekian, L.; Naroi, A.; Varma, R. S. Greener Synthesis of Rod Shaped Zinc Oxide NPs Using *Lilium ledebourii* Tuber and Evaluation of Their Leishmanicidal Activity. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 1-5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30498/ijb.2020.119481.2196>

KONIUCH, N.; ILLETT, M.; COLLINS, S. M.; HONDOW, N.; BROWN, A.; HUGHES, L.; BLADE, H. Structure of polymeric nanoparticles encapsulating a drug – pamoic acid ion pair by scanning transmission electron microscopy. *Heliyon*, v. 9, n. 6, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16959>

KORSMEYER, R. W., GUMY, R., DOELKER, E., BURI, P., PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *In international Journal of Pharmaceutics*, v. 15, P. 25-35, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)

KOVÁCS, B.; BODA, F.; FÜLÖP, I.; SZÉKELY-SZENTMIKLÓSI, I.; KELEMEN, É. K.; KOVÁCS-DEÁK, B.; SZÉKELY-SZENTMIKLÓSI, B. HPLC method development for fampridine using Analytical Quality by Design approach. *Acta Pharmaceutica*, v. 70, n. 4, p. 465-482, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0036>.

KITAMURAA, R.; KAWABEA, T.; KAJIROA, T.; YONEMOCHI, E. The development of retention time prediction model using multilinear gradient profiles of seven pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 198, p.1-7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114024>

KUMAR SINGH, P. *et al.* Macrophage targeted amphotericin B nanodelivery systems against visceral leishmaniasis. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 258, p. 1-12, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mseb.2020.114571>

LIMA, S. C.; RODRIGUES, V.; GARRIDO, J.; BORGES, F.; LIN, P. K. T.; SILVA, A. C. In vitro evaluation of bisnaphthalimidopropyl derivatives loaded into pegylated nanoparticles against *Leishmania infantum* protozoa. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 39, n. 5, p. 424-430, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.003>

LINDNER, G. da. R.; DALMOLIN, L. F.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Influence of the Formulation Parameters on the Particle Size and Encapsulation Efficiency of Resveratrol in PLA and PLA-PEG Blend Nanoparticles: A Factorial Design. *Journal of Nanoscience Nanotechnology*, v. 15, n. 12, p. 10173-10182, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.11687>.

LIU, S.; QIN, S.; HE, M.; ZHOU, D.; QIN, Q.; WANG, H. Current applications of poly(lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery. **Composites Part B: Engineering**, v. 199, p. 1-25, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108238>.

LIU, Y., YANG, G., BABY, T., TENGJISI, CHEN, D., WEITZ, D. A., ZHAO, C. X. Stable Polymer Nanoparticles with Exceptionally High Drug Loading by Sequential Nanoprecipitation. *A journal of the German Chemical Society*, v.59, p.4720–4728, 2020. <https://doi.org/10.1002/anie.201913539>

LUNA, I. S.; SOUZA, T. A. de; SILVA, M. S. da; RODRIGUES, K. A. da F.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B. Computer-Aided drug design of new 2-amino-thiophene derivatives as anti-leishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 250, p. 1-9, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115223>.

MALLI, S.; POMEL, S.; AYADI, Y.; DELOMÉNIE, C.; DA COSTA, A.; LOISEAU, P. M.; BOUCHEMAL, K. Topically Applied Chitosan-Coated Poly(isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles Are Active Against Cutaneous Leishmaniasis by Accelerating Lesion Healing and Reducing the Parasitic Load. *ACS Applied Bio Materials*, v. 2, n. 5, p. 2573-2586, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00263>.

MANDL, H. K.; QUIJANO, E.; SUH, H. W.; SPARAGO, E.; OECK, S.; GRUN, M.; GLAZER, P. M.; SALTZMAN, W. M. Optimizing biodegradable nanoparticle size for tissue-specific delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 314, p. 92-101, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.020>

MANN, S., FRASCA, K., SCHERRER, S., HENAO-MARTÍNEZ, A. F., NEWMAN, S., RAMANAN, P., SUAREZ, J. A. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Current Tropical Medicine Reports*, v.8, p.121-132, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>

MARTINS, L. G.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R. M. Application of a validated HPLC-PDA method for the determination of melatonin content and its release from poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v.7, p.388-393, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2017.05.007>

MAZUR, K. L.; FEUSER, P. E.; VALÉRIO, A.; POESTER CORDEIRO, A.; OLIVEIRA, C. I. de; ASSOLINI, J. P.; PAVANELLI, W. R.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Diethyldithiocarbamate loaded in beeswax-copaiba oil nanoparticles obtained by solventless double emulsion technique promote promastigote death in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 176, p. 507-512, 2019. Disponível em: [10.1016/j.colsurfb.2018.12.048](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.12.048).

MELO, Camila de Oliveira. **Nanopartículas de PLA contendo derivados espiro-acridínicos com atividade anticancerígena**. 2018. Dissertação (Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018. Disponível em: <https://tede.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/tede/3300>

MOHAN, L. J., MCDONALD, L., DALY, J. S., RAMTOOLA, Z. Optimising PLGA-PEG nanoparticle size and distribution for enhanced drug targeting to the inflamed intestinal barrier. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 11, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111114>.

MONTEIRO, L. M.; LÖBENBERG, R.; FERREIRA, E. I.; COTRIM, P. C.; KANASHIRO, E.; ROCHA, M.; CHUNG, M. C.; BOU-CHACRA, N. Targeting Leishmania amazonensis amastigotes through macrophage internalisation of a hydroxymethylnitrofurazone nanostructured polymeric system. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, p. 88-92, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.033>

MONTGOMERY, D. C., PECK, E. A.; VINING, G.G. Introduction to Linear Regression Analysis. **Wiley**, 3 ed. 1-872, 2012. Disponível em: <https://ocd.lcwu.edu.pk/cfiles/Statistics/Stat-503/IntroductiontoLinearRegressionAnalysisbyDouglasC.MontgomeryElizabethA.PeckG.GeoffreyViningz-lib.org.pdf>

MOR, B.; GÖRMEZ, A.; DEMIRCI, B. Immunopathological investigation of a gerbil model of cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 246, p. 1-8, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106991>.

MULLA, M. Z.; RAHMAN, M. R. T.; MARCOS, B.; TIWARI, B.; PATHANIA, S. Poly Lactic Acid (PLA) Nanocomposites: Effect of Inorganic Nanoparticles Reinforcement on Its Performance and Food Packaging Applications. **Molecules**, v. 26, n.7, p. 1-22, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26071967>.

NEEROOA, B. N. H. M.; OOI, L. T.; SHAMELI, K.; DAHLAN, N. A.; ISLAM, J. M. M.; PUSHPAMALAR, J.; TEO, S. Y. Development of polymer-assisted nanoparticles and nanogels for cancer therapy: An update. **Gels**, v. 7, n. 2, p. 1-30, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/gels7020060>.

NOFAR, M.; SACLIGIL, D.; CARREAU, P. J.; KAMAL, M. R.; HEUZEY, M. C. Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 307–360, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002>

OMS, ORGANIZAÇÃO MUUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <https://who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>, 2023.

OPAS, ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas, n. 11, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/leishmanioses-informe-epidemiologico-das-americas-no-11-dezembro-2022>.

OSPINA-VILLA, J. D., GÓMEZ-HOYOS, C., ZULUAGA-GALLEGO, R., & TRIANA-CHÁVEZ, O. Encapsulation of proteins from *Leishmania panamensis* into PLGA particles by a single emulsion-solvent evaporation method. **Journal of Microbiological Methods**, v.162, p.1–7, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.004>

OSTOLSKA, I.; WIŚNIEWSKA, M. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 10, p. 2453-2464, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.035>

OWENS, D. E., PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.

OYAMA, J., NONOSE, D. S. S. L. L., MILARÉ, H. R., FERREIRA, F. B. P., FREITAS, C. F., CAETANO, W., HIOKA, N., SILVEIRA, T. G. V., e LONARDONI, M. V. C. Potential of Pluronic® P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-*Leishmania* chemotherapy. **Acta**

Tropica, v. 192, p. 11–21, 2019. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.01.008>

OZDAL, Z. D.; GULTEKIN, Y.; VURAL, I.; TAKKA, S. Development and characterization of polymeric nanoparticles containing ondansetron hydrochloride as a hydrophilic drug. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 74, p. 1-10, 2022. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103599>.

PANCHAL, S. S.; VASAVA, D. V. Biodegradable Polymeric Materials: Synthetic Approach. *ACS Omega*, v. 5, n. 9, p. 4370–4379, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04422>.

PANDEY, S. K.; PATEL, D. K.; THAKUR, R.; MISHRA, D. P.; MAITI, P.; HALDAR, C. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 75, p. 521-529, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.011>.

PARDHI, V., PANT, G., FLORA, S. J. S. RP-HPLC method development and validation for bedaquiline fumarate to evaluate its forced degradation behaviour and stability in official dissolution media. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.6, n.42, p. 1-10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00061-x>

PASWAN, M.; CHANDEL, A. K. S.; MALEK, N. I.; DHOLAKIYA, B. Z. Preparation of sodium alginate/Cur-PLA hydrogel beads for curcumin encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 254, p. 1-14, 2024. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128005>.

PEPPAS, N. A., SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *In International Journal of Pharmaceutics*, v. 57, p.169-172, 1989. Disponível em: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:97651074>

PERMANA, A. D.; MADDEPPUNGENG, N. M.; ASMA, N.; RAHIM, A.; NAINU, F.; BAHAR, M. A.; YULIANTY, R. Validation of HPLC-UV method for simultaneous determination of quercetin and luteolin from chartamus tinctorius L in solid lipid nanoparticles incorporated in floating gel in situ formulation. *Microchemical Journal*, v. 194, p. 1-10, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109373>.

PERRY, J. L., REUTER, K. G., KAI, M. P., HERLIHY, K. P., JONES, S. W., LUFT, J. C., NAPIER, M., BEAR, J. E., DESIMONE, J. M. PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics. *Nano Letters*, v. 12, n. 10, p. 5304-5310, 2012. Disponível em:
<https://doi.org/10.1021/nl302638g>.

PIRES, A. C. A. M., VILLEGAS, L. E. M., CAMPOLINA, T. B., ORFANÓ, A. S., PIMENTA, P. F. P., SECUNDINO, N. F. C. Bacterial diversity of wild-caught Lutzomyia longipalpis (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. *Parasites & Vectors*, v. 10, n. 627, p. 1-9, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2593-7>

- POCHAPSKI, D. J.; SANTOS, C. C. dos.; LEITE, G. W.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. *Langmuir*, v. 37, n. 2, p. 717-730, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02056>.
- PONTE-SUCRE, A., GAMARRO, F., DUJARDIN, J. C., BARRETT, M. P., LÓPEZ-VÉLEZ, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R., POUNTAIN, A. W., MWENECHANYA, R., PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *In PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- PRASANNA, P.; KUMAR, P.; KUMAR, S.; RAJANA V. K.; KANT, V.; PRASAD, S. R.; MOHAN, U.; RAVICHANDIRAN, V.; MANDAL, D. Current status of nanoscale drug delivery and the future of nano-vaccine development for leishmaniasis – A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 141, p., 1-18, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111920>
- PRETULA, J.; SLOMKOWSKI, S.; PENCZEK, S. Polylactides - Methods of synthesis and characterization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 3–16, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.002>.
- PROIKAKIS, C. S.; TARANTILI, P. A.; ANDREOPOULOS, A. G. The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly(DL-lactic acid) tablets. *European Polymer Journal*, v.42. n. 12, p. 3269-3276, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2006.08.023>
- PULINGAM, T.; FOROOZANDEH, P.; CHUAH, J.-A.; SUDESH, K. Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nanomaterials*, v. 12, p. 1-27, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano12030576> A
- RAHIM, R. A.; JAYUSMAN, P. A.; MUHAMMAD, N.; AHMAD, F.; MOKHTAR, N.; MOHAMED, I. N.; MOHAMED, N.; SHUID, A. N. Recent advances in nanoencapsulation systems using PLGA of bioactive phenolics for protection against chronic diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 24, p. 49-62, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph16244962>.
- RAHNAMA, V.; MOTAZEDIAN, M. H.; MOHAMMADI-SAMANI, S.; ASGARI, Q.; GHASEMIYEH, P.; KHAZAEI, M. Artemether-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, characterization, and evaluation of in vitro effect on *Leishmania major*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 6, p. 623-633, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1735-5362.327508>.
- RAYDU, SUPRIYA. An exploration of high-performance liquid chromatography. *International Journal Of Scientific Research*, v. 11, n.8, p. 71-72, 2023. Disponível em: [https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-\(IJSR\)/fileview/an-exploration-of-highperformance-liquid-chromatography_August_2023_4851392016_0908831.pdf](https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-(IJSR)/fileview/an-exploration-of-highperformance-liquid-chromatography_August_2023_4851392016_0908831.pdf)
- ROATT, B. M., CARDOSO, J. M. de O., BRITO, R. C. F. de., COURA-VITAL, W., AGUIAR-SOARES, R. D. de O., REIS, A. B. Recent advances and new strategies on

leishmaniasis treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p.8965-8977, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10856-w/Published>

RODRIGUES, K. A. da F.; DIAS, C. N. de S.; NÉRIS, P. L. do N.; ROCHA, J. da C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A. de; KEESEN, T. de S. L.; OLIVEIRA, T. B. de; LIMA, M. do C. A. de; BALLIANO, T. L.; AQUINO, T. M. de; MOURA, R. O. de; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. de. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 106, p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26513640/>

RODRIGUES, K. A. da F.; SILVA, D. K. F.; SERAFIM, V. de L.; ANDRADE, P. N.; ALVES, A. F.; TAFURI, W. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOBRAL, M. V.; MOURA, R. O. de; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; OLIVEIRA, M. R. de. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 108, p. 1670–1678, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30372869/>

ROGÉRIO, L. A., TAKAHASHI, T. Y., CARDOSO, L., TAKAMIYA, N. T., DE MELO, E. V., DE JESUS, A. R., DE OLIVEIRA, F. A., FORRESTER, S., JEFFARES, D. C., DA SILVA, J. S., RIBEIRO, J. M., ALMEIDA, R. P., MARUYAMA, S. R. Co-infection of *Leishmania infantum* and a Crithidia-related species in a case of refractory relapsed visceral leishmaniasis with non-ulcerated cutaneous manifestation in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v.133, p.85–88, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.05.012>

SADAPHAL, P., DHAMAK, K. (2022). Review article on High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method Development and Validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 23–29. Disponível em: <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2022.v74i02.003>,

SAHA, D.; KUMAR, S.; RAY, D.; KOHLBRECHER, J.; ASWAL, V. K. Role of physicochemical parameters associated with the hydrophobic vs. amphiphilic biodegradable polymer nanoparticles formation. *Journal of Molecular Liquids*, v. 318, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113977>.

SAHA, P.; PANDEY, M. M. Design of Experiment (DoE)-Approach Based RP-HPLC Analytical Method Development and Validation for Estimation of Efavirenz in Bulk and Formulations. *Journal of Chromatographic Science*, v. 60, n. 1, p. 35-44, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmab029>

SALWA; KUMAR, L. Quality-by-design driven analytical method (AQbD) development and validation of HPLC–UV technique to quantify rivastigmine hydrogen tartrate in lipidic nanocarriers: Forced degradation, and assessment of drug content and in vitro release studies. *Microchemical Journal*, v. 193, p. 1-18, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108944>.

SATHISHBABU, P.; HANI, U.; SHAKEELA, C.; HEMANTH VIKRAM, P. R.; GHAZWANI, M.; OSMANI, R. A. M.; GURUPADAYYA, B. M.; GOWDA, D. V. A novel RP-HPLC method development and validation for simultaneous quantification of gefitinib

and resveratrol in polymeric hybrid lipid nanoparticles and glioma cells. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1212, p. 1-9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123483>.

SARWAR, H. S., VARIKUTI, S., FARHAN, M. F., SARWAR, M., AKHTAR, S., SATOSKAR, A. R., SHAHNAZ, G. Oral delivery and enhanced efficacy of antimonial drug through macrophage-guided multifunctional nanocargoes against visceral Leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 152, p.307–317, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.05.029>

SERRA, L., DOMÉNECH, J., PEPPAS, N. A. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *Biomaterials*, v.27, n.31, p. 5440–5451, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.011>

SIEPMANN, J., PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *In International Journal of Pharmaceutics*, v. 418, n. 1, p. 6–12, 2011. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>

SILVA, A. C. C. DA., NASCIMENTO, D. DE O., FERREIRA, J. R. M., GUIMARÃES-PINTO, K., FREIRE-DE-LIMA, L., MORROT, A., DECOTE-RICARDO, D., FILARDY, A. A., FREIRE-DE-LIMA, C. G. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *In Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 7, n. 4, p. 1-16, 2022. Disponível em <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>

SILVA, R. O.; COUNIL, H.; RABANEL, J. M.; HADDAD, M.; ZAOUTER, C.; BEN, M. R. K.; RAMASSAMY, C. Donepezil-Loaded Nanocarriers for the Treatment of Alzheimer's Disease: Superior Efficacy of Extracellular Vesicles Over Polymeric Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, v. 19, p. 1077–1096, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S449227>.

SINGH, O. P.; GEDDA, M. R.; MUDAVATH, S. L.; SRIVASTAVA, O. N.; SUNDAR, S. Envisioning the innovations in nanomedicine to combat visceral leishmaniasis: For future theranostic application. *Nanomedicine*, v. 14, n. 14, p. 1911–1927, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7006826>

SINGH, P. K.; JAISWAL, A. K.; PAWAR, V. K.; RAVAL, K.; KUMAR, A. BORA, H. K.; DUBE, A.; CHOURASIA, M. K. Fabrication of 3-O-sn-Phosphatidyl-L-serine Anchored PLGA Nanoparticle Bearing Amphotericin B for Macrophage Targeting. *Pharmaceutical Research*, v. 35, n. 60, p. 1-12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2293-1>.

SOUSA, J. P. A. de; SOUSA, J. M. S. de; RODRIGUES, R. R. L.; NUNES, T. A. de L.; MACHADO, Y. A. A.; ARAUJO, A. C. de; SILVA, I. G. M. da; BARROS-CORDEIRO, K. B.; BÃO, S. N.; ALVES, M. M. de M.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; RODRIGUES, K. A. da F. Antileishmanial activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. *International Immunopharmacology*, v. 123, p. 1-11, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110750>.

SOUZA, A. A. de; GRANJA, R. de C. B.; MELO, E. C. C. de; OLIVEIRA, W. F. de; ALBUQUERQUE, P. B. S. de; CORREIA, M. T. dos S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. das G. Biodegradable synthetic polymers in biomedical application: A review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 6, p. 24628–24644, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34119/bjhrv5n6-217>.

SOUZA, A., MARINS, D. S. S. DE., MATHIAS, S. L., MONTEIRO, L. M., YUKUYAMA, M. N., SCARIM, C. B., LÖBENBERG, R., BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. *In International Journal of Pharmaceutics*, v. 547, p. 421–431, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.018>

SOUZA, M. L. de; SANTOS, W. M. dos; SOUSA, A. L. M. de; FERRAZ, L. R. de M.; DA COSTA, L. A. G.; SILVA, E. O.; ROLIM NETO, P. J. Cutaneous leishmaniasis: new oral therapeutic approaches under development. *International Journal of Dermatology*, v. 61, n. 1, 2021, p. 89–98. Disponível em: [10.1111/ijd.15902](https://doi.org/10.1111/ijd.15902).

SUNDAR, S., SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments. *Parasitology*, Cambridge University Press., v. 145, n. 4, p. 481–48, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182017002116>

TAGLIAZUCCHI, L.; PEREA-MARTINEZ, A.; FIORINI, G.; MANZANO, J. I.; GENOVESE, F.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; PINETTI, D.; GAMARRO, F.; COSTI, M. P. Label-Free Mass Spectrometry Proteomics Reveals Different Pathways Modulated in THP-1 Cells Infected with Therapeutic Failure and Drug Resistance *Leishmania infantum* Clinical Isolates. *ACS Infectious Diseases*, v. 9, n. 3, p. 470–485, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00457>.

TAHERI, M. Techno-economical aspects of electrocoagulation optimization in three acid azo dyes' removal comparison. *Cleaner Chemical Engineering*, v. 2, p. 1-10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clce.2022.100007>

TAYYEBI, M., DARCHINI-MARAGHEH, E., LAYEGH, P., KIAFAR, B., GOYONLO, V. M. The effect of oral miltefosine in treatment of antimoniate resistant anthroponotic cutaneous leishmaniasis: An uncontrolled clinical trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.15, p. 1-9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009241>

TIBÚRCIO, B. V.; MENEZES, L. R. de.; MERAT, L. C.; ROCHA, L. V. M. da.; SILVA, E. O. da.; TAVARES, M. I. B. Encapsulation of orange oil by colloidal carriers based on PCL/Pluronic F68 nanoparticles for controlled delivery. *Polymer Bulletin*, v. 81, p. 2889-2913, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04824-3>.

TROITSKY, B. B., LOKTEVA, A. A., BEGANTSOVA, Y. E., NOVIKOVA, M. A., KONEV, A. N., FEDYUSHKIN, I. L. Preparation of Poly(methyl methacrylate) Nanoparticles 15–50 nm in Diameter from Submicrometer-Sized Latex Particles. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 92, p. 946-951, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1070427219070103>.

TRINANES, S.; RODRIGUEZ-MIERB, P.; COBASC, C.; SÁNCHEZC, E.; PHAN-TAN-LUUD, R.; CELA, R. Robustness assessment in computer-assisted liquid chromatography

procedures based on desirability functions, *Journal of Chromatography A*, v. 1609, p.1-10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460439>

UMERSKA, A.; PALUCH, K. J.; SANTOS-MARTINEZ, M. J.; CORRIGAN, O. I.; MEDINA, C.; TAJBER, L. Freeze drying of polyelectrolyte complex nanoparticles: Effect of nanoparticle composition and cryoprotectant selection. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 552, p. 27-38, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.035>

VALLE, I. V.; MACHADO, M. E.; ARAÚJO, C. D. C. B.; DA CUNHA-JUNIOR, E. F.; DA SILVA PACHECO, J.; TORRES-SANTOS, E. C.; DA SILVA, L. C. R. P.; CABRAL, L. M.; DO CARMO, F. A.; SATHLER, P. C. Oral pentamidine-loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles: An alternative approach for leishmaniasis treatment. *Nanotechnology*, v. 30, n. 45, p. 1-11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab373e>.

VARGA, N.; HORNOK, V.; JANOVAL, L.; DÉKÁNY, I.; CSAPÓ, E. The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 176, p. 122-132, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.012>.

VEGA, D. M.; MEGLIO, M. D.; ALONSO, S. d. V.; ALVIRA, F.; MONTANARI, J. Nanomaterials for diagnosis, treatment, and prevention of human cutaneous leishmaniasis: A review. *Open Nano*, v. 12, p. 1-22, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.onano.2023.100158>.

WANG, Y.; LI, P.; TRAN, T. T. D.; ZHANG, J.; KONG, L. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer-based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials*, v. 6, n. 2, p. 1-18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano6020026>.

WANG, Y.; ZHENG, Y.; ZHANG, L.; WANG, Q.; ZHANG, D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 172, n. 3, p. 1126-1141, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.006>

WENG, J; SHAO, Z.; CHAN, H. W; LI, S. P. Y; LAM, J. K. W; TSANG, C. K; CHOW, S. F. Mediating bio-fate of polymeric cholecalciferol nanoparticles through rational size control. *Biomaterials Advances*, v. 140, p.1-13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213074>

YACASI, G. R. R.; CAMPMANY, A. C. C.; GRAS, M. A. E.; GARCÍA, M. E.; LÓPEZ, M. L. G. Freeze drying optimization of polymeric nanoparticles for ocular flurbiprofen delivery: effect of protectant agents and critical process parameters on long-term stability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 43, n. 4 p. 637-651, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1275669>

YAN, XIBO; BERNARD, J.; GANACHAUD, F. Nanoprecipitation as a simple and straightforward process to create complex polymeric colloidal morphologies. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 294, p. 1-17, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102474>.

ZHANG, Y.; HUDSON-SMITH, N. V.; FRAND, S. D.; CAHILL, M. S.; DAVIS, L. S.; FENG, Z. V.; HAYNES, C. L.; HAMERS, R. J. Influence of the Spatial Distribution of Cationic Functional Groups at Nanoparticle Surfaces on Bacterial Viability and Membrane Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 142, n. 24, p. 10814–10823, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jacs.0c02737>.

ZIELIŃSKA, A., CARREIRO, F., OLIVEIRA, A. M., NEVES, A., PIRES, B., VENKATESH, D., DURAZZO, A., LUCARINI, M., EDER, P., SILVA, A., SANTINI, A., SOUTO, E. B. Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, v. 25, n. 16, p. 1-20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>.

ZIELIŃSKA, A.; FERREIRA, N. R.; FELICZAK-GUZIŁ, A.; NOWAK, I.; SOUTO, E. B. Loading, release profile and accelerated stability assessment of monoterpenes-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 25, n.7, p. 832-844, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1744008>