UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural:
preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da
atividade leishmanicida potencial

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original se encontra disponível em PDF no Serviço de Pós-Graduação da
FCF/USP.

Lis Marie Monteiro

Dissertação para obtenção de grau de MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural:
preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da
atividade leishmanicida potencial

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original se encontra disponível em PDF no Serviço de Pós-Graduação da
FCF/USP.

Lis Marie Monteiro

Dissertação para obtenção de grau de MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2013

Lis Marie Monteiro

Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural:
preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da
atividade leishmanicida potencial

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Monteiro, Lis Marie	
M775s	Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural : preparação, caracterização físico- química e avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida potencial / Lis Marie Monteiro. -- São Paulo, 2013. 127p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador : Bou-Chacra, Nadia Araci
	1. Tecnologia farmacêutica 2. Formulações farmacêuticas 3. Medicamento : Controle de qualidade I. T. II. Bou-Chacra, Nadia Araci, orientador.
	615.4 CDD

DEDICO ESTE TRABALHO:

À minha mãe Lucira Sadako Ohashi Monteiro, pelo amor, confiança, dedicação e apoio financeiro. Esse trabalho e meu desenvolvimento acadêmico não seriam possíveis sem seu apoio.

Ao meu pai Luiz Carlos Monteiro, irmãos Danyella Monteiro Borges e Vinicius Guilherme Monteiro, pelo apoio, conselhos e respeito às minhas escolhas profissionais. Sem vocês não conseguiria superar os momentos mais difíceis.

À minha orientadora Nádia Araci Bou-Chacra, que confiou em meu potencial desde a primeira conversa, pelos conselhos e as inúmeras ferramentas e pessoas que me apresentou nesses dois anos e meio de convivência, sem as quais não teria conseguido realizar esse trabalho, tenho muito orgulho e sorte de ter tido uma pessoa tão inteligente, acessível e generosa como orientadora.

Aos amigos e familiares pela compreensão nos momentos que estive ausente e pelas boas energias que me renovaram durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Paulo César Cotrim, por disponibilizar todos os recursos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

A Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro e Mussya Cisotto Rocha, pela amizade, respeito, dedicação, imenso auxílio e suporte nos testes biológicos realizados no Instituto de Medicina Tropical. Sem a presença e boa vontade de vocês não teria conseguido realizar essa parte tão importante desse trabalho.

À Farmacopéia Americana pelas instalações, material e equipamentos disponibilizados para realização dos testes por CLAE.

Ao aluno de Doutorado Guilherme Diniz Tavares, pelo grande auxílio na formulação das nanopartículas e pelas inúmeras dúvidas sanadas.

A dpUnion por ceder recursos humanos e equipamento para obtenção das microscopias.

À Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, por ceder o fármaco utilizado nesse trabalho, pelas instalações e equipamentos.

Estou muitíssimo grata a todos, as parcerias realizadas foram de importância vital para o desenvolvimento deste projeto.

A educação é um processo social, é desenvolvimento. Não é a preparação para a vida, é a própria vida.

John Dewey

RESUMO

MONTEIRO, L.M. **Sistema nanoestruturado polimérico contendo hidroximetilnitrofural: preparação, caracterização físico-química e avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida potencial.** 2013. 138p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

Na última década o emprego de nanotecnologia tem crescido exponencialmente em função das suas evidentes vantagens: maior eficácia terapêutica, menor toxicidade e liberação modificada do fármaco. Tais características permitem elevar os níveis do fármaco no compartimento intracelular, além de possibilitar sua liberação modificada no sítio específico. Essas vantagens vem ao encontro da otimização do tratamento da leishmaniose devido à falta de medicamentos seguros e de adequada atividade farmacológica. O objetivo do presente projeto constituiu-se na preparação e na avaliação das características físico-químicas da nanopartícula polimérica associada ao novo fármaco hidroximetilnitrofural (NFOH), desenvolvimento e validação do método analítico para a determinação da eficiência de encapsulação, avaliação a atividade leishmanicida *in vitro* em promastigotas, em macrófagos infectados por amastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade do NFOH livre e nanoestruturado. As nanopartículas poliméricas de poli (butil cianoacrilato) (PBCA) obtidas apresentaram potencial zeta de -10,1 mV, tamanho médio de 151,5 nm, polidispersividade de 0,104 e distribuição unimodal muito próximos ao encontrado na literatura. O método analítico validado apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, mostrando-se adequado para a quantificação do NFOH em nanopartículas, o resultado final da eficiência de encapsulação foi de 64,5%. Os testes realizados em promastigotas e macrófagos infectados por amastigotas de *L. amazonensis* revelaram a maior atividade do fármaco nanoestruturado em relação ao fármaco livre e ao placebo. Os ensaios de citotoxicidade comprovaram que o fármaco, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo apresentam baixa toxicidade. Logo, as nanopartículas obtidas contendo NFOH são uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: nanopartículas, hidroximetilnitrofural, poli (butil cianoacrilato), leishmaniose.

ABSTRACT

MONTEIRO, L.M. **Nanostructured polymeric system containing hidroxymethylnitrofurazone: preparation, physicochemical characterization and *in vitro* evaluation of potential leishmanicidal activity.** 2013. 138p. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2013.

In the last decade the use of nanotechnology has grown exponentially as a function of its obvious advantages: high therapeutic efficacy, lower toxicity and modified release of the drug. This feature allows raising the levels of the drug in the intracellular compartment, and enables the modified release of the drug in its specific site. These advantages come to meet the optimization of the treatment of leishmaniasis due to lack of drugs that are safe and appropriate pharmacological activity. The goal of this project consisted in the preparation and evaluation of physical and chemical characteristics of polymeric nanoparticle associated with new drug hidroxymethylnitrofurazone (NFOH), development and validation of analytical method for the determination of encapsulation efficiency, evaluating the leishmanicidal activity *in vitro* in promastigotes and in macrophages infected with amastigotes of *L. amazonensis* and finally cytotoxicity of free and nanostructured NFOH. The polymeric nanoparticles of poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA) obtained showed zeta potential of -10.1 mV, average size of 151.1 nm, polydispersity of 0.104 and unimodal distribution very similar to that found in the literature. The validated method showed specificity, linearity, precision, accuracy and robustness, making it adequate for the quantification of NFOH nanoparticles, the final outcome of the encapsulation efficiency was 64.5%. Tests conducted on promastigotes and macrophages infected with amastigotes of *L. amazonensis* revealed the highest activity of nanostructured drug compared to free drug and placebo. The cytotoxicity assays showed that the NFOH, nanostructured system containing NFOH and placebo had low toxicity. Thus, the obtained nanoparticles containing NFOH are a promising alternative for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Nanoparticles, hidroxymethylnitrofurazone, poly (butyl cyanoacrylate), leishmaniasis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doenças negligenciadas definidas pela Organização Mundial da Saúde (2010)	03
Tabela 2 – Principais cepas e manifestações clínicas da leishmaniose no Velho e Novo mundo (OMS, 2010)	11
Tabela 3 – Condições cromatográficas para a avaliação da eficiência de encapsulação do NFOH em nanopartículas poliméricas de PBCA	38
Tabela 4 – Características de desempenho para a validação do método analítico..	41
Tabela 5 – Concentrações e diluições de NFOH, Nano-NFOH e placebo utilizadas no teste de atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	45
Tabela 6 – Concentrações e diluições de NFOH, Nano-NFOH e placebo utilizados no teste de citotoxicidade	47
Tabela 7 – Concentrações e diluições de NFOH, Nano-NFOH e placebo utilizados na avaliação de atividade leishmanicida em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	49
Tabela 8 – Tamanho, índice de polidispersividade e potencial zeta para o sistema nanoestruturado contendo NFOH e isento do fármaco	54
Tabela 9 – Quantidade de NFOH encapsulado e eficiência de encapsulação de nanopartículas de PBCA	56
Tabela 10 – Estatísticas da análise de regressão da avaliação da linearidade do método	61
Tabela 11 – Concentração teórica, concentração obtida e porcentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA	63
Tabela 12 – Precisão por repetibilidade e intermediária do método para quantificação do NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA	64
Tabela 13 – Variações nas condições cromatográficas para avaliar a robustez do método para quantificação do NFOH encapsulado	65
Tabela 14 – Porcentagem de sobrevivência no teste da avaliação da atividade leishmanicida de NFOH, Nano-NFOH e placebo em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	66

Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, Nano-NFOH e placebo	71
Tabela 16 – Teste de Tukey para a comparação da atividade leishmanicida do NFOH, Nano-NFOH e placebo em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	72
Tabela 17 – Porcentagem de sobrevivência no teste da avaliação da citotoxicidade de NFOH, Nano-NFOH e placebo	74
Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para o teste de citotoxicidade de NFOH, Nano-NFOH e placebo	86
Tabela 19 – Índice de infecção da avaliação de atividade leishmanicida de NFOH, Nano-NFOH e placebo em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	77
Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, Nano-NFOH e placebo	80
Tabela 21 – Teste de Tukey para a comparação da atividade leishmanicida do NFOH, Nano-NFOH e placebo em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas promastigota (a) e amastigota intracelular; (b) de <i>Leishmania</i> ..	05
Figura 2 – Mosquito palha, principal vetor de leishmaniose	06
Figura 3 – Animais reservatórios da leishmaniose	07
Figura 4 – Ciclo de transmissão	08
Figura 5 – Distribuição dos casos de leishmaniose visceral nas regiões brasileiras de 2000 a 2008.....	09
Figura 6 – Letalidade da leishmaniose visceral entre os anos de 2000 e 2008.....	09
Figura 7 – Distribuição da leishmaniose cutânea nas regiões brasileiras de 2000 a 2008	10
Figura 8 – Paciente em período de estado da leishmaniose visceral	13
Figura 9 – Lesões em pacientes portadores de leishmaniose cutânea	15
Figura 10 – Reação de redução catalisada pela enzima tripanotona redutase (TR)	19
Figura 11 – Mecanismo proposto do dano no DNA e carcinogênese do nitrofurais ..	19
Figura 12 – Estrutura do nitrofurais (NF) e seu produto após a modificação molecular (NFOH)	20
Figura 13 – Distribuição do fármaco em nanocápsulas e nanoesferas	24
Figura 14 – Passos de iniciação e propagação da polimerização de monômeros de PACA (a) aniônica iniciado por base(B ⁻); (b) zwitteriônica iniciado por nucleófilo (Nu) e (c) radical (P•)	26
Figura 15 – Tamanho médio e índice de polidispersividade das nanopartículas contendo NFOH	51
Figura 16 – Tamanho médio e índice de polidispersividade das nanopartículas isentas de fármaco (placebo)	52
Figura 17 – Distribuição do potencial zeta relativo ao NFOH nanoestruturado.....	53
Figura 18 – Distribuição do potencial zeta relativo à nanopartícula isenta de fármaco	54
Figura 19 – Microscopia das nanopartículas contendo NFOH utilizando MEV. Magnificação 30.000 X	55
Figura 20 – Cromatograma relativo à solução-amostra utilizando comprimento de onda de 210 nm e fase móvel acetonitrila:água 80:20.....	57

Figura 21 – Cromatograma relativo à solução-amostra utilizando comprimento de onda de 210 nm e fase móvel acetonitrila:água 20:80.....	57
Figura 22 – Espectro do NFOH na fase móvel (acetonitrila:água 20:80) do método analítico para quantificação de fármaco em nanopartículas de PBCA	58
Figura 23 – Cromatograma de solução padrão após as modificações no método inicial (fase móvel acetonitrila:água 20:80 e comprimento de onda igual a 265 nm).....	59
Figura 24 – Cromatograma do diluente utilizado no método analítico por CLAE	59
Figura 25 – Cromatograma do placebo utilizado no método analítico por CLAE	60
Figura 26 – Determinação da homogeneidade espectral do NFOH no método analítico por CLAE	61
Figura 27 – Curva de linearidade obtida na validação do método de quantificação de NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA.....	62
Figura 28 – Intervalos (média e desvio padrão) para a atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	67
Figura 29 – Avaliação da distribuição normal dos dados referente ao teste de atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	69
Figura 30 – Teste de igualdade de variâncias dos resultados do teste de atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo	70
Figura 31 – Análise de resíduo dos resultados do teste de atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo	73
Figura 32 – Intervalos (média e desvio padrão) para o teste de citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo	75
Figura 33 – Avaliação da distribuição normal dos dados referente ao teste citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	76
Figura 34 – Teste de igualdade de variâncias para os resultados do teste de citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	77

Figura 35 – Análise de resíduo dos resultados do teste de citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo	79
Figura 36 – Intervalos (média e desvio padrão) para a atividade leishmanicida em amastigotas <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	81
Figura 37 – Avaliação da distribuição normal dos dados referente ao teste de atividade leishmanicida em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	82
Figura 38 – Avaliação da uniformidade de variâncias para os resultados do teste de atividade leishmanicida em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo	82
Figura 39 – Análise de resíduo dos resultados do teste de atividade leishmanicida em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo	85
Figura 40 – Amostras do teste de atividade leishmanicida em macrófagos infectados por amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1. 1 Doenças tropicais negligenciadas	02
1.2 Leishmaniose	04
1.2.1 Agente etiológico	04
1.2.2 Vetores	05
1.2.3 Reservatórios	06
1.2.4 Ciclo de transmissão	07
1.2.5 Epidemiologia	08
1.2.6 Manifestações clínicas	10
1.2.6.1 Leishmaniose visceral	11
1.2.6.2 Leishmaniose cutânea	13
1.2.7 Quimioterapia	15
1.2.7.1 Principais medicamentos leishmanicidas em uso	16
1.3 Hidroximetinitrofural: fármaco derivado nitrofurânico de atividade leishmanicida e tripanomicida	17
1.3.1 Compostos contendo o grupo nitro e sua aplicação no tratamento da leishmaniose e doença de Chagas	18
1.3.2 Modificação molecular	20
1.3.3 Hidroximetilnitrofural	21
1.4 Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de medicamentos	21
1.4.1 Considerações gerais relativas à nanotecnologia	21
1.4.2 Nanopartículas poliméricas com aplicação terapêutica: visão geral	23
1.4.3 Nanopartículas de poli (n-butil cianocrilato): aplicação terapêutica e mecanismos de polimerização	24
1.4.4 Potencial terapêutico de sistemas nanoestruturados poliméricos na liberação específica em macrófagos	27
2 OBJETIVO	29
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3 MATERIAL E MÉTODO	31
3.1 Material	32
3.1.1 Preparo das nanopartículas	32

3.1.1.1	Matérias-primas, solventes e reagentes	32
3.1.1.2	Aparelhos, equipamentos e acessórios	32
3.1.2	Desenvolvimento e validação do método analítico para avaliação da eficiência de encapsulação	33
3.1.2.1	Matérias-primas, solventes e reagentes	33
3.1.2.2	Aparelhos, equipamentos e acessórios	33
3.1.3	Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ..	33
3.1.3.1	Matérias-primas, solventes e reagentes	33
3.1.3.2	Aparelhos, equipamentos e acessórios	34
3.1.4	Avaliação da citotoxicidade do hidroximetilnitrofural livre e nanoestruturado..	34
3.1.4.1	Matérias-primas, solventes e reagentes	34
3.1.4.2	Aparelhos, equipamentos e acessórios	35
3.1.5	Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	35
3.1.5.1	Matérias-primas, solventes e reagentes	35
3.1.5.2	Aparelhos, equipamentos e acessórios	36
3.2	Método	36
3.2.1	Preparo das nanopartículas	36
3.2.2	Tamanho médio de partícula e índice de polidispersividade	37
3.2.3	Potencial zeta	37
3.2.4	Avaliação morfológica	37
3.2.5	Desenvolvimento do método analítico para quantificação de NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA	37
3.2.5.1	Preparo das soluções	39
3.2.6	Validação do método analítico de eficiência de encapsulação de nanopartículas de PBCA contendo hidroximetilnitrofural por CLAE	40
3.2.6.1	Especificidade	41
3.2.6.2	Linearidade e intervalo do método	41
3.2.6.3	Exatidão	42
3.2.6.4	Precisão	42
3.2.6.5	Robustez	43
3.2.6.6	Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD)	43
3.2.7	Avaliação da atividade leishmanicida do NFOH livre e do sistema nanoestruturado contendo NFOH em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	44

3.2.8 Avaliação da citotoxicidade do NFOH livre, do sistema nanoestruturado contendo NFOH	46
3.2.9 Avaliação da atividade leishmanicida do NFOH livre e do sistema nanoestruturado contendo NFOH em macrófagos infectados por amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	47
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	50
4.1 Preparo e avaliação físico-química do sistema nanoestruturado polimérico contendo NFOH	51
4.1.1 Tamanho médio e índice de polidispersividade do sistema nanoestruturado polimérico	51
4.1.2 Potencial Zeta	53
4.1.3 Avaliação morfológica	54
4.1.4 Determinação da eficiência de encapsulação de NFOH	55
4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico de eficiência de encapsulação de nanopartículas de PBCA contendo hidroximetilnitrofural por CLAE	56
4.2.1 Especificidade	59
4.2.2 Linearidade e intervalo do método	61
4.2.3 Exatidão	63
4.2.4 Precisão	64
4.2.5 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)	65
4.2.6 Robustez	65
4.3 Avaliação da atividade leishmanicida do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	66
4.4 Avaliação da citotoxicidade do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH	73
4.5 Avaliação da atividade leishmanicida de NFOH, sistema nanoestruturado de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH em macrófagos infectados por amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	79
5 CONCLUSÃO	87
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	90
ANEXO A Durbin-Watson	I
ANEXO B Anderson-Darling	III
ANEXO C Teste de Bartlett	IV

ANEXO D Teste de Levene	V
ANEXO E ANOVA	VII
ANEXO F Tabela Durbin Watson	IX
ANEXO G Atividades Acadêmicas	X
ANEXO H Ficha do Aluno	XII
ANEXO I Instruções para banca julgadora	XV

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) compartilham várias características em comum, a mais marcante é que a população afetada é assolada pela pobreza. Essas doenças antigas são endêmicas na África, Ásia e Américas e estima-se que causam a morte de um milhão de pessoas anualmente; mais de um bilhão são afetados, dentre os 2,7 bilhões que vivem em condições de pobreza extrema (definido como aqueles que vivem com menos de US \$ 2,00 por dia). As DTN não só sobrevivem e espalham-se nessas condições, mas também podem exacerbar e perpetuar a pobreza das comunidades afetadas (OMS, 2010; GARG, 2011).

As DTN incluem ampla faixa de enfermidades causadas por patógenos individuais, por grupos ou condições relacionadas a alguma espécie de microrganismo. As principais estão descritas na Tabela 1 (OMS, 2010).

O Ministério da Saúde (2010), por meio de dados epidemiológicos, demográficos e o impacto da doença, definiu, entre essas doenças, sete prioridades de atuação que compõem o programa em DTN: a dengue, a doença de Chagas, a leishmaniose, a hanseníase, a malária, a esquistossomose e a tuberculose.

Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às DTN, o conhecimento produzido não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica nesse tema, justificado pelo reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países em desenvolvimento. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) De acordo com estudos realizados pelo Instituto George para a Saúde Internacional com apoio da Fundação Bill & Melinda Gates, apenas 9% dos recursos globais para pesquisa e desenvolvimento (P&D) na área de doenças negligenciadas são oriundos de instituições privadas, como as indústrias farmacêuticas. Quase todo o investimento nessa área vem de instituições filantrópicas (21%), e públicas (70%) e cerca de 80% de todo o investimento é voltado para a SIDA, tuberculose e Malária (POKHREL et al., 2011).

Tabela 1 – Doenças negligenciadas definidas pela Organização Mundial da Saúde (2010)

Principais Doenças Negligenciadas
Dengue
Raiva
Tracoma
Úlcera de Buruli
Treponematoses endêmicas
Lepra
Doenças de Chagas
Doença do sono
Leishmanioses
Cisticercoses
Dracunculíase
Equinococose
Infecções por trematódeos transmitidas por alimentos
Filaríase linfática
Oncocercose
Esquistossomose
Transmissíveis pelo solo (helminthíases intestinais, vermes parasitos)

1.2 Leishmaniose

No fim do século XIX, Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna identificaram independentemente o parasito causador da leishmaniose. Ronald Ross foi quem atribuiu o nome genérico de *Leishmania*. Cathoire e Laveram encontraram o parasito em crianças com anemia esplênica infantil e Nicolle nomeou o parasito como *Leishmania infantum*. Em 1908 esse pesquisador identificou como reservatório da doença alguns cães na cidade de Tunis. No Brasil, Carino identificou *Leishmania* em lesões de mucosa em pacientes em 1912. Em 1914, os russos Yakimoff e Shakor identificaram formas rurais de

leishmaniose cutânea na Ásia Central. Quase uma década após, em 1922, Bramachari descreveu a leishmaniose cutânea pós Kalazar. Nos anos 40 Swaminath, Shortt e Anderson na Índia e Ber na Palestina demonstraram a transmissão de *L. donovani* e *L. major* por flebotomídeos. Aos poucos, as características clínicas e geográficas da doença humana foram complementadas por estudos de reservatórios animais e vetores, pelo comportamento da *Leishmania* em animais experimentais e pela ecologia dos ciclos naturais da doença, fortalecendo então a base para a classificação e para a compreensão da transmissão para os seres humanos (OMS, 2010).

A leishmaniose é classificada como uma das "doenças mais negligenciadas", com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento e controle, e sua forte associação com a pobreza. A leishmaniose está em segundo lugar em mortalidade e quarto em morbidade entre as doenças tropicais (BERN et al., 2008).

1.2.1 Agente etiológico

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada (promastigota) (Figura 1a), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada intracelular (amastigota) (Figura 1b) (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2006).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros com base no seu desenvolvimento no vetor. O subgênero *Leishmania* cresce apenas na parte anterior do piloro, na junção do intestino médio e intestino grosso (desenvolvimento suprapilórico). O subgênero *Viannia* cresce em todo o intestino médio e grosso (desenvolvimento peripilórico). Os vários tipos de leishmaniose são causados por diferentes espécies de parasito e cada uma determina as características da doença (OMS, 2010).

Figura 1 – Formas promastigota (a) e amastigota intracelular; (b) de *Leishmania* (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006)

1.2.2 Vetores

Os insetos denominados flebotomídeos, os vetores das leishmanioses, são também conhecidos popularmente por mosquito palha, birigui e tatuquira. As espécies responsáveis pela transmissão da leishmaniose visceral no Brasil são *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* e das principais responsáveis pela leishmaniose cutânea são as *Lu. Flaviscutellata* (vetor da *L. amazonensis*), *Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia*, *Lu. Carrerae*, *Psychodopygus wellcomei* (vetores da *L. brasiliensis*), *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* (vetores da *L. guyanensis*). (BASANO et al., 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os insetos (Figura 2) possuem o corpo revestido de pelos de coloração clara e medem de 1 a 3 mm de comprimento. Estes insetos na fase adulta estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se apenas em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e as fêmeas alimentam-se de sangue para o desenvolvimento dos ovos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Figura 2 – Mosquito palha, principal vetor de leishmaniose (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006)

1.2.3 Reservatórios

Na leishmaniose visceral os principais reservatórios são os cães (*Canis familiaris*) (Figura 3A), estes animais são a principal fonte de infecção, a doença é mais prevalente nesses que no homem. As raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) (Figura 3B) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Figura 3C) também são reservatórios importantes.

Os principais reservatórios de leishmaniose cutânea são os roedores (*Proechimys sp*, *Oryzomys sp.*, *Neacomys sp.*, *Nectomys sp*, entre outros) (Figura 3D), marsupiais (*Metachirus sp.*, *Philander sp.*, *Didelphis sp.* e *Marmosa sp.*) e raposas (*Cerdocyon thous*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Figura 3 – Animais reservatórios da leishmaniose. (A) Cão doméstico; (B) Raposa; (C) Marsupiais; (D) Roedores (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006)

1.2.4 Ciclo de transmissão

O ciclo de transmissão da leishmaniose (Figura 4) se inicia quando as fêmeas do vetor sugam a forma amastigota presente em monócitos do sangue de mamíferos infectados, há então o rompimento destas células e liberação dos parasitos no trato digestivo do inseto. Após essa fase o parasito se multiplica por divisão binária e dá origem a forma promastigota (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As promastigotas diferenciam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, nestes locais o parasito se desenvolve e dá origem a forma infectante denominada promastigota metacíclica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As fêmeas infectadas ao realizarem um novo repasto sanguíneo, em hospedeiro vertebrado, liberam as promastigotas metacíclicas na epiderme do hospedeiro, os parasitos são então fagocitados por células do sistema fagocitário mononuclear (SFM). No interior dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação dos parasitos que serão fagocitados por novos macrófagos num processo contínuo. Na leishmaniose visceral, ocorre a disseminação para outros tecidos ricos em células do

SFM, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Figura 4 – Ciclo de transmissão da leishmaniose (Modificado de KAYE, SCOTT, 2011)

1.2.5 Epidemiologia

A doença em humanos é relativamente concentrada em algumas regiões do mundo, 90% dos casos de leishmaniose visceral (LV) ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil, enquanto 90% da leishmaniose cutânea (LC) ocorre no Afeganistão, Argélia, Irã, Arábia Saudita, Síria, Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia. A distribuição é dinâmica: Colômbia e Etiópia aderiram recentemente a essa lista, e atualmente há uma grande epidemia de LC no Baluchistão e Sindh (BERN et al., 2008).

Segundo o Ministério da Saúde (2010), em 20 estados brasileiros foram detectados casos autóctones de leishmaniose visceral, mesmo sendo a região mais afetada, o Nordeste que tem registrado queda histórica, passou de 4.029 (83%) casos confirmados em 2000 para 1.739 (17%) em 2008. Nas outras regiões o número de casos tem aumentado gradativamente de 829 (17%) em 2000 para 1.863 (48%) em 2008, eventos que podem ser visualizados na Figura 5.

Fonte: Sinan/SVS/MS.

Figura 5 – Distribuição dos casos de leishmaniose visceral nas regiões brasileiras de 2000 a 2008 (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010)

A letalidade da LV aumentou de 155 em 4858 casos (3,2%) em 2000, para 216 em 3852 casos (5,6%), em 2008 (Figura 6):

Fonte: Sinan/SVS/MS.

Figura 6 – Letalidade da leishmaniose visceral entre os anos de 2000 e 2008 (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010)

Em 2008 o número de casos de leishmaniose visceral foi de 3.852, dentre eles 136 apresentavam coinfeção leishmaniose/HIV. Entre os coinfectados, 100 eram do sexo masculino (73,5%) entre 20 e 49 anos. O número de casos registrados foi maior nas cidades de Campo Grande/MS com 12 coinfectados (8,6%), Fortaleza/CE com 10 coinfectados (7,4%) e Belo Horizonte/MG com nove casos (6,6%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Entre os anos de 2000 e 2008, 238.743 casos de leishmaniose cutânea foram registrados, com média de 26.528 de novos infectados ao ano. Em 2000 o coeficiente de detecção foi de 20,3 casos por 100 mil habitantes e em 2008 foi de 10,5 casos por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No mesmo período (2000-2008), a distribuição da leishmaniose cutânea entre as regiões do país foram de 94.169 (39,4%) casos na região Norte, 75.657 (31,7%) no Nordeste, 37.853 (15,9%) casos no Centro-Oeste, 22.903 (9,6%) no Sudeste e 6.161 (2,6%) na região Sul (Figura 7) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 7 – Distribuição da leishmaniose cutânea nas regiões brasileiras de 2000 a 2008 (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010)

1.2.6 Manifestações clínicas

As leishmanioses são caracterizadas pela sua diversidade e complexidade, são transmitidas ao homem por mais de 20 espécies de parasito e por aproximadamente 30 diferentes tipos de vetores flebotomídeos (CHAPPUIS et al.,

2007). As leishmanioses podem ser divididas em duas principais formas clínicas, de acordo com a espécie do parasito transmitido (Tabela 2): leishmaniose visceral (ou Kalazar) e cutânea. A evolução e a resolução de cada uma são determinadas também pelas interações parasito/sistema imune do indivíduo afetado.

Tabela 2 – Principais cepas e manifestações clínicas da leishmaniose no Velho e Novo mundo (OMS, 2010)

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. brasiliensis</i>	<i>L. brasiliensis</i>
Mundo		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guayanensis</i>	<i>L.</i>
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>panamensis</i>
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombensis</i>	
Principal Tropismo	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

1.2.6.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica e fatal se não tratada e pode ser caracterizada como doença endêmica, esporádica ou epidêmica, com diferentes

características clínicas em cada situação. Em áreas endêmicas, tende a ser relativamente crônica e as crianças são especialmente afetadas. Até recentemente, a faixa etária de 1 a 4 anos foi a mais acometida pela leishmaniose visceral causada por *L. infantum* no Norte da África e Ásia Ocidental e Central, porém desde a emergência de infecções pelo HIV, o aumento do uso de imunossupressão para o transplante e quimioterapia, metade dos casos na Europa afetam adultos. Em áreas endêmicas da África Oriental e Índia, a maior incidência é em crianças e adultos jovens (OMS, 2006).

Durante o curso da doença podemos verificar a presença de três fases didaticamente descritas a seguir, segundo o Ministério da Saúde:

Período inicial: A sintomatologia pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneomucosa e hepatoesplenomegalia. Frequentemente, esses pacientes apresentam-se ao serviço médico fazendo uso de antimicrobianos sem resposta clínica e muitas vezes com história de tosse e diarreia. Esta apresentação clínica pode ser facilmente confundida com outros processos infecciosos de natureza benigna, principalmente em regiões endêmicas, onde os pacientes apresentam sintomatologia clínica mais discreta, com febre baixa, palidez cutâneomucosa leve, diarreia e/ou tosse não produtiva e pequena hepatoesplenomegalia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Período de estado: Caracteriza-se por um quadro clínico mais lento, com mais de dois meses de evolução, os pacientes apresentam normalmente febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneomucosa e aumento da hepatoesplenomegalia e na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral e está ilustrado na Figura 8 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Figura 8 – Paciente em período de estado da leishmaniose visceral (Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006)

Período final: Quando não há tratamento, a doença tende a se agravar, instalam-se então sintomas de desnutrição, febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.2.6.2 Leishmaniose cutânea

A LC é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente. A leishmaniose cutânea (LC) é um problema de saúde pública mundial e principalmente em países em desenvolvimento, apesar de não letal, a doença compromete a fisiologia, vida social e capacidade de trabalho dos afetados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O espectro clínico da leishmaniose tegumentar é amplo e pode imitar a de outras doenças de pele, como a infecção estafilocócica ou estreptocócica, úlcera micobacteriana, lepra, infecção fúngica, cancro, sarcoidose, entre outras. Como a apresentação clínica da leishmaniose tegumentar carece especificidade e o tratamento é caro e tóxico o diagnóstico diferencial é necessário para se definir a conduta farmacológica (OMS, 2006).

As características clínicas da leishmaniose cutânea tendem a variar intra e inter-regiões, refletindo diferentes espécies de parasitos, ciclo zoonótico e fatores imunológicos. A lesão mais comum começa com uma pápula no local da inoculação, ela cresce normalmente durante uma semana e atinge seu tamanho final de até 5 cm de diâmetro com uma borda elevada e endurecimento circundante variável, de resolução gradual ao longo de meses ou anos, deixando uma cicatriz deprimida com pigmentação alterada (OMS, 2010).

L. infantum é a causa mais frequente de leishmaniose cutânea no sul da Europa. As lesões são nódulos individuais, com pouca inflamação, embora úlceras também possam ocorrer. Na ausência de imunossupressão ou história prévia de leishmaniose visceral, as lesões curam espontaneamente dentro de cerca de um ano e parece conferir imunidade (OMS, 2006).

Leishmania tropica afeta principalmente a Grécia e produz lesões indolores, frequentemente múltiplas, que geralmente se curam espontaneamente dentro de cerca de um ano, muitas vezes levando a cicatrizes desfigurantes. O período de incubação é geralmente 2-8 meses (OMS, 2006).

No caso da Leishmaniose cutânea causada por *L. major*, essa produz lesões mais simples e indolores, mas muitas vezes gravemente inflamadas e ulceradas e curam-se dentro de 2-8 meses. Frequentemente, elas são múltiplas, tornando-se confluentes e secundariamente infectadas. Tais lesões tem cura muito lenta e podem causar grande desfiguração devido às cicatrizes. O período de incubação é de até quatro meses (OMS, 2006).

Quanto à Leishmaniose cutânea causada por *L. aethiopica*, essa, normalmente dá origem a lesões cutâneas nodulares localizadas e menos frequentemente à leishmaniose oronasal, condição que pode levar a distorções nas narinas e nos lábios. A maioria delas evolui lentamente e podem se espalhar localmente. A ulceração é lenta ou ausente e cura espontânea ocorre tipicamente dentro de 2-5 anos (OMS, 2006).

Na América, uma vasta gama de manifestações clínicas é causada por múltiplas e filogeneticamente espécies distintas de *Leishmania*. Embora algumas sejam mais frequentemente associadas a uma espécie particular ou subgênero, nenhuma é única para uma espécie. Além disso, uma substancial, mas variável proporção das infecções é assintomática. As lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas geralmente originam no local da inoculação, como uma mácula

seguida por uma pápula que ulcera e se expande a uma lesão oval em forma de cratera ou evolui como uma lesão nodular. As lesões podem desenvolver em semanas, meses ou mesmo anos após infecção (OMS, 2006). Lesões primárias podem ser únicas ou múltiplas como as observadas na Figura 9.

Figura 9 – Lesões em pacientes portadores de leishmaniose cutânea (Fonte: FIOCRUZ, disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/>)

O envolvimento linfático manifesta-se como linfadenite ou linfadenopatia e é comum a lesões causada por espécies do subgênero *Viannia*. As lesões causadas por *L. mexicana* muitas vezes podem curar-se espontaneamente dentro de 3-4 meses, enquanto as lesões causadas pelo subgênero *Viannia* das espécies *L. brasiliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* podem sofrer remissão espontânea após seis meses. Lesões secundárias nas mucosas podem ocorrer e são mais associadas a *L. brasiliensis* e *L. panamensis*, mas podem resultar a partir de infecção por outras espécies (OMS, 2006).

1.2.7 Quimioterapia

Em 1912 os antimoniais trivalentes foram introduzidos por Vianna no tratamento da leishmaniose cutânea e mucocutânea no Brasil e, por Di Cristina, para a leishmaniose cutânea na Itália, em 1915. Bramachari, em 1922, introduziu ureia estibamina, o primeiro de uma série de antimoniais pentavalentes, considerados de maior segurança quando comparado aos antimoniais trivalentes. Esses últimos foram a base do tratamento de todas as formas de leishmaniose por muitos anos. Porém, a ausência de evidências clínicas com relação à sua eficácia além de sua elevada toxicidade, conduziu a regimes de tratamento inadequados. Na década de 1970, no Quênia, e 1980 em Bihar, na Índia, os pacientes com leishmaniose visceral começaram progressivamente a não responder ao tratamento e isolados de *Leishmania* mostraram resistência aos antimoniais. A necessidade de medicamentos mais seguros e mais eficazes exigiu busca por novos compostos. Novos medicamentos foram introduzidos como o primeiro registro de anfotericina B lipossomal em 1996, miltefosina em 2004 e paromomicina em 2006, para tratamento da leishmaniose visceral (OMS, 2010).

1.2.7.1 Principais medicamentos leishmanicidas em uso

O antimoniato de meglumina e o estibugluconato de sódio são os dois antimoniais pentavalentes disponíveis atualmente e podem ser administrados diretamente na lesão para o tratamento de leishmaniose cutânea. Os eventos adversos frequentes são anorexia, vômitos, náuseas, dor abdominal, mal-estar, mialgia, artralgia, cefaléia, gosto metálico e letargia. Alterações cardiológicas são dependentes da dose e da duração do tratamento, morte súbita pode ocorrer, mas raramente. Prolongamento do intervalo Q-T ($> 0,5$ s) sinaliza a provável ocorrência de arritmia cardíaca grave e fatal. O aumento da concentração de enzimas pancreáticas e hepáticas é comum, além disso, leucopenia e trombocitopenia também podem ser observadas. Os pacientes devem ser monitorados com exames de sangue total, soro e eletrocardiograma e se sérios eventos adversos surgirem (na maioria dos casos hepato ou cardiotoxicidade) o tratamento deve ser modificado (OMS, 2010).

Anfotericina B: é um antibiótico de poliênico e seus efeitos colaterais comuns são reações à infusão, incluindo febre mais grave, calafrios e, tromboflebite da veia utilizada na injeção. A interrupção do tratamento é frequente devido à nefrotoxicidade. Outros raros, mas graves efeitos tóxicos são hipocalcemia e miocardite. A boa hidratação e suplementação de potássio são importantes. O tratamento deve ser sempre hospitalar para permitir o monitoramento contínuo dos pacientes (OMS, 2010).

Formulações lipídicas de anfotericina B: várias formulações como complexo lipídico anfotericina B e dispersão coloidal anfotericina B, têm sido usados no tratamento. Eles são semelhantes à anfotericina B na sua eficácia, mas são significativamente menos tóxicos. Reações à infusão leves (febre, calafrios e rigor) e dores nas costas ocorrem em alguns pacientes. Nefrotoxicidade transitória ou trombocitopenia são vistos ocasionalmente (OMS, 2010).

Paromomicina, também conhecida como aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo, geralmente administrada por via intramuscular. Dor ligeira no local da injeção é o mais comum evento adverso (55%). Ototoxicidade reversível ocorre em 2% dos pacientes. A toxicidade renal é rara. Alguns pacientes ainda podem desenvolver hepatotoxicidade; tetania também tem sido relatada (OMS, 2010).

Isetionato de pentamidina: este fármaco é administrado por via intramuscular ou de preferência por infusão intravenosa. Efeitos adversos graves tais como diabetes mellitus grave, hipoglicemia, choque, miocardite e toxicidade renal limitam o seu uso (OMS, 2010).

A miltefosina foi originalmente desenvolvida como um medicamento oral anticancerígeno, mas mostrou ter atividade leishmanicida. Os efeitos colaterais principais são náuseas, vômitos e diarreia, porém são transitórios e passam com o tratamento contínuo. Devido à ação teratogênica não deve ser usado por mulheres grávidas ou em idade fértil (OMS, 2010).

1.3 Hidroximetinitrofural: fármaco derivado nitrofurânico de atividade leishmanicida e tripanomicida.

1.3.1 Compostos contendo o grupo nitro e sua aplicação no tratamento da leishmaniose e doença de Chagas

Uma variedade de compostos com atividade farmacológica possui o grupo nitro, os exemplos mais comuns são: furazolidona, metronidazol, secnidazol, tinidazol, cloranfenicol, nitrofurantoína, nitrofural (NF); oxamniquina, benznidazol, nifurtimox. Os primeiros compostos nitroheterocíclicos utilizados na quimioterapia foram os nitrofuranos, o nitrofural, a furazolidona e a nitrofurantoína, que foram utilizados no tratamento de vários tipos de infecções bacterianas por mais de 50 anos e o nifurtimox, um derivado do nitrofural, que é utilizado no tratamento da tripanossomíase e leishmaniose (BOSQUESI et al., 2008).

O nitrofural (NF) é primariamente um agente antimicrobiano ativo contra microrganismos Gram-positivos e têm mostrado ação tripanomicida e leishmanicida por produzir inativação irreversível da tripanotiona redutase (TR) que é responsável pela remoção de peróxidos e a manutenção do nível de tiol intracelular. A tripanotiona ditiol T(SH₂) (Figura 10) é doadora de equivalentes redutores para a síntese de precursores de DNA, responsável pela homeostasia do ascorbato e pela detoxificação de peróxidos de hidrogênio (PITA et al., 2011).

O grupamento nitro na molécula do nitrofural é responsável pela ação farmacológica, entretanto provoca também toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade; durante o metabolismo do fármaco são produzidas espécies eletrofílicas reativas que podem alterar e danificar o DNA (Figura 11), logo seu uso é restrito a formulações tópicas (BOSQUESI et al., 2008).

Figura 10 – Reação de redução catalisada pela enzima tripanotiona redutase (TR) (Fonte: PITA et al., 2011)

Figura 11 – Mecanismo proposto do dano no DNA e carcinogênese do nitrofurantoin (Adaptado de: HIRAKU et al., 2004)

1.3.2 Modificação molecular

Com o objetivo de introduzir novos compostos com propriedades modificadas, diferentes estratégias têm sido empregadas, dentre elas está a modificação molecular, que consiste em partir de uma substância química com atividade biológica reconhecida, denominada de protótipo, sintetizar e testar seus congêneres, homólogos e análogos estruturais, buscando obter princípios ativos mais potentes, com menos efeitos colaterais, com maior especificidade ou com melhores propriedades farmacocinéticas e organolépticas (MELLO, 2006).

A latenciação é uma categoria de modificação molecular em que há a transformação do fármaco em outra espécie que, mediante reação química ou enzimática *in vivo*, libera a porção ativa no local de ação ou próxima a ela. Chung (1996), utilizando essa ferramenta, obteve o hidroximetilnitrofural a partir do nitrofural, que se mostrou mais ativo e menos tóxico que seu protótipo, a estrutura dos dois compostos está apresentada na Figura 12.

Figura 12 – Estrutura do nitrofural (NF) e seu produto após a modificação molecular (NFOH)

1.3.3 Hidroximetilnitrofural

Guido e seus colaboradores (2001) avaliaram a mutagenicidade do hidroximetilnitrofural empregando o teste de Ames em linhagens de *Salmonella typhimurium*. Os resultados mostraram que o processo de latenciação diminuiu em quatro vezes a atividade mutagênica do composto, quando comparado ao nitrofural (NF).

Bosquesi e colaboradores (2008) realizaram teste de toxicidade aguda em camundongos e ratos, obtiveram dose letal mediana (DL₅₀) maior em relação ao fármaco de partida. Os resultados caracterizaram o NFOH como pouco tóxico, segundo a OMS com um valor de DL₅₀ acima de 2000mg/kg quando testado em ratos. Em teste de micronúcleo, que permite identificar aumento de mutação, a frequência de células micronucleadas nos animais tratados com NFOH foi quatro vezes menor que nos animais tratados com NF.

1.4 Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de medicamentos

1.4.1 Considerações gerais relativas à nanotecnologia

O físico Richard Phillips Feynman (1918-1988) apresentou as ideias e os conceitos que fundamentam a nanociência e a nanotecnologia em uma reunião da Sociedade Americana de Física, no Instituto de Tecnologia da Califórnia, em 29 de dezembro de 1959, muito antes de o termo nanotecnologia ser utilizado. Em sua palestra intitulada “Há muito espaço lá em baixo”, Feynman descreveu um processo no qual os cientistas seriam capazes de manipular e controlar átomos individuais e moléculas (HUNT, 2004; WOLF, 2003). O termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez em 1974 por Norio Taniguchi. Esse cientista japonês definiu nanotecnologia como o processo de separação, de consolidação e de deformação dos materiais em nível atômico ou molecular (TANIGUCHI, 1974 *apud* HUNT, 2004).

A FDA, (2011) define nanotecnologia como o processo para a obtenção, o controle, a fabricação e/ou a manipulação intencional de materiais que têm pelo menos uma dimensão entre 1 a 100 nm, apesar desta restrição de tamanho, comumente refere-se a estruturas de até várias centenas de nanômetros (FAROKHZAD e LANGER, 2009). Além disso, o material na escala nanométrica tem que demonstrar propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam aplicação inovadora desse material. Essas propriedades inovadoras devem ser atribuídas exclusivamente a sua dimensão nanométrica. No caso de material constituído por partículas maiores que 100 e menores que 1000 nm, porém com característica inovadora, esse será considerado material obtido por nanotecnologia (FDA, 2011).

Com relação às propriedades inovadoras, essas podem ser alcançadas em função das seguintes características dos materiais em escala nanométrica: as forças gravitacionais tornam-se negligenciáveis e, portanto, as forças eletromagnéticas são dominantes (exemplo: Força de Van der Waals, interações eletromagnéticas fracas); o movimento das nanopartículas pode ser descrito pela mecânica quântica, enquanto que para as partículas em dimensão convencional, essa característica pode ser descrita pela mecânica clássica; maior razão entre o volume e a superfície; e o movimento aleatório das nanopartículas (movimento browniano) torna-se mais importante quando comparado ao movimento aleatório de partículas convencionais (WOLF, 2003).

Com o uso das nanopartículas em sistemas de liberação é possível melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, prolongar a meia-vida sistêmica por meio da redução de imunogenicidade, liberar o fármaco de forma modificada (diminuindo a frequência de administração), liberar o fármaco no local específico para minimizar os efeitos secundários sistêmicos, associar dois ou mais fármacos para gerar efeito sinérgico e suprimir a resistência a esses, quando utilizados isoladamente.

Para aplicações de diagnóstico, as nanopartículas permitem a detecção de estruturas na escala molecular: elas ajudam a identificar anormalidades tais como fragmentos de vírus, células pré-cancerosas e marcadores de doenças que não podem ser detectados com diagnósticos tradicionais. Baseado em nanopartículas os agentes de contraste de imagem também tem demonstrado melhorar a sensibilidade e a especificidade da ressonância magnética (ZHANG et al., 2008).

1.4.2 Nanopartículas poliméricas com aplicação terapêutica: visão geral

Os principais polímeros naturais e sintéticos utilizados são: gelatina, quitosana, poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), copolímero de ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli alquil cianoacrilato (PACA), polimetacrilato de metila (PMMA), e poli (n-Butil cianoacrilato) (PBCA). O polietileno glicol (PEG) pode ser ligado de forma covalente à superfície de nanopartículas para formar revestimento polimérico com a finalidade de reduzir a imunogenicidade e limitar a fagocitose de nanopartículas pelo sistema fagocitário mononuclear, resultando em níveis sanguíneos elevados de fármaco em órgãos tais como o cérebro, os intestinos, e os rins (FARAJI e WIPF, 2009).

O uso de nanopartículas poliméricas biodegradáveis como carreadores para sistemas de liberação modificada de fármacos têm se destacado devido ao aumento da biodisponibilidade. Esses sistemas exibem potencial uso pela modificação da superfície por meio de transformações químicas. Esses também podem fornecer adequado controle farmacocinético e podem ser utilizados para o encapsulamento de vasta gama de agentes terapêuticos (FARAJI e WIPF, 2009).

A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou nanopartículas poliméricas biodegradáveis, tais como PLA e PLGA, para uso humano e tem sido também usados na terapia genética em células de câncer de mama, resultando em efeitos antiproliferativos. A matriz de polímero evita a degradação do fármaco e pode proporcionar liberação modificada a partir dessas nanopartículas. Variando a razão fármaco/polímero ou composição do polímero pode-se modificar a extensão e grau de liberação do fármaco (FARAJI e WIPF, 2009).

O termo nanopartícula é definido pela *British Standards Institution* (2011) como um objeto com as três dimensões em escala nanométrica e é uma denominação geral aplicada à nanocápsulas e à nanoesferas (Figura 13). A primeira consiste de sistemas vesiculares formados normalmente por núcleo aquoso ou oleoso envolvido por revestimento polimérico, onde o fármaco pode estar distribuído no núcleo ou adsorvido na superfície. As nanoesferas são compostas por polímero formando uma matriz contínua e o fármaco pode se distribuir assim como nas nanocápsulas. O que determina a formação de um ou outro tipo de nanopartícula e a disposição do fármaco são sua composição (tipo de polímero, proporção dos

excipientes, etc.) e seu método de produção (SOPPIMATH, 2001. RAO E GECKELER, 2011).

Entre as nanopartículas poliméricas, nos últimos 5 anos, destaca-se o uso daquelas obtidas via polimerização em meio aquoso, empregando n-butil cianoacrilato (PBCA) (NICOLAS e COUVREUR, 2009).

Figura 13 – Distribuição do fármaco em nanocápsulas e nanoesferas

1.4.3 Nanopartículas de poli (n-butil cianoacrilato): aplicação terapêutica e mecanismos de polimerização

Utilizado há mais de 25 anos no campo da farmacologia, carreadores de fármacos de PACA demonstraram resultados significativos em numerosas patologias como câncer, infecções graves (virais, bacteriológicas, parasitárias), bem como várias doenças metabólicas e autoimunes (NICOLAS e COUVREUR, 2009).

Mulik e colaboradores (2010) investigaram a aplicação de nanopartículas de PBCA contendo curcumina conjugadas a apolipoproteína E3 contra a proteína beta amiloide envolvida na patologia do mal de Alzheimer, o resultado desse estudo mostrou um aumento significativo na eficácia terapêutica se comparado a curcumina livre em células de neuroblastoma.

Para o tratamento do câncer Ren e colaboradores (2011) testaram uma formulação de nanopartículas de PBCA contendo Paclitaxel. Os resultados mostraram que com o uso das nanopartículas, o efeito farmacológico se manteve, revertendo o efeito de resistência de células de câncer de ovário ao fármaco livre. Yordanov e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas de PBCA contendo etoposídeo, fármaco utilizado para o tratamento do câncer. As nanopartículas de PBCA recobertas por polisorbato 80 apresentaram 19% maior atividade contra células de adenocarcinoma, quando comparados ao fármaco livre.

A aceitabilidade de polímeros sintéticos no desenvolvimento de nanopartículas depende da sua degradação pelos sistemas biológicos. A interação do polímero com o conteúdo lisossomal é de extrema importância para assegurar a liberação do fármaco e evitar a acumulação do material no organismo, o que pode conduzir a efeitos tóxicos. Isso explica a ampla utilização do PLA e PBCA. Cadeias de PLGA são degradadas através de um mecanismo hidrolítico facilitada por baixo pH, enquanto que o PBCA é degradado intracelularmente, isto é, os grupos alquil são hidrolisados por esterases, o que aumenta a hidrofilicidade da cadeia de polímero até que se torne totalmente solúvel em água (HILLAIREAU E COUVREUR, 2009).

Nanopartículas de PBCA podem ser sintetizadas de acordo com três tipos distintos de polimerização: (A) aniônica, (B) zwitteriônica e (C) por radical (Figura 14) a partir de monômeros de n-butil-2-cianoacrilato (NBCA), composto utilizado como adesivo de tecidos biológicos e que tem sido aplicado clinicamente na oclusão de incisões cirúrgicas e para embolizar malformações arteriovenosas cerebrais (LIN et al., 2012, YORDANOV, 2012).

Figura 14 – Passos de iniciação e propagação da polimerização de mômoros de PACA (a) aniônica iniciado por base (B^-); (b) zwitteriônica iniciado por nucleófilo (Nu) e (c) radical ($P^\bullet$) (Fonte: NICOLAS E COUVREUR, 2009.)

Couvreur desenvolveu pela primeira vez em 1979 um processo para gerar diretamente nanopartículas cobertas por uma camada de dextran, a partir de etil ou butil cianoacrilatos, empregando uma solução de HCl, a qual o monômero é adicionado gota a gota, desde então, diversos estudos descrevem a preparação de nanopartículas de poli alquilcianoacrilato revestidas de polissacarídeo tais como os métodos de adsorção direta de polissacarídeos anfífilicos em nanopartículas poliméricas pré-formadas, formação de emulsão seguida por evaporação do solvente, nanoprecipitação e mais recentemente por miniemulsão por radical. (WU et al., 2009).

Tem sido demonstrado que as propriedades de superfície são um fator chave na modulação e biodistribuição dos sistemas nanoestruturados. Por essa razão as nanopartículas de PBCA são bastante versáteis pois é possível modificar suas propriedades aplicando revestimentos de diversos compostos, como polietilenoglicol, quitosana, pectina e ácido hialurônico. Mulik e colaboradores (2010) utilizaram a

apoproteína E3 para prover fotoestabilidade e aumentar a captação das células do sistema nervoso central, He e colaboradores (2009) utilizaram o ácido hialurônico (AH) para direcionar as nanopartículas para células cancerosas, pois os receptores CD44 que se ligam ao AH estão superexpressadas neste tipo de célula, Kamal Al-Hallak e colaboradores (2010) desenvolveram nanopartículas de PBCA inaláveis para tratar doenças pulmonares e utilizaram o revestimento de polisorbato 80 para evitar a captação e eliminação de nanopartículas por macrófagos dos pulmões.

1.4.4 Potencial terapêutico de sistemas nanoestruturados poliméricos na liberação específica em macrófagos

Idealmente os fármacos devem ser liberados próximos ao local de ação de maneira a reduzir os efeitos sistêmicos e principalmente porque a maioria dos fármacos age em receptores intracelulares ou diretamente nos tecidos. Outra dificuldade é a existência de sistemas que limitam a entrada do fármaco na célula, reduzem a concentração citosólica por ação de mecanismos de eliminação ou degradação. Para contornar tais problemas, as nanopartículas podem ser utilizadas. Essas são capazes de proteger o fármaco e atuam como reservatório intracelular do fármaco. (FARAJI e WIPF, 2009).

Os macrófagos são predominantemente envolvidos na depuração da corrente sanguínea e degradação das nanopartículas. *In vitro*, a captação de nanopartículas por macrófagos J-744 ocorreu por meio de processo de endocitose e as partículas se localizaram no compartimento lisossomal. (CHELLAT et al., 2005) Considerando tal característica, a utilização de nanopartículas em sistemas de liberação modificada direcionada a macrófagos é particularmente atraente, especialmente no caso de tratamento de doenças em que os macrófagos atuam como células hospedeiras para parasitos e bactérias, como a leishmaniose.

Os parasitos causadores da leishmaniose se localizam nos vacúolos lisossomais de macrófagos reticuloendoteliais (células do SFM), fator que dificulta o acesso dos ativos leishmanicidas. Esse fato motivou vários grupos de pesquisadores desenvolverem nanocarreadores para a liberação do fármaco diretamente nos

macrófagos, de modo a aumentar a sua biodisponibilidade. Além disso, o encapsulamento dos fármacos com ação leishmanicida é adequado para minimizar os seus efeitos adversos. Por exemplo, as consequências do uso de anfotericina B referem-se à indução de mediadores inflamatórios, tais como IL-1 e TNF- α , em humanos e células mononucleares de murino. Quando associado às nanoesferas de poli-(ϵ)-caprolactona estabilizadas com poloxâmero 188, a anfotericina B não só mostrou melhoria da sua eficácia, mas também efeito inibidor sobre a IL-1 e TNF- α e redução da produção de citocinas em macrófagos peritoneais de rato. Além disso, a quercetina nanoencapsulada demonstrou reduzir a carga parasitária no baço, bem como reduzir hepatotoxicidade e toxicidade renal (CHELLAT et al., 2005)

Nanopartículas de PLA também foram usadas contra *Leishmania donovani*, após a associação com primaquina. As nanopartículas carregadas com o fármaco exibiram eficácia 3,3 vezes superior, quando comparada à forma livre e adicionalmente resultou em toxicidade reduzida. Ausência de toxicidade sistêmica foi observada para 600 mg/kg de nanopartículas de PLA contendo total de 30 mg de primaquina, após injeção intravenosa em ratos BALB/c. A mesma dose do fármaco livre resultou em perda de peso de 15% dos animais (RODRIGUES et al, 1994 apud CHELLAT et al., 2005). Nanopartículas de polisoexilcianoacrilato (PIHCA) também foram utilizadas *in vitro* para liberação de primaquina em macrófagos. Neste caso, a atividade do fármaco leishmanicida associado à nanopartícula exibiu aumento de 21 vezes na DE₅₀ (CHELLAT et al., 2005).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo a obtenção e a caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas contendo hidroximetilnitrofural e a avaliação da atividade leishmanicida potencial *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Preparação das nanopartículas poliméricas contendo hidroximetilnitrofural e sua caracterização físico-química;
- Desenvolvimento e validação de método para a avaliação da eficiência de encapsulação do hidroximetilnitrofural associado às nanopartículas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliação da citotoxicidade do hidroximetilnitrofural livre e nanoestruturado;
- Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material

3.1.1 Preparo das nanopartículas

3.1.1.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Água purificada;
- Monômero n-butil cianoacrilato – Histoacryl – Braun;
- Dextran – Sigma Aldrich;
- Hidroximetilnitrofural – LAPEN – Universidade de São Paulo;
- Hidróxido de sódio – Synth;
- Ácido Clorídrico – Synth.

3.1.1.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Agitador magnético microprocessado – IKA;
- Balança analítica – Mettler Toledo;
- Barra magnética recoberta com vidro – Pyrex;
- Pipeta 0,1 mL – Eppendorf;
- Analisador de tamanho de partículas, potencial zeta e índice de polidispersividade – Malvern;
- Papel filtro quantitativo – Macherey Nagel.

3.1.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para avaliação da eficiência de encapsulação por CLAE

3.1.2.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Água ultrapurificada – sistema Milli-Q – Millipore;
- Acetonitrila grau CLAE – Merck;
- Hidroximetilnitrofural – LAPEN – Universidade de São Paulo;
- Nitrofural – LAPEN – Universidade de São Paulo.

3.1.2.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Alliance Waters®;
- *Software* Empower® 3;
- Detectores UV/VIS e DAD –Waters®;
- Microbalança analítica – XS3DU METTLER TOLEDO;
- Banho ultrassônico – Unique;
- Pipetador Handysptep – Brand.

3.1.3 Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis*

3.1.3.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Meio de cultura M199 – Sigma – Aldrich;
- Água purificada estéril;
- Hidroximetilnitrofural – LAPEN – Universidade de São Paulo;

- Sistema nanoestruturado contendo NFOH e isentas de fármaco;
- Laurilsulfato de sódio – Synth;
- Reagente MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) – Sigma – Aldrich;

3.1.3.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas de 10, 20, 100, 200 e 1000 µL – Eppendorf;
- Pipetas de 5, 10 e 25 mL;
- Frascos de cultura de 25 mL;
- Tubos falcon de 15 e 50 mL;
- Placas de cultura 96 poços – TPP;
- Formaldeído – Synth;
- Câmara de Neubauer espelhada *Improved*;
- Microscópio óptico – Olympus;
- Leitor de placa ELISA F instruments® Multiskan Modelo 347;
- Estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) 26°C;
- Minitab® versão 16.

3.1.4 Avaliação da citotoxicidade do hidroximetilnitrofural livre e nanoestruturado

3.1.4.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Meio de cultura RPMI 1640 – Merck;
- Sistema nanoestruturado contendo NFOH e isento de fármaco (placebo);
- Hidroximetilnitrofural – LAPEN – Universidade de São Paulo;
- Laurilsulfato de sódio – Synth;

- Corante biológico *Trypan Blue* – Invitrogen.

3.1.4.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas de 10, 20, 100, 200 e 1000 µL – Eppendorf;
- Pipetas de 5, 10 e 25 mL;
- Tubos falcon de 15 e 50 mL;
- Placas de cultura de 96 poços – TPP;
- Câmara de Neubauer espelhada *Improved*;
- Microscópio óptico – Olympus;
- Leitor de placa ELISA Finstruments® Multiskan Modelo 347;
- Minitab® versão 16.

3.1.5 Avaliação da atividade leishmanicida em macrófagos infectados por *L. amazonensis*

3.1.5.1 Matérias-primas, solventes e reagentes

- Meio de cultura RPMI 1640 completo – Merck;
- Sistema nanoestruturado contendo NFOH e isento de fármaco (placebo);
- Hidroximetilnitrofurais – LAPEN – Universidade de São Paulo;
- Lamínulas redondas 13 mm;
- Lâminas para microscopia;
- Corante Giemsa – Sigma-Aldrich;
- Frascos de cultura de 25 mL;
- Tubos falcon de 15 e 50 mL;
- Placas de cultura de 24 poços – TPP.

3.1.5.2 Aparelhos, equipamentos e acessórios

- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas de 10, 20, 100, 200 e 1000 μL – Eppendorf;
- Pipetas de 5, 10 e 25 mL;
- Câmara de Neubauer espelhado *Improved*;
- Microscópio óptico – Olympus;
- Estufa BOD 32°C e 5% de CO_2 ;
- Estufa BOD 37°C e 5% de CO_2 ;
- Minitab® versão 16.

3.2 Método

3.2.1 Preparo das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas conforme Sham e colaboradores (2004) e Tavares e colaboradores (2011). Foram transferidos 10 mL de ácido clorídrico 0,1 N pH 2,5 e adicionados 100 mg de dextran e 10 mg de NFOH, após a dispersão dos componentes, foram adicionados cuidadosamente 100 μL de monômero de n – butil cianoacrilato e o sistema foi mantido à agitação constante (800 rpm) em temperatura ambiente (25°C). Após 4 horas de agitação, a reação de polimerização foi interrompida pela adição de NaOH (0,1N) até pH 7,0 – 7,5. A dispersão obtida foi filtrada em papel de filtro quantitativo.

3.2.2 Tamanho médio de partícula e índice de polidispersividade

O diâmetro das partículas e seu índice de polidispersividade em suspensão foram determinados por espalhamento de luz dinâmica diluindo-se as amostras e observando-se a luz espalhada em ângulo de 90°, empregando equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram medidas em suspensão, imediatamente após a preparação.

3.2.3 Potencial zeta

O potencial zeta foi medido empregando equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água destilada estéril antes da medição visando à otimização da intensidade do sinal. Para cada amostra foram efetuadas dez medições.

3.2.4 Avaliação morfológica

A avaliação morfológica das nanopartículas foi realizada empregando a microscopia eletrônica de varredura modelo TM-3000 da Hitachi High Technologies, JP.

3.2.5 Desenvolvimento do método analítico para quantificação de NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA

O método inicial foi aquele descrito por Grillo e colaboradores (2008). Foram realizadas modificações nesse método proposto no que se refere ao comprimento

de onda e à proporção da fase móvel. O método modificado está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições cromatográficas para a avaliação da eficiência de encapsulação do NFOH em nanopartículas poliméricas de PBCA

Condições Cromatográficas	
Fase móvel	Água:acetonitrila (80:20)
Coluna	C18 250x4,6 mm 5 µm Hypersil Thermo
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura	25°C
Volume de injeção	20 µL

A quantidade de hidroximetilnitrofural foi calculada pela Equação 1:

$$\% = \frac{Aa \times mPd \times Pot \times dil\ am \times 100}{Apd \times dil\ Pd \times 1} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: Aa: área da amostra

Apd: área da média das injeções do padrão

mPd: massa do padrão

dil Pd: diluição do padrão

Pot: potência do padrão NFOH em decimal

dil am: diluição da amostra

1: concentração do NFOH na formulação em mg/mL

100: porcentagem %

3.2.5.1 Preparo das soluções

Solução padrão de NFOH: para o preparo da solução estoque, a quantidade de 5,0 mg de NFOH foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, na sequência, foram adicionados cerca de 30 mL de acetonitrila. O balão contendo a solução foi submetido ao banho ultrassônico por 10 minutos. Após a solubilização do fármaco completou-se o volume com acetonitrila. Para o preparo da solução padrão transferiu-se 5,0 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel (água ultrapurificada:acetonitrila 80:20). A solução foi submetida à filtração empregando membrana PVDF (fluoreto de polivilideno) tamanho de poro 0,45 µm.

Solução para a avaliação adequação do sistema: para a preparação solução estoque de NFOH foram transferidos quantitativamente 5,0 mg de NFOH padronizado para balão volumétrico de 50 mL, na sequência, foram adicionados cerca de 30 mL de acetonitrila. O balão volumétrico contendo a solução foi submetido ao banho ultrassônico por 10 minutos, após a solubilização do fármaco completou-se o volume com acetonitrila. Para a preparação da solução estoque de NF foram transferidos exatamente cerca de 2,0 mg de nitrofural para balão volumétrico de 100 mL, na sequência foi adicionada cerca de 70 mL de acetonitrila. O balão contendo a solução foi submetido ao banho ultrassônico por 10 minutos. Após a solubilização do fármaco completou-se o volume com acetonitrila. A solução para a avaliação da adequação do sistema foi preparada a partir das soluções estoque de NFOH e NF, foram transferidos exatamente 5,0 mL da solução de NFOH e 1,0 mL da solução de nitrofural para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel. Essa solução foi submetida à filtração empregando membrana PVDF (fluoreto de polivilideno) tamanho de poro 0,45 µm.

Solução-placebo: para a quantificação do fármaco foi preparada nanopartículas de PBCA isentas do fármaco (placebo) conforme item 3.2.1. A formulação foi centrifugada a 14.000 RPM por 60 minutos e o sobrenadante o foi avaliado utilizando CLAE. Para a quantificação total (fármaco encapsulado e não encapsulado), foi transferido 1 mL de placebo para balão volumétrico de 100 mL. Na sequência, foram adicionados cerca de 20 mL de acetonitrila e o balão volumétrico foi submetido ao banho ultrassônico por 10 minutos. Após esse período, completou-

se o volume com o mesmo solvente. Essa solução, denominada solução-placebo, foi filtrada empregando membrana PVDF (fluoreto de polivilideno) tamanho de poro 0,45 μm .

Solução-amostra: para a quantificação do NFOH livre, a formulação foi centrifugada a 14.000 RPM por 60 minutos e o sobrenadante avaliado empregando CLAE. Para a quantificação total, 1 mL de formulação foi transferido para balão volumétrico de 100 mL, na sequência, foram adicionados cerca de 20 mL de acetonitrila e o balão volumétrico foi submetido ao banho ultrassônico por 10 min. Após esse período, completou-se o volume com fase móvel. Após essa etapa a solução-amostra foi filtrada empregando membrana PVDF (fluoreto de polivilideno) tamanho de poro 0,45 μm .

3.2.6 Validação do método analítico de eficiência de encapsulação de nanopartículas de PBCA contendo hidroximetilnitrofural por CLAE

As características de desempenho para a validação do método analítico estão apresentadas na Tabela 4 (ICH Q2(R1), 2005).

A validação do método foi efetuada para a formulação total, assim como, para o sobrenadante. No primeiro caso buscou-se a quantificação total do fármaco (encapsulado e não encapsulado) e no sobrenadante foi quantificado o fármaco não encapsulado. Dessa forma, a eficiência de encapsulação foi determinada pela diferença entre a quantidade total do fármaco e a quantidade livre desse, no sobrenadante.

Tabela 4 – Características de desempenho para a validação do método analítico

Características de Desempenho	Quantificação
Especificidade	+
Linearidade	+
Exatidão	+
Intervalo	+
Precisão	
Repetibilidade	+
Intermediária	+
Robustez	+
Limite de Detecção	-
Limite de	-
Quantificação	

+ Características são normalmente avaliadas

- Características não aplicáveis

3.2.6.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada injetando as soluções preparadas de acordo com o item 3.2.5.1 incluindo também o diluente (fase móvel). Foram avaliadas as interferências das matérias-primas utilizadas na preparação das nanopartículas de PBCA e solventes. A análise foi realizada por meio de observação visual dos cromatogramas e pureza de pico do NFOH por meio do *software* Empower® 3, tal análise foi realizada para comprovar a eluição exclusiva do fármaco.

3.2.6.2 Linearidade e intervalo do método

Para a avaliação dessas figuras de mérito foram preparadas soluções de NFOH a 0,0010 mg/mL(10%), 0,0040 mg/mL(40%), 0,0080 mg/mL(80%), 0,010

mg/mL(100%), 0,012 mg/mL (120%) e 0,014mg/mL (140%), a partir da solução estoque da solução padrão de NFOH (item 3.2.5.1). Essas soluções foram analisadas pelo método de CLAE modificado conforme o item 3.2.5. Os resultados foram submetidos à análise estatística visando à determinação dos seguintes parâmetros: intercepto da reta, coeficiente angular, VIF (fator de inflação da variância), coeficientes de correlação(r) e determinação (r^2), teste de falta de ajuste, PRESS (soma dos quadrados dos erros de previsão), desvio padrão e estatística Durbin-Watson.

Para a determinação do intervalo do método estabeleceu-se a faixa de alcance do procedimento analítico entre os níveis superior e inferior da linearidade que demonstraram adequada precisão e exatidão.

3.2.6.3 Exatidão

A exatidão do método foi calculada considerando a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito. Foram utilizadas as concentrações de 0,001mg/mL (10%), 0,010 mg/mL(100%) e 0,014 mg/mL (140%) simuladas (solução do fármaco + placebo) a partir da solução estoque da solução padrão de NFOH (item 3.2.5.1), em triplicata, para cada concentração. A exatidão foi determinada matematicamente pela Equação 2:

$$E (\%) = \frac{\text{Valor mensurado}}{\text{Valor teórico}} \quad \text{Equação 2}$$

3.2.6.4 Precisão

A precisão por repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas para avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de

amostragem múltipla. Foram utilizadas amostras, em injeção única, preparadas conforme o item 3.2.5.1, em réplicas de 6. As duas modalidades de precisão foram determinadas pela Equação 3:

$$CV (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: CV = Coeficiente de variação

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada em porcentagem

3.2.6.5 Robustez

A robustez, a capacidade do método em resistir a pequenas variações aleatórias, foi avaliada utilizando as 6 amostras preparadas conforme item 3.2.6.4. As seguintes variações foram selecionadas: temperatura da coluna (20 e 30°C), fase móvel (75:25 e 85:15 água:acetoneitrila), fluxo (1,1 e 1,3 mL/min).

3.2.6.6 Limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD)

O LD e o LQ foram obtidos por meio de cálculos baseados na curva de calibração utilizando as Equações 4 e 5, respectivamente.

$$LD = \frac{3 \sigma}{CA} \quad \text{Equação 4}$$

$$LD = \frac{10 \sigma}{CA} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: LD = o limite de detecção estimado ($\mu\text{g/mL}$),
 σ = o desvio padrão médio obtido por meio da curva de calibração (item 3.2.6.2)
CA = coeficiente angular da curva de calibração.

3.2.7 Avaliação da atividade leishmanicida do NFOH livre e do sistema de nanoestruturado contendo NFOH em promastigotas de *L. amazonensis*

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5 difeniltetrazólio), como descrito por Reilly (1998). Nesse método, o MTT é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais. Forma-se no interior das células cristais de formazan, de coloração púrpura.

As promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas empregando meio M199 contendo sais de Hanks, suplementado com urina humana, em estufa BOD a 26°C, até atingirem o início da fase estacionária (aproximadamente 3 dias). Os parasitos foram transferidos para placas de cultura contendo 96 poços (1×10^6 viáveis por poço). Adicionaram-se para cada poço concentrações crescentes de placebo, fármaco livre e nanoestruturado. Após 72 horas de incubação a 26°C, foram adicionados 30 μL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi novamente incubada em estufa 37°C por 4 horas. Após esse período, 50 μL de laurilsulfato de sódio a 20% (p/v) foram transferidos para os poços com a finalidade de interromper a reação. A leitura foi imediatamente após esse procedimento, em leitor de placa de ELISA ($\lambda = 595 \text{ nm}$). O teste foi realizado em réplicas de 10, para cada concentração e tratamento (fármaco livre, sistema nanoestruturado contendo NFOH, placebo, meio de cultura contendo promastigotas e isentos de parasita como controles positivo e negativo, respectivamente) como descritos a seguir.

As concentrações de NFOH livre e do sistema nanoestruturado contendo NFOH foram calculadas em molaridade (mol/L) a partir da massa molecular do NFOH (226,146 g/mol) e a partir de soluções-estoque descritas a seguir.

Preparação das soluções estoque: para preparação solução-estoque de NFOH foram transferidos 5 mg do fármaco para balão volumétrico de 250 mL (concentração 0,02 mg/mL). Para obtenção de solução-estoque de nanopartículas foi transferido 1,0 mL do sistema nanoestruturado contendo NFOH para balão

volumétrico de 50 mL (concentração 0,02 mg/mL). Para a preparação da solução-estoque de placebo foi transferido 1,0 mL do sistema nanoestruturado isento de fármaco para balão volumétrico de 50 mL. As diluições subsequentes utilizadas estão apresentadas na Tabela 5 e o volume total de cada diluição foi distribuído em 10 poços.

Tabela 5 – Concentrações e diluições de NFOH, Nano-NFOH e placebo utilizadas no teste de atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis*

μM ($\mu\text{mol/L}$)	$\mu\text{g/mL}$	Volume solução- estoque (μL)	Volume meio de cultura (μL)	Volume meio de cultura contendo promastigotas (μL)
4	0,9046	90,46	909,54	1000
6	1,3569	135,69	864,31	1000
8	1,8092	180,92	819,08	1000
10	2,2615	226,15	773,85	1000
12	2,7138	271,38	728,62	1000

NFOH: hidroximetilnitrofuril livre; Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH; Placebo: nanopartículas isentas de NFOH

A porcentagem de sobrevivência foi calculada empregando a Equação 6. Para análise estatística dos resultados foram utilizados ANOVA (ANEXO E), teste de Anderson-Darling (ANEXO B), teste de Bartlett (ANEXO C), teste de Lavene (ANEXO D) e teste de Tukey.

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{(DO_{am} - DO_{cn})}{(DO_{cp} - DO_{cn})} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

onde: DO_{am} = densidade óptica da amostra
DO_{cp} = densidade óptica do controle positivo
DO_{cn} = densidade óptica do controle negativo

3.2.8 Avaliação da citotoxicidade do NFOH livre e do sistema nanoestruturado contendo NFOH

Para a realização desse teste foi utilizado o método descrito por Mossman (1983) modificado. Foram utilizados macrófagos de peritônio de camundongo fornecidos pelo banco de células do Laboratório Soroepidemiologia e Imunobiologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. A contagem do número de células viáveis foi efetuada empregando corante biológico *Trypan Blue*. Foram transferidas 4×10^5 células em cada um dos poços de placa contendo 96 poços. Adicionou-se para cada poço 50 μ L de concentrações crescentes de fármaco livre, placebo e do sistema nanoestruturado contendo NFOH, dispersos em meio RPMI 1640. Após 24 horas foram adicionados 20 μ L de solução de MTT (5mg/mL), e a placa foi incubada em estufa a 37°C por 4 horas. Após esse período, foram adicionados 100 μ L de laurilsulfato de sódio a 10% (p/v) com a finalidade de interromper a reação da formação do cristal de formazan. A leitura foi realizada em leitor de ELISA ($\lambda = 595$ nm) após período de 24 horas de adição do laurilsulfato de sódio. Neste teste foram utilizadas réplicas de 5 para cada tratamento e concentração e meio de cultura contendo macrófagos e isentos de células como controle positivo e negativo, respectivamente, a partir de soluções-estoque como descritas abaixo:

Preparação das soluções-estoque: para a preparação da solução estoque de NFOH foram transferidos 5 mg de fármaco para balão volumétrico de 250 mL (solução-estoque de concentração de 0,02 mg/mL). Para obtenção de solução estoque de nanopartículas foi transferido 1,0 mL do sistema nanoestruturado contendo NFOH para balão volumétrico de 50 mL (concentração 0,02 mg/mL). Para a preparação da solução estoque de placebo foi transferido 1,0 mL do sistema nanoestruturado isento de fármaco para balão volumétrico de 50 mL. As diluições subsequentes utilizadas estão apresentadas na Tabela 6 e o volume total de cada diluição foi distribuído em 5 poços.

Tabela 6 – Concentrações e diluições de NFOH, Nano-NFOH e placebo utilizados no teste de citotoxicidade

μM (μmol/L)	μg/mL	Volume estoque (μL)	Volume meio de cultura (μL)	Volume meio de cultura contendo macrófagos (μL)
5	1,1307	50,88	249,12	600
10	2,2615	101,76	198,24	600
15	3,3922	152,64	147,36	600
20	4,5229	203,52	96,48	600
25	5,6537	254,4	45,60	600

NFOH: hidroximetilnitrofuril livre; Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH; Placebo: nanopartículas isentas de NFOH

A porcentagem de sobrevivência foi calculada empregando a seguinte Equação 7. Para análise estatística dos resultados foram utilizados ANOVA (ANEXO E), teste de Anderson-Darling (ANEXO B), teste de Bartlett (ANEXO C) e teste de Lavene (ANEXO D).

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{(DO_{am} - DO_{cn})}{(DO_{cp} - DO_{cn})} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

onde: DO_{am} = densidade óptica da amostra
DO_{cp} = densidade óptica do controle positivo
DO_{cn} = densidade óptica do controle negativo

3.2.9 Avaliação da atividade leishmanicida do NFOH livre e do sistema nanoestruturado contendo NFOH em macrófagos infectados por amastigotas de *L. amazonensis*

O método de avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas utilizou macrófagos de peritônio de camundongos fornecidos pelo banco de células do Laboratório Soroepidemiologia e Imunologia Celular e Molecular do Instituto de

Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. Esses macrófagos foram infectados pelo parasito *L. amazonensis* da seguinte forma:

Os macrófagos foram suspensos em meio de cultura de tecidos RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado por calor, 100 UI/ml de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. A quantidade de 1 mL da suspensão de macrófagos (1×10^6 células) foi transferida para placas (24 poços) contendo lamínulas de 13 mm e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, os macrófagos foram infectados com a forma promastigota de *L. amazonensis* na proporção de cinco parasitos por célula e incubados em estufa em estufa a 32°C e 5% CO₂ por 4 h, imediatamente após esse período, os parasitos que não sofreram fagocitose, foram removidos por meio de lavagens vigorosas. As células infectadas foram cultivadas por mais 24 horas com adição de placebo, fármaco livre e sistema nanoestruturado contendo NFOH. Após a incubação, as células foram lavadas com meio RPMI 1640, fixadas nas lamínulas com metanol e coradas com Giemsa. A contagem do número de células infectadas e não infectadas, bem como a contagem do número de amastigotas por célula, foi efetuada visualmente (200 células por amostra) por exame microscópico das preparações coradas. O teste foi realizado em réplicas de 10 para cada tratamento a partir de soluções-estoque como descritas a seguir:

Preparo de soluções-estoque: para a preparação da solução-estoque de NFOH foram transferidos 5 mg de fármaco para balão volumétrico de 100 mL (concentração 0,1 mg/mL). Para obtenção de solução estoque de nanopartículas foram transferidos 5,0 mL do sistema nanoestruturado contendo NFOH para balão volumétrico de 50 mL (concentração de 0,1 mg/mL). Para a preparação da solução estoque de placebo foram transferidos 5,0 mL do sistema nanoestruturado isento de fármaco para balão volumétrico de 50 mL. As diluições subsequentes utilizadas estão apresentadas na Tabela 7 e o volume total de cada diluição foi distribuído em 10 poços.

Tabela 7 – Concentrações e diluições de NFOH, Nano-NFOH e placebo utilizados na avaliação de atividade leishmanicida em amastigotas de *L. amazonensis*

μM (μmol/L)	μg/mL	Volume estoque (μL)	Volume meio de cultura (μL)
9	2,0353	203,53	9796,47
12	2,7138	271,38	9728,62
15	3,3922	339,22	9660,78

NFOH: hidroximetilnitrofurais livre; Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH; Placebo: nanopartículas isentas de NFOH

O índice de infecção (Ii) para comparar os tratamentos foi calculado de acordo com Equação 8. Para análise estatística foram utilizados ANOVA (ANEXO E), teste de Anderson-Darling (ANEXO B), teste de Bartlett (ANEXO C), teste de Lvene (ANEXO D) e teste de Tukey.

$$I_i = \bar{X}_{Am} \times \% Minf \quad \text{Equação 8}$$

Onde: $\bar{X}_{Am}$ = média amastigotas por célula na amostra
 $\% Minf$ = porcentagem de macrófagos infectados na amostra

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Preparo e avaliação físico-química do sistema nanoestruturado polimérico contendo NFOH

O êxito do preparo do sistema nanoestruturado contendo NFOH foi avaliado verificando as características físico-químicas dos mesmos e estão apresentadas nos itens 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 e resumidas na Tabela 8:

4.1.1 Tamanho médio e índice de polidispersividade do sistema nanoestruturado polimérico

As Figuras 15 e 16 apresentam os resultados relativos ao tamanho médio das nanopartículas contendo NFOH e isentas do fármaco (placebo).

Figura 15 – Tamanho médio e índice de polidispersividade das nanopartículas contendo NFOH

Figura 16 – Tamanho médio e índice de polidispersividade das nanopartículas isentas de fármaco (placebo)

O tamanho médio das nanopartículas foi de 151,5 e 143,8 nm, respectivamente para aquelas contendo o NFOH e isentas do fármaco (placebo). Weyermann e colaboradores (2010), Sommerfeld e colaboradores (1997) e Shrinidh colaboradores (2004) relataram tamanho médio entre 130 e 140 nm, 164 e 326 nm e $146,8 \pm 2,6$ nm, respectivamente. Esses autores utilizaram, em seus trabalhos, método de preparo da nanopartículas similar ao utilizado no presente trabalho (método de polimerização em solução aquosa).

No que se refere ao índice de polidispersividade, foram obtidos valores de 0,104 e 0,065 (Tabela 8), respectivamente para a nanopartícula contendo o NFOH e para o placebo (nanopartícula isenta do fármaco). Mehrotra e Andit (2012) relataram que as nanopartículas de lomustina obtida por método de nanoprecipitação resultaram em índices de polidispersividade entre 0,066 e 0,3. Os autores concluíram que tais índices indicaram limitada variabilidade do tamanho médio das partículas. Dessa forma, os resultados obtidos foram considerados adequados. Além disso, foi observada distribuição unimodal do tamanho de partículas (Figuras 15 e 16).

4.1.2 Potencial Zeta

As Figuras 17 e 18 apresentam os resultados do potencial zeta para nanopartículas contendo NFOH e isentas do fármaco respectivamente:

Os valores de potencial zeta foram iguais a -10,1 e -11,6 mV (Tabela 8), respectivamente para as nanopartículas contendo o NFOH e para as nanopartículas isentas do fármaco (placebo). Esses valores foram similares àquele obtido por Shrinidh e colaboradores (2010): -13,9 mV. Esses autores utilizaram, para a preparação da nanopartícula, método similar ao utilizado no presente trabalho. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta, maior é a carga de superfície, a qual produz elevada repulsão entre as partículas dispersas gerando, portanto, maior estabilidade e maior uniformidade das partículas na suspensão (FENG, 2001).

Figura 17 – Distribuição do potencial zeta relativo ao NFOH nanoestruturado

Figura 18 – Distribuição do potencial zeta relativo à nanopartícula isenta de fármaco

Tabela 8 – Tamanho, índice de polidispersividade e potencial zeta para o sistema nanoestruturado contendo NFOH e isento do fármaco

Teste	Fármaco nanoestruturado	Nanopartícula livre de fármaco
Tamanho médio	151,5 nm	143,8 nm
Polidispersão	0,104	0,065
Potencial zeta	-10,1 mV	- 11,6 mV
Distribuição	unimodal	unimodal

4.1.3 Avaliação morfológica

A análise morfológica utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentada na Figura 19 mostrou que as nanopartículas possuem forma esférica e de tamanho compatível com a determinação do tamanho médio apresentado no item 4.1.1.

Figura 19 – Microscopia das nanopartículas contendo NFOH utilizando MEV. Magnificação 30.000 X

4.1.4 Determinação da eficiência de encapsulação de NFOH

Os resultados obtidos para a eficiência de encapsulação de NFOH estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Quantidade de NFOH encapsulado e eficiência de encapsulação de nanopartículas de PBCA

Amostra	Total (mg)	Sobrenadante (mg)	Eficiência de encapsulação (%)
1	9,95	3,58	64,02
2	10,00	3,55	64,50
3	9,91	3,48	64,88
Média	9,95 ±0,05%	3,54± 0,05%	64,47±0,43

A eficiência de encapsulação do NFOH foi de 64,47±0,43%, conforme apresentado na Tabela 9. Esse resultado revelou que aproximadamente 36% do fármaco permaneceu livre na suspensão obtida. Considerando a quantidade de fármaco utilizado (10 mg), apenas 6,41 mg foi encapsulado. Dessa forma, a concentração de fármaco nanoestruturado na suspensão foi de 0,641 mg/mL. De forma similar, Yordanov e colaboradores (2013) relataram eficiência de encapsulação entre 63 e 68 % de etoposídeo em nanopartículas de PBCA obtidas pelo método de polimerização em solução aquosa. No anterior, em 2012, Yordanov obteve eficiência de encapsulação de epirubicina em nanopartículas de PBCA igual a 58%, em pH 7,0. Assim sendo, a eficiência de encapsulação de NFOH, relatada no presente trabalho (64,47±0,43%) pode ser considerada satisfatória.

A eficiência de encapsulação do NFOH foi determinada empregando método validado por CLAE. Os resultados relativos aos ensaios para a validação do método estão apresentados a seguir.

4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico de eficiência de encapsulação de nanopartículas de PBCA contendo hidroximetilnitrofurais por CLAE

No método inicialmente proposto, a fase móvel era composta de acetonitrila:água na proporção 80:20. Conforme apresentado na Figura 20, a utilização dessa fase móvel não permitiu a separação do pico relativo ao NFOH na presença de compostos de degradação, incluindo o nitrofural. Observou-se a presença de um único pico relativo à amostra que contém NFOH, NF e outros componentes relacionados. Diferentes proporções de fase móvel foram testadas com a finalidade de separar esses compostos. A fase móvel final selecionada, em função dos resultados (Figura 21), foi acetonitrila e água na proporção 20:80. A utilização dessa fase permitiu a adequada separação dos picos relativos ao NFOH e ao NF.

Figura 20 – Cromatograma relativo à solução-amostra utilizando comprimento de onda de 210 nm e fase móvel acetonitrila:água 80:20

Figura 21 – Cromatograma relativo à solução-amostra utilizando comprimento de onda de 210 nm e fase móvel acetonitrila:água 20:80

Outro parâmetro modificado foi o comprimento de onda. O método inicial utiliza o λ de 210 nm. A análise do cromatograma, apresentado na Figura 21, revelou que a resposta (eixo y) é inferior a 0,04 AU (unidades de absorbância). Esse desempenho não é adequado para a determinação de eficiência de encapsulação próximas a 100%. Tal fato é justificado em função do limite de quantificação ser significativamente reduzido quando se utiliza picos com intensidade inferiores a 0,1AU.

Tendo em vista a obtenção de pico com maior intensidade, foi utilizado comprimento de onda alternativo. O espectro do NFOH foi analisado (Figura 22) e verificou-se que o máximo de absorção desse fármaco ocorre no comprimento de onda igual a 265 nm. Essa resposta foi obtida utilizando a mesma amostra que apresentou resposta menor que 0,04 AU ($\lambda=210$ nm), no ensaio anterior (Figura 21). A alteração do método para o comprimento de onda igual a 265 nm resultou em resposta próxima a 0,1 AU (Figura 23).

Após a separação dos picos do NFOH e NF e o aumento da resposta da amostra, os demais parâmetros cromatográficos foram avaliados. A análise da Figura 23 revelou que o NFOH apresenta *USP tailing* de 1,1, *USP plate count* de 14.800 e resolução entre o NF de 3,9. Esses valores satisfazem as condições mínimas determinadas pela US - FDA (1994), os critérios mínimos são *USP tailing* $\leq 1,5$; *USP plate count* > 2000 e resolução $\geq 2,0$.

Figura 22 – Espectro do NFOH na fase móvel (acetonitrila:água 20:80) do método analítico para quantificação de fármaco em nanopartículas de PBCA

Figura 23 – Cromatograma de solução padrão após as modificações no método inicial (fase móvel acetonitrila:água 20:80 e comprimento de onda igual a 265 nm)

4.2.1 Especificidade

Nas Figuras 24 e 25 pode-se observar que a fase móvel (diluyente) e o placebo não apresentaram qualquer pico no tempo de retenção do NFOH (4,9 min).

Figura 24 – Cromatograma do diluyente utilizado no método analítico por CLAE

Figura 25 – Cromatograma do placebo utilizado no método analítico por CLAE

A solução amostra foi analisada por meio do software Empower[®] 3 para verificar a homogeneidade do espectro do pico principal. Após análise, foi possível afirmar que não há coeluição de quaisquer outros componentes da amostra. Segundo interpretação do software, a eluição exclusiva do fármaco ocorre quando o valor do parâmetro *Purity Angle* é menor que o valor do parâmetro *Purity Threshold*. A amostra analisada apresentou os valores de 0,154 e 0,446, respectivamente para o valor de *Purity Angle* e de *Purity Threshold*. Tal resultado demonstrou a adequada separação dos NFOH dos componentes da matriz e de seus compostos relacionados. A pureza do pico também pode ser visualizada na Figura 26, quando a linha *Purity* está abaixo da linha *Threshold* (WATERS Co, 1998).

Figura 26 – Determinação da homogeneidade espectral do NFOH no método analítico por CLAE

4.2.2 Linearidade e intervalo do método

A suposição de linearidade do método foi avaliada por meio das estatísticas apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Estatística da análise de regressão da avaliação da linearidade do método

Estatística	Análise de regressão
Coeficiente angular	57254
Intercepto da reta	- 3265
Coeficiente de correlação (r)	0,9999
VIF	1.000
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9990
Durbin – Watson	2,0355
Teste da falta de ajuste	Valor-p> 0,1
PRESS	0,0767
DP	0,0453

PRESS: Soma dos quadrados dos erros de previsão DP: desvio-padrão; VIF: fator de inflação da variância

Figura 27 – Curva de linearidade obtida na validação do método de quantificação de NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA

Segundo a Resolução n° 899 de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), após exame visual do gráfico, deverão ser determinados os coeficientes de correlação, a intersecção com o eixo Y, o coeficiente angular, a soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) dever ser 0,99. No que se refere às demais estatísticas, a resolução não apresenta os critérios. Embora curva com coeficiente de correlação (r) acima de 0,995 seja considerada linear, outras estatísticas devem ser utilizadas para determinar a qualidade de ajuste da curva de calibração, como por exemplo, a estatística Durbin-Watson e o teste de falta de ajuste (LOCO et al., 2002).

As estatísticas apresentadas na Tabela 10 e a Figura 27 revelam a característica linear do método. No que se refere aos coeficientes de correlação e determinação, esses foram respectivamente 0,9999 e 0,999. Tais valores, próximos a 1, além dos resultados obtidos para o teste da falta de ajuste (valor- $p > 0,1$, $\alpha=0,05$) e para a estatística Durbin-Watson (2,03826), indicam a adequação do modelo linear proposto (ANEXO A). Adicionalmente, o valor igual a 1,00 para o fator de inflação da variância (VIF) demonstrou a ausência de multicolinearidade. No caso da estatística Durbin-Watson, o valor próximo a 2 indicou a ausência de

autocorrelação entre os resíduos. No que se refere à estatística PRESS, essa é potencialmente útil em discriminação entre modelos alternativos. O menor valor deve ser utilizado para a seleção do método, no caso de comparações. No presente trabalho, essa estatística apresentou valor igual a 0,767 e, portanto, considerado adequado (valor < 1,0).

4.2.3 Exatidão

A exatidão foi calculada e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração teórica, concentração obtida e porcentagem de recuperação do teste de exatidão do método de quantificação de NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	Recuperação (%)
0,9363	0,9363	100,0
0,9363	0,9401	100,5
0,9363	0,9335	99,7
9,3633	9,4476	100,9
9,3633	9,4008	100,4
9,3633	9,4850	101,3
13,1082	13,2262	100,9
13,1082	13,2524	101,1
13,1082	13,3310	101,7
Média		100,8
DPR		0,4

O resultado do teste de exatidão mostrou que a recuperação é próxima de 100% e dentro da faixa aceitável de recuperação (80-110%), segundo Brito (2003). Tal desempenho indicou que o método é capaz de proporcionar resultados próximos do valor real e, ainda, que a matriz não influencia na quantificação do NFOH.

4.2.4 Precisão

Os resultados para precisão por repetibilidade e precisão intermediária estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Precisão por repetibilidade e intermediária do método para quantificação do NFOH encapsulado em nanopartículas de PBCA

	Precisão por repetibilidade (%)	Precisão intermediária (%)
	99,5	99,5
	99,6	100,0
	99,3	100,1
	100,5	100,2
	100,3	99,5
	100,2	99,5
Média	99,8	99,9
DPR	0,3	0,5

Os testes apresentaram desvio padrão relativo (DPR) igual 0,3% e 0,5% respectivamente, para a precisão por repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 12). Esses resultados podem ser considerados adequados quando comparados à exigência da regulamentação vigente (RE nº 899) que define o máximo 5% de desvio padrão relativo na validação do método. A diferença média entre as análises foi de apenas 0,1%, valor que mostra que o método é capaz de gerar resultados independentes do analista e do dia do teste.

A variabilidade do método, em geral, deve ser avaliada tendo em vista a faixa especificada para o fármaco, por exemplo, entre 90 e 110%. Nesse caso, a capacidade do sistema de medição (a razão entre a precisão do método e a tolerância ou faixa de especificação - P/T) foi igual a 2,5%. Essa capacidade, inferior a 10%, é considerada adequada quando comparada aos critérios propostos por Montgomery (2004).

4.2.5 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Apesar de não serem exigidos os limites de detecção e de quantificação, essas figuras de mérito foram determinadas para a quantificação do fármaco não encapsulado. Tal abordagem é necessária no caso de resultados de eficiência de encapsulação elevados (acima de 90%) e, portanto reduzida concentração de fármaco livre.

Os limites de quantificação e detecção foram respectivamente, 0,3210 e 0,2160 µg/mL, com 95% de intervalo de confiança. Nessas concentrações assegura-se que valores eficiência de encapsulação próximos a 100% possam ser determinados com precisão e exatidão adequados. Considerando o LQ de 0,3210 µg/mL é possível determinar concentrações na ordem a 3% de fármaco no sobrenadante obtido conforme item 3.2.5.1.

4.2.6 Robustez

Os resultados relativos ao ensaio para a determinação da robustez do método estão apresentados na Tabela 13:

Tabela 13 – Variações nas condições cromatográficas para avaliar a robustez do método para quantificação do NFOH encapsulado

Condição	Média (%)	DPR
Análise inicial	100,3	0,3
75:25 Água:acetonitrila	100,7	0,2
85:15 Água:acetonitrila	100,7	0,2
Fluxo 1,1mL/min	100,8	0,2
Fluxo 1,3mL/min	100,7	0,3
20°C	100,7	0,2
30°C	100,5	0,2

A análise da Tabela 13 mostrou que as modificações no método geraram resultados semelhantes à condição inicial. A maior diferença (0,5%) foi encontrada quando o fluxo da fase móvel foi modificado para 1,1 mL/min. Portanto, os resultados demonstraram a robustez do método.

4.3 Avaliação da atividade leishmanicida do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH em promastigotas de *L. amazonensis*

Os resultados do teste de atividade leishmanicida de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (64,5% de encapsulação) e placebo (controle) em promastigotas de *L. amazonensis* estão apresentados na Tabela 14. A análise estatística desses resultados está apresentada nas Tabelas 15 e 16 e Figuras 28, 29, 30 e 31.

Tabela 14 – Porcentagem de sobrevivência no teste da avaliação da atividade leishmanicida de NFOH, Nano-NFOH e placebo em promastigotas de *L. amazonensis*

T	C	Réplicas										$\bar{X}$ $\pm DP$
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PLA	4	88,3	86,9	89,5	87,8	90,8	88,5	89,5	89,5	90,5	89,4	89,2 $\pm 1,2$
Nano-NFOH		21,1	23,2	25,3	23,8	26,9	21,0	25,9	22,7	23,8	21,8	23,6 $\pm 2,0$
NFOH		94,0	96,6	95,7	93,0	94,9	95,5	96,7	90,4	90,8	96,7	94,4 $\pm 2,3$
PLA	6	80,8	78,0	80,5	80,7	79,8	77,3	78,1	80,7	79,2	79,5	79,4 $\pm 1,3$
Nano-NFOH		16,6	19,2	19,0	16,2	17,5	19,3	19,1	17,1	15,1	17,2	17,6 $\pm 1,5$
NFOH		85,3	86,1	87,3	84,4	85,8	87,5	86,1	86,8	87,9	83,5	86,1 $\pm 1,4$
PLA	8	70,0	71,7	68,3	68,8	69,9	70,5	70,5	71,2	70,5	68,3	70,0 $\pm 2,3$
Nano-NFOH		10,3	11,6	13,3	13,2	13,3	11,9	10,4	10,7	11,2	12,7	11,9 $\pm 1,2$
NFOH		79,2	80,1	80,8	78,3	80,2	81,7	80,2	80,8	77,5	79,2	79,8 $\pm 1,3$

continua

												conclusão
T	C	Réplicas										$\bar{X}$ $\pm DP$
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PLA	10	62,6	61,8	62,3	62,7	62,6	61,4	62,5	63,6	63,6	62,7	62,6 $\pm 2,3$
Nano-NFOH		1,9	5,7	4,5	3,7	2,4	4,9	2,9	2,2	3,1	2,7	3,4 $\pm 1,3$
NFOH		73,1	74,4	73,1	72,9	74,9	75,6	74,2	72,2	74,0	71,4	73,6 $\pm 1,3$
PLA	12	53,6	53,1	57,5	55,0	50,5	54,0	53,2	58,0	53,9	54,6	54,4 $\pm 2,3$
Nano-NFOH		0,1	3,3	0,0	0,0	0,1	0,5	0,6	1,5	0,5	0,1	0,7 $\pm 1,0$
NFOH		71,2	68,8	68,3	69,2	68,0	71,4	69,1	67,9	66,3	68,5	68,9 $\pm 1,5$

T:Tratamentos; C:concentração em μM ; DP: Desvio padrão; PLA: nanopartículas isentas de NFOH; Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH; NFOH: hidroximetilnitrofurural

Figura 28 – Intervalos (média e desvio padrão) para a atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo

Os resultados obtidos para o valor médio de porcentagem de sobrevivência das promastigotas (*L. amazonensis*) para o sistema Nano-NFOH foi significativamente menor quando comparado aos valores observados para o placebo

e para o NFOH livre, em todas as concentrações utilizadas, conforme observado na Tabela 14 e na Figura 28. Essa redução foi 77,7 vezes maior na concentração de 12 μM para o sistema Nano-NFOH, quando comparada ao placebo; em relação ao fármaco livre, a redução foi de 98 vezes. Resultados similares foram apresentados por Soflaei e colaboradores (2012). Esses pesquisadores obtiveram redução de 50% no número de parasitos quando utilizaram nanopartículas de sulfeto de antimônio com concentrações inferiores ao fármaco livre, em cultura de promastigotas de *L. infantum*.

A comparação dos valores médios da porcentagem de sobrevivência de promastigotas nos diferentes tratamentos e concentrações foi realizada empregando ANOVA. Para adoção do modelo de análise de variância, os dados amostrais devem cumprir três pré-requisitos fundamentais: a normalidade, ou seja, o conjunto de dados deve ter distribuição normal dentro de cada grupo; igualdade das variâncias (a variância de cada um dos grupos deve ser semelhante); independência da amostra, ou seja, cada dado individual não deve ter qualquer relação com outro (MODER, 2010).

A distribuição normal é uma distribuição contínua de probabilidade de uma variável aleatória x , também conhecida como de Gauss ou Gaussiana. Essa se caracteriza por ser distribuição de frequência (gráfico de frequências) simétrica, na forma de sino (curva normal), sendo que a mediana, a média e a moda apresentam o mesmo valor e estão localizadas no centro do gráfico. Adicionalmente, a distribuição normal é caracterizada pela média de determinado conjunto de dados e pelo seu desvio padrão. Dessa forma, 68% do conjunto de dados apresentam-se no intervalo compreendido entre a média e ± 1 desvio-padrão, 95% do conjunto de dados, entre a média e ± 2 desvios-padrão e 99,7%, entre a média e ± 3 desvios-padrões (HINDERS, 2009).

Para avaliar a aderência à normalidade dos dados obtidos, foi utilizado o teste de Anderson-Darling (ANEXO B) (YAP&SIM, 2011). A Figura 29 revelou que todos os conjuntos de dados (tratamentos e concentrações) apresentaram distribuição normal (valor- $p > 0,05$, $\alpha = 0,05$), exceto para o sistema Nano-NFOH (valor- $p < 0,05$, $\alpha = 0,05$). Esse último resultado pode ser justificado em função dos valores próximos a zero % de sobrevivência de promastigotas para esse sistema. O valor- p é calculado a partir do resultado da coluna denominada AD (Anderson-Darling) pelo uso da Equação 9 (D'AGOSTINO, STEPHENS, 1986).

$$\text{Valor} - p = AD \times \left(1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{(n \times n)}\right) \quad \text{Equação 9}$$

Onde: n= número de observações
AD = valor do teste Anderson-Darling

Figura 29– Avaliação da distribuição normal dos dados referente ao teste de atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo. DP: desvio-padrão; AD: teste de Anderson-Darling; N: número de ensaios

Com referência à violação do pressuposto de igualdade de variâncias dos tratamentos, essa foi avaliada por meio do teste de Bartlett (ANEXO C), conforme apresentado na Figura 30. Esse teste é sensível em relação a hipótese de normalidade dos dados. Se a hipótese de normalidade for rejeitada, como no caso do tratamento Nano-NFOH, o teste proposto por Levene deve ser utilizado. Porém, se a hipótese de normalidade não for violada, o teste de Bartlett apresenta desempenho melhor que o teste proposto por Levene. O teste de Bartlett revelou valor-p igual a 0,067 (valor-p > 0,05, $\alpha=0,05$). Dessa forma, foi comprovada a igualdade de variância desses tratamentos. No caso dos dados relativos ao tratamento Nano-NFOH (distribuição não-normal), o teste Levene (ANEXO D)

resultou em valor-p igual a 0,196 (valor-p $>0,05$, $\alpha=0,05$). Esse resultado, de forma similar ao teste de Bartlett, comprovou a igualdade de variância entre os tratamentos (MONTGOMERY, 2004).

Figura 30 – Teste de igualdade de variâncias dos resultados do teste de atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo

Considerando os pressupostos de normalidade e de igualdade de variâncias atendidos, foi realizada a análise de variância ou ANOVA (*analysis of variance* - ANOVA) (ANEXO E) com o objetivo de comparar as médias da % de sobreviventes de promastigotas nos diferentes tratamentos. A análise de variância (ANOVA) pode ser definida como conjunto de procedimentos estatísticos para a análise de respostas quantitativas de unidades experimentais. Dessa forma, a ANOVA avalia se as diferenças observadas entre as médias das amostras são estatisticamente significantes. Nesse caso observa-se se a variação de médias das amostras pode ser consequência da variação amostral ou pode ser devido à diferença entre as médias das populações (MONTGOMERY, 2004).

O resultado da análise de variância para a comparação das médias da % de sobreviventes de promastigotas, no ensaio para avaliação da atividade leishmanicida de NFOH, Nano-NFOH e placebo, revelou valor-p igual a zero

($\alpha=0,05$) (Tabela 15). Esse resultado indicou que a hipótese da igualdade das médias foi rejeitada. Assim sendo, concluiu-se que os tratamentos apresentam atividades leishmanicida distintas.

Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, Nano-NFOH e placebo.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor-p
Tratamento	14	155726,8	11123,3	4999,32	0,000
Erro	135	300,4	2,2		
Total	149	156027,2			
DP=1,492		R ² =99,81%	R ² ajust.: 99,79%		

R²: coeficiente de determinação; R²: coeficiente de determinação ajustado; DP: desvio padrão.

A ANOVA, no caso de rejeição da hipótese nula, não permite a diferenciação entre os tratamentos. Dessa forma, é necessária a utilização de teste para a comparação dos diferentes tratamentos. No caso do presente trabalho foi utilizado o teste de Tukey, essa abordagem permite efetuar comparações múltiplas entre todos os pares de médias. Esse teste consiste na construção de intervalos de confiança, para todos os pares de médias, de tal forma que o conjunto de todos os intervalos tenha um determinado grau de confiança. Os resultados de comparação das médias são classificados em grupos. Se dois ou mais tratamentos apresentam o mesmo grupo, as médias não apresentam diferença significativa no nível de significância estabelecido. Na comparação dos tratamentos apresentados na Tabela 16, os tratamentos Placebo 6 μ M e NFOH 8 μ M receberam a mesma classificação de grupo (letra D). Nesse caso, os dois tratamentos não possuem atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis* significativamente diferentes. No caso dos tratamentos Placebo 8 μ M e NFOH 12 μ M esses receberam a classificação de grupo F. Todos os outros tratamento foram classificados em grupos distintos. Tendo em vista o objetivo do teste, a atividade leishmanicida do sistema nanoestruturado contendo NFOH foi significativamente superior à atividade do fármaco livre e do placebo, em todas as concentrações, no nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$).

Tabela 16 – Teste de Tukey para a comparação da atividade leishmanicida do NFOH, Nano-NFOH e Placebo em promastigotas de *L. amazonensis*

Tratamento	Concentração (μM)	% sobrevivência média	Grupo
Placebo	4	$89,2 \pm 1,2$	B
	6	$79,4 \pm 1,3$	D
	8	$70,0 \pm 2,3$	F
	10	$62,6 \pm 2,3$	G
	12	$54,4 \pm 2,3$	H
Nano-NFOH	4	$23,6 \pm 2,0$	I
	6	$17,6 \pm 1,5$	J
	8	$11,87 \pm 1,4$	K
	10	$3,4 \pm 1,3$	L
	12	$0,7 \pm 1,0$	M
NFOH	4	$94,4 \pm 2,3$	A
	6	$86,1 \pm 1,4$	C
	8	$79,8 \pm 1,4$	D
	10	$73,6 \pm 1,3$	E
	12	$68,9 \pm 1,5$	F

NFOH: fármaco livre. Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH. Placebo: nanopartículas isentas do NFOH

Os resíduos consistem nos valores obtidos pela diferença entre a observação e a média do tratamento correspondente. A análise desses (pressuposto da ANOVA) refere-se à estimativa dos erros e foi efetuada conforme Figura 31. Dessa forma, a conclusão referente à relação entre as variáveis e a resposta somente será válida se não houver violação da suposição de independência dos erros. Assim, é necessário confirmar a normalidade da distribuição dos resíduos, comprovar a ausência de autocorrelação e de heterocedasticidade desses (variância deve ser constante para todas as observações) (MONTGOMERY, 2004).

A suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal (Figura 31A) e pelo histograma dos resíduos (Figura 31B). No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que os resíduos seguem distribuição

normal. Considerando os resultados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, assim como, o histograma (Figura 31B), permite inferir que a suposição de normalidade é válida. Além disso, o gráfico das observações individuais demonstrou comportamento aleatório dos resíduos (Figura 31D). Não foi observado fenômeno de heterocedasticidade (Figura 31C) e, portanto, as variâncias dos resíduos foram consideradas iguais.

Figura 31 – Análise de resíduo dos resultados do teste de atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo. (A) Probabilidade normal; (B) Histograma da distribuição dos resíduos; (C) Resíduos versus valor estimado; (D) Resíduos versus ordem de observação

4.4 Avaliação da citotoxicidade do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH

Os resultados do teste de citotoxicidade do NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo (como controle) estão apresentados na Tabela 17. A análise estatística desses resultados está apresentada na Tabela 18 e Figuras 32, 33, 34 e 35.

Tabela 17 – Porcentagem de sobrevivência no teste da avaliação da citotoxicidade de NFOH, Nano-NFOH e placebo

Tratamento	Concentração (µM)	Réplicas					$\bar{X} \pm DP$
		1	2	3	4	5	
Placebo	5	97,8	104,7	110,8	90,4	109,8	102,7 ±8,4
Nano-NFOH		106,7	102,2	110,8	104,9	100,4	105,0 ±3,9
NFOH		106,7	102,7	103,5	110,4	93,5	103,3 ±6,1
Placebo	10	102,2	95,7	104,1	95,9	93,3	98,2±4,7
Nano-NFOH		106,3	109,0	104,1	93,3	113,1	105,1 ±7,1
NFOH		93,3	110,2	92,9	111,4	108,2	103,2 ±9,0
Placebo	15	99,8	95,3	100,0	88,0	101,0	96,8±5,6
Nano-NFOH		104,3	101,2	88,0	106,9	107,8	101,6±7,9
NFOH		106,9	95,3	109,4	92,0	109,4	102,6 ±8,1
Placebo	20	91,0	95,9	100,0	102,0	93,3	96,4±4,7
Nano-NFOH		98,2	93,5	106,1	95,7	102,0	99,1±5,1
NFOH		99,8	91,8	99,8	108,2	87,1	97,3±8,3
Placebo	25	93,3	97,8	87,8	96,9	98,0	94,7±4,6
Nano-NFOH		92,9	98,0	86,5	102,4	86,1	93,2±7,6
NFOH		107,6	93,3	100,4	87,6	96,3	97,0±7,8

NFOH. NFOH: hidroximetilnitrofurais; Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo; Placebo: nanopartículas isentas de NFOH, DP: Desvio Padrão.

Os valores médios de porcentagem de sobrevivência, apresentados na Tabela 17 e na Figura 32 indicaram que esses valores são similares para todos os tratamentos e concentrações. Na faixa testada, os valores de sobrevivência médios foram de 100,7 ±3,2; 100,8±4,9 e 97,8± 3,0% para o NFOH, Nano-NFOH e placebo, respectivamente. Esses valores são considerados satisfatórios, pois indicaram que a atividade leishmanicida de NFOH, de Nano-NFOH e do placebo em amastigotas de *L. amazonensis* é referente à sua ação nos parasitos intracelulares e não pela destruição dos macrófagos.

Os resultados do presente trabalho corroboraram os estudos de Hasadsri e colaboradores (2008). Esses autores avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de PBCA em neurônios cultivados e relataram citotoxicidade mínima dessas. David e colaboradores (2010) avaliaram a citotoxicidade em camundongos e, da mesma forma, não observaram efeitos tóxicos. Com relação ao NFOH, Melo (2006) testou a toxicidade aguda em camundongos e determinou a DL_{50} de 2500 mg/kg, tal valor é classificado como pouco tóxico.

Figura 32 – Intervalos (média e desvio padrão) para o teste de citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo

Com referência a avaliação da normalidade dos valores obtidos para os tratamentos, o teste de Anderson-Darling foi utilizado. A Figura 33 revelou que todos os conjuntos de dados (tratamentos e concentrações) apresentaram distribuição normal (valor-p > 0,05, $\alpha=0,05$).

Figura 33 – Avaliação da distribuição normal dos dados referente ao teste citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo. DP: desvio-padrão; AD: teste de Anderson- Darling; N: número de ensaios

Para avaliar a igualdade das variâncias dos valores obtidos na avaliação da citotoxicidade, foi utilizada abordagem similar àquela utilizada para o teste de atividade leishmanicida em promastigotas. O resultado deste teste apresentado na Figura 34 revelou valor-p igual a 0,910 (valor-p > 0,05, $\alpha=0,05$). Dessa forma, foi comprovada a igualdade de variância desses tratamentos.

Figura 34 – Teste de igualdade de variâncias para os resultados do teste de citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo

Considerando os pressupostos de normalidade e de igualdade de variâncias atendidos, foi realizada a análise de variância com o objetivo de comparar as médias da % de sobrevivência dos diferentes tratamentos. O resultado da ANOVA para a avaliação da citotoxicidade de NFOH, Nano-NFOH e placebo, revelou valor-p igual a 0,110 (valor-p > 0,05; $\alpha=0,05$) (Tabela 18). Esse resultado indicou que a hipótese da igualdade das médias foi aceita. Assim sendo, concluiu-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas de citotoxicidade.

Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para o teste de citotoxicidade de NFOH, Nano-NFOH e placebo

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor-p
Tratamento	14	1028,3	73,5	1,58	0,110

continua

Conclusão					
Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor-p
Erro	60	2782,3	46,4		
Total	74	3810,7			
DP=6,810	R ² =26,99%	R ² ajust.: 9,95%			

R²: coeficiente de determinação; R²: coeficiente de determinação ajustado. NFOH: fármaco livre. DP: Desvio padrão; Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH. Placebo: nanopartículas isentas do NFOH

A análise dos resíduos foi efetuada conforme Figura 35 e de forma similar ao teste de atividade leishmanicida em promastigotas. A suposição de normalidade foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal (Figura 35A) e pelo histograma dos resíduos (Figura 35B). Considerando os resultados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, assim como, o histograma, permite inferir que a suposição de normalidade é válida. Além disso, o gráfico das observações individuais demonstrou comportamento aleatório dos resíduos (Figura 35D). Não foi observado fenômeno de heterocedasticidade (Figura 35C) e, portanto, as variâncias dos resíduos foram consideradas iguais.

Figura 35 – Análise de resíduo dos resultados do teste de citotoxicidade de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo. (A) Probabilidade normal; (B) Histograma da distribuição dos resíduos; (C) Resíduos versus valor ajustado; (D) Resíduos versus ordem de observação

4.5 Avaliação da atividade leishmanicida de NFOH e sistema nanoestruturado contendo NFOH em macrófagos infectados por amastigotas de *L. amazonensis*

Os resultados do teste de atividade leishmanicida de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (64,5% de encapsulação) e placebo (como controle) em amastigotas estão apresentados na Tabela 19. A análise estatística desses resultados está apresentada nas Tabelas 20, 21 e nas Figuras 36, 37, 38 e 39.

Tabela 19 – Índice de infecção da avaliação de atividade leishmanicida de NFOH, Nano-NFOH e placebo em amastigotas de *L. amazonensis*

T	C	Réplicas										$\bar{X}$ ±DP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Controle		156,0	161,0	151,5	156,5	159,5	150,0	159,0	153,0	158,0	153,5	155,8 ±2,4
PLA		127,5	122,0	133,5	133,0	134,5	130,5	134,5	136,5	130,0	132,5	131,4 ±4,2
Nano-NFOH	9	25,5	20,0	24,5	22,5	18,5	18,5	26,0	14,0	21,0	14,5	20,5 ±4,2
NFOH		153,0	154,0	150,6	144,5	151,5	140,0	154,0	156,5	145,0	148,5	150,6 ±5,9
PLA		104,5	106,0	106,5	104,0	111,5	107,5	108,5	113,0	107,5	109,5	107,8 ±2,9
Nano-NFOH	12	13,0	12,5	12,0	8,0	8,0	9,0	7,0	8,5	10,0	9,5	9,8 ±2,1
NFOH		139,5	135,0	132,5	139,0	139,0	132,0	133,5	129,0	126,5	136,5	134,3 ±4,4
PLA		114,0	114,5	114,5	116,0	122,5	118,0	123,5	112,5	120,0	121,0	117,7 ±3,9
Nano-NFOH	15	5,5	3,0	5,0	5,5	6,0	0,5	4,5	3,5	2,0	0,0	3,6 ±2,1
NFOH		121,0	126,5	120,0	120,5	123,0	125,0	124,5	128,0	125,0	125,5	123,9 ±2,7

T:Tratamentos. C:concentração em μM . PLA: nanopartículas isentas de NFOH. Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH. NFOH: hidroximetilnitrofurais

Os índices de infecção de macrófagos por amastigotas (*L. amazonensis*) para o sistema Nano-NFOH foram menores quando comparado aos observados para o placebo e para o NFOH livre, em todas as concentrações utilizadas, conforme observado na Tabela 19 e na Figura 36. Quando comparado ao controle, observou-se a redução de 43 vezes do índice de infecção de macrófago por amastigota, na concentração de 15 μM para o sistema Nano-NFOH. Quando comparado ao placebo e ao fármaco livre, observou-se uma redução de 33 e 34 vezes, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Lima e colaboradores (2012). Os pesquisadores obtiveram redução da viabilidade de amastigotas de *L. infantum* quando avaliaram nanopartículas de poli(ácido láctico) (PLA), contendo bisnafta limidopropil. A redução da atividade foi de 2,5 vezes em relação ao fármaco livre.

Figura 36 – Intervalos (média e desvio padrão) para a atividade leishmanicida em amastigotas *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo

Com referência a avaliação da normalidade dos valores obtidos a Figura 37 revelou que todos os conjuntos de dados (tratamentos e concentrações) apresentaram distribuição normal (valor- $p > 0,05$, $\alpha = 0,05$).

No que se refere à avaliação da igualdade das variâncias, a Figura 38 revelou valor- p igual a 0,083 (valor- $p > 0,05$, $\alpha = 0,05$). Dessa forma, foi comprovada a igualdade de variância para todos os tratamentos.

Figura 37 – Avaliação da distribuição normal dos dados referente ao teste de atividade leishmanicida em amastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo. DP: desvio-padrão; AD: teste de Anderson-Darling; N: número de ensaios

Figura 38 – Avaliação da uniformidade de variâncias para os resultados do teste de atividade leishmanicida em amastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH (Nano-NFOH) e placebo

A análise de variância (ANOVA) para a comparação das médias do índice de infecção de macrófagos infectados por amastigotas (*L. amazonensis*) revelou valor-p igual a zero ($\alpha=0,05$) (Tabela 20). Esse resultado indicou que a hipótese da igualdade das médias foi rejeitada. Assim sendo, concluiu-se que os tratamentos apresentam atividades leishmanicida distintas.

Tabela 20 – Análise de variância (ANOVA) para a avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, Nano-NFOH e placebo

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor-p
Tratamento	9	323431,2	35936,8	2513,11	0,000
Erro	90	1287,0	14,3		
Total	99	324718,2			
DP=3,781	R ² =99,60%	R ² ajust.: 99,56%			

Na comparação das médias (Tabela 21), os tratamentos NFOH 9 μ M e controle receberam a mesma classificação de grupo (letra A), ou seja, os dois tratamentos apresentam atividade leishmanicida contra amastigotas significativamente diferentes. No caso dos tratamentos Placebo 9 μ M e NFOH 12 μ M esses receberam a classificação de grupo B. Todos os outros tratamentos foram classificados em grupos distintos. Tendo em vista o objetivo do teste, a atividade leishmanicida do sistema nanoestruturado contendo NFOH foi significativamente superior à atividade do fármaco livre e do placebo, em todas as concentrações, no nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$).

Tabela 21 – Teste de Tukey para a comparação da atividade leishmanicida do NFOH, Nano-NFOH e placebo em amastigotas de *L. amazonensis*

Tratamento	Concentração (μM)	Média do índice de infecção	Grupo
Controle	0	155,8 $\pm$ 2,4	A
Placebo	9	131,4 $\pm$ 4,2	B
	12	107,8 $\pm$ 2,9	E
	15	117,7 $\pm$ 3,9	D
Nano-NFOH	9	20,5 $\pm$ 4,2	F
	12	9,8 $\pm$ 2,1	G
	15	3,6 $\pm$ 2,1	H
NFOH	9	150,6 $\pm$ 5,9	A
	12	134,3 $\pm$ 4,4	B
	15	123,9 $\pm$ 2,7	C

NFOH: fármaco livre. Nano-NFOH: sistema nanoestruturado contendo NFOH. Placebo: nanopartículas isentas do NFOH

De forma similar aos ensaios anteriores, a suposição de normalidade dos resíduos foi verificada por meio do gráfico de probabilidade normal (Figura 39A) e pelo histograma dos resíduos (Figura 39B). No gráfico de probabilidade normal, o resíduo é representado em função de seu valor esperado, calculado a partir da suposição de que os resíduos seguem distribuição normal. Considerando os resultados obtidos, a localização dos pontos em relação à curva de probabilidade, assim como, o histograma, permite inferir que a suposição de normalidade é válida. Além disso, o gráfico das observações individuais demonstrou comportamento aleatório dos resíduos (Figura 39D). Não foi observado fenômeno de heterocedasticidade (Figura 39C) e, portanto, as variâncias dos resíduos foram consideradas iguais.

Figura 39 – Análise de resíduo dos resultados do teste de atividade leishmanicida em amastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, sistema nanoestruturado contendo NFOH e placebo (A) Probabilidade normal; (B) Histograma da distribuição dos resíduos; (C) Resíduos versus valor ajustado; (D) Resíduos versus ordem de observação

A atividade leishmanicida em formas amastigotas de *L. amazonensis* de NFOH, Nano-NFOH e placebo, apresentados na Tabela 20, pode ser visualmente comprovada pela Figura 40. Nessa microscopia observou-se claramente que na concentração de 15 μM , o sistema nanoestruturado contendo NFOH possui atividade leishmanicida superior ao fármaco livre e ao placebo. Tal fato deve-se à ausência de parasitos intracelulares (Figura 40D). O aspecto do citoplasma dos macrófagos indicou que existem diversos vacúolos, os quais seriam gerados pela internalização das nanopartículas. O mesmo aspecto pode ser observado na Figura 40C na qual o tratamento é o placebo, porém sem eliminação de todos os parasitos. Em contraste, nas Figuras 40A (controle) e 40B (NFOH 15 μM), o citoplasma apresenta somente os vacúolos referentes à infecção de *L. amazonensis*.

Figura 40 – Amostras do teste de atividade leishmanicida em macrófagos infectados por amastigotas de *L. amazonensis*; (A) Controle; (B) NFOH 15 μ M; (C) Placebo 15 μ M; (D) Nano- NFOH 15 μ M. As setas apontam a forma amastigota do parasito dentro da célula. Magnificação 100x

A pesquisa bibliográfica que fundamentou o presente trabalho revelou que utilização de sistemas nanoestruturados para o tratamento da leishmaniose ainda é incipiente. Dos 30 artigos recuperados empregando os descritores leishmaniose e nanopartículas (período entre 1970 e 2012), apenas 15 apresentaram novos compostos como alternativa aos fármacos em uso. Adicionalmente, 43% desses artigos empregaram corretamente a abordagem estatística na interpretação dos seus resultados. Considerando tal fato, o presente trabalho constitui importante contribuição no sentido de elevar a eficácia e a segurança do tratamento da leishmaniose.

5 CONCLUSÃO

O método de polimerização em solução aquosa empregando PBCA se mostrou adequado para a obtenção de sistema nanoestruturado contendo NFOH. A caracterização físico-química revelou ao tamanho médio de 151,5 nm, polidispersividade de 0,104, potencial zeta de -10,1 mV, e eficiência de encapsulação de 64,5% e forma esférica.

O desenvolvimento do método analítico por CLAE, revelou a necessidade de alteração do método originalmente adotado no que se refere à fase móvel (água:acetonitrila 80:20) e comprimento de onda (265 nm).

Os estudos de validação do método revelaram que as características de desempenho do método: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez atenderam regulamentação vigente. No que se refere à precisão foi obtido desvio padrão relativo de 0,5%.

A atividade leishmanicida em promastigotas de *L. amazonensis* revelou que o sistema nanoestruturado apresentou atividade 78 vezes superior ao placebo e 98 vezes superior ao fármaco livre.

A citotoxicidade revelou que não houve diferença significativa entre os tratamentos, a porcentagem de sobrevivência média foi de $100,7 \pm 3,2$; $100,8 \pm 4,9$ e $97,8 \pm 3,0\%$ para o NFOH, Nano-NFOH e placebo, respectivamente. Dessa forma, pode-se concluir que atividade leishmanicida desses tratamentos não tem origem na destruição dos macrófagos contendo os parasitos e sim na interação dos tratamentos com os processos bioquímicos celulares.

A atividade leishmanicida em formas amastigotas de *L. amazonensis* do sistema nanoestruturado contendo NFOH foi 43, 33 e 34 vezes superior controle, ao placebo e ao fármaco livre, respectivamente. Dessa forma concluiu-se que o sistema nanoestruturado contendo NFOH apresenta potencial aplicação para liberação sítio-específica em macrófagos.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency of and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v.160, n.901, p.268-282, 1937.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.2, n.10, p.E313, 2008.

BOSQUESI, P.L.; ALMEIDA, A.E.; BLAU, L., MENEGON, R.F.; SANTOS, J.L.; CHUNG, M.C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.29, n.3, p.231-238, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003*. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 10 ago. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 120p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf. Acesso em: 14 mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 179p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. Acesso em: 13 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Revista de Saúde Pública*, v.44, n.1, p.200-202, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Eletrônico Epidemiológico*, ano.10, n.2, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano10_n02_sit_epidemiol_zoonoses_br.pdf. Acesso em: 15 jul. 2012.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. *PAS71:2011: nanoparticles – vocabular*. London: BSI, 2011. 30p.

BRITO, N.M.; AMARANTE JUNIOR, O.P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.13, n.1, p.129-146, 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAER, M.; Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, v.5, p.873-882, 2007.

CHIN, C.M. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos derivados de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos*. São Paulo, 1996. 196p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

COUSINEAU, D.; CHARTIER, S. Outliers detection and treatment: a review. *International Journal of Psychological Research*, v.3, p.58-67, 2010.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M. Poly (cyanoacrylate) nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.31, p.331–332, 1979.

D'AGOSTINO, R.B., STEPHENS, M.A. Goodness-of-fit-techniques, Statistics: a Series of Textbooks and Monographs, Marcel Dekker, INC, New York, v. 68, 1986.

DAVID, G.; JABA, I.M.; TAMBA, B.; BOHOTIN, C.; NEAMTU, A.; PATRAS, X.; SIMIONESCU, B.C.; MUNGIU, O.C. Antinociceptive effect of morphiceptin loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Revue Roumaine de Chimie*, v.55, p.923-931, 2010.

FARAJI, A.H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n.17, n.8, p.2950-2962, 2009.

FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, v.3, n.1, p.16-20, 2009.

FENG, S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release*, v.71, p.53–69, 2001.

GARG, N.J. Global health: neglected diseases and access to medicines. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.25, p.639–651, 2011.

GRILLO, R.; MELO, N.F.S.; FRACETO, L.F.; BRITO, C.L.; TROSSINI, G.H.G.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; MORAES, C.M. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil- β -ciclodextrina. *Química Nova*, v.31, n.2, p.290-295, 2008.

GUIDO, R.V.C.; FERREIRA, E.I.; NASSUTE, J.C.; VARANDA, E.A.; CHING, M.C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofuril. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.22, p.319-333, 2001.

HE, M.; ZHAO, Z.; YIN, L.; TANG, C.; YIN, C. Hyaluronic acid coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles as anticancer drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.373, p.165–173, 2009.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.66, p.2873–2896, 2009.

HINDERS, D.C. *5 steps to a 5 AP: statistics*. ed.2010-2011. New York: McGraw Hill Professional, 2009. 384p.

HIRAKU, Y.; SEKINE, A.; NABESHI, H.; MIDORIKAWA, K.; MURATA, M.; KUMAGAI, Y.; KAWANISHI, S. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. *Cancer Letters*, v.215, p.141–150, 2004.

HO, C.Y.; MA C.; SUI, F.M. Thermal diffusion in jammed aluminum nanopowders. *Applied Mechanics and Materials*, v.121, p.1809-1812, 2012.

HUNT, WARREN. Nanomaterials: Nomenclature, novelty, and necessity. *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, v. 56, n. 10, p.13-18, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Quality Guideline. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. Q2 (R1) - validation of analytical procedures: text and methodology. S.I.: ICH, 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 23 jan. 2012.

KAMAL AL-HALLAK, M.H.D.; AZARMI, S.; SUN, C.; LAI, P.; PRENNER, E.J.; ROA, W.H.; LÖBENBERG, R. Pulmonary toxicity of polysorbate-80-coated inhalable nanoparticles; *in vitro* and *in vivo* evaluation. *AAPS Journal*, v.12, n.3, p.294–299, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v.9, n.8, p.604-615, 2011.

LIMA, S.C.; RODRIGUES, V.; GARRIDO, J.; BORGES, F.; LIND, 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, p.424–430, 2012.

LOCO, J.V.; ELSKENS, M.; CROUX, C.; BEERNAERT, H. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, v.7, p.281-285, 2002.

MELLO, M.F.F. *Preparação e determinação da atividade toxicológica do pró-fármaco hidroximetilnitrofural, potencialmente antichagásico*. Araquara, 2006. Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

MEHROTRA, A.; ANDIT, J.K. Critical process parameters evaluation of modified nanoprecipitation method on lomustine nanoparticles and cytostatic activity study on L132 human cancer cell line. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, v.3, n.8, p.1-8, 2012.

MODER, K. Alternatives to F-test in one way ANOVA in case of heterogeneity of variances (a simulation study). *Psychological Test and Assessment Modeling*, v.52, p.343-353, 2010.

MONTGOMERY, C.D. *Introdução ao controle estatístico da qualidade*. 4.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2004. 513p.

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

MULIK, R.S.; MONKKONEN, J.; JUVONEN R.O.; MAHADIK, R.R.; PARADKAR, A.R. ApoE3 mediated poly(butyl)cianoacrylate nanoparticles containing curcumin: study of enhanced activity of curcumin against beta amyloid induced cytotoxicity using *in vitro* cell culture model. *Molecular Pharmaceutics*, v.7, n.3, p.815-825, 2010.

NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Synthesis of poly(alkylcyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v.1, n.1, p.111–127, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of Leishmaniasis, WHO, 2006. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em: 23 jan. 2012. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2010. 186p. (WHO technical report series, 949).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2010. 172p.

PITA, S.S.; PASCUTTI, P.G. Alvos terapêuticos na doença de chagas: a tripanotona redutase como foco. *Revista Virtual de Química*, v.3, n.4, p.307-324, 2011.

POKHREL, S.; REIDPATH, D.; ALLOTEY, P. Social sciences research in neglected tropical diseases: investment in social science research in neglected diseases of poverty: a case study of Bill and Melinda Gates Foundation. *Health Research Policy and Systems*, v.9, n.2, p.1-6, 2011. Disponível em: <http://www.health-policy-systems.com/content/pdf/1478-4505-9-2.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2012.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, v.36, p.887–913, 2011.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemistry & Pharmacology*, v.55, p.803-810, 1998.

REN, F.; CHEN, R.; WANG, Y.; SUN, Y.; JIANG, Y.; LI, G. Paclitaxel-loaded poly(n-butylcyanoacrylate). nanoparticle delivery system to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. *Pharmaceutical Research*, v.28, n.4, p.897–906, 2011.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.C.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v.31, n.1, p.164-171, 2008.

SHAM, J.O.; ZHANG, Y.; FINLAY, W.H.; ROA, W.H.; LOBENBERG, R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. *International Journal of Pharmaceutics*, v.28, n.269, p.457-467, 2004.

SHRINIDH, A.; JOSHI, S.; SANDIP, S.; CHAVHAN, K.; KRUTIKA, K. Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: preparation, optimization, characterization, *in vitro* and pharmacodynamic studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.76, p.189–199, 2010.

SOFLAEI, S.; DALIMI, A.; GHAFARIFAR, F.; SHAKIBAIE, M.; SHAHVERDI, A.R.; SHAFIEPOUR, M. *In vitro* antiparasitic and apoptotic effects of antimony sulfide nanoparticles on *Leishmania infantum*. *Journal of Parasitology Research*, v.2012, n.756568, p.1-7, 2012. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jpr/2012/756568/>. Acesso em: 23 dez.2012.

SOMMERFELD, P.; SCHROEDER, U.; BERNHARD, A. Long-term stability of PBCA nanoparticle suspensions suggests clinical usefulness. *International Journal of Pharmaceutics*, v.155, p.201–207, 1997.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.; Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, n.70, p.1-20, 2001.

SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.105, p.1-6, 2011.

TAVARES, G.M.; ISHIKAWA, G.M.; MONTEIRO, T.F.; ZANOLINI, C.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; BOU-CHACRA, N.A.; CONSIGLIERI, V.O. Derivative spectrophotometric method for determination of acyclovir in polymeric nanoparticles. *Química Nova*, v.35, n.1, p.203-206, 2011.

WATERS. *Waters 996 photodiode detector: Peak purity I. What is peak analysis, performance perspectives*. Midford: Waters Corporation, 1996.

WATERS. *Waters 996 photodiode detector: Peak purity II. Peak purity plot, performance perspectives*. Midford: Waters Corporation, 1996.

WATERS. *Waters 996 photodiode detector: Peak purity III. Interpretation of peak purity plots, performance perspectives*. Midford: Waters Corporation, 1996.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; GEORGENS, C.; RAIS, I.; KREUTER, J.; KARAS, M.; WOLKENHAUER, M.; ZIMMERD, A. Physicochemical characterisation of cationic polybutylcyanoacrylate nanoparticles by fluorescence correlation spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.25–35, 2004.

WOLF, E. L. *Introduction, in Nanophysics and Nanotechnology: An Introduction to Modern Concepts in Nanoscience*, Second Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2003.

WU, M.; DELLACHERIE, E.; DURAND, A.; MARIE, E. Poly(n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization (1): Dextran-based surfactants. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, v.69, p.141–146, 2009.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. *Reviewer guidance: validation of chromatographic methods*. Rockville: FDA, 1994. 30p.

YAP, B.W.; SIM, C.H. Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, v.81, n.12, p.2141–2155, 2011.

YORDANOV, G.; SKROBANSKA, R.; EVANGELATOV, A. Colloidal formulations of etoposide based on Poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation, physicochemical properties and cytotoxicity. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces*, v.101, p.215-222, 2013.

YORDANOV, G. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of econazole-loaded poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanoparticles

Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects, v.413, p.260–265, 2012.

ZHANG, L.; GU, F.X.; CHAN, J.M.; WANG, A.Z.; LANGER, R.S., FAROKHZAD, O.C. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v.83, n.5, p.761-769, 2008.

ANEXO A

Durbin-Watson

O teste de Durbin-Watson é utilizado para detectar a presença de autocorrelação (dependência) nos resíduos de uma análise de regressão. Este teste é baseado na suposição de que os erros no modelo de regressão são gerados por um processo autoregressivo de primeira ordem, de acordo com:

$$\varepsilon_i = \rho \varepsilon_{i-1} + a_i$$

em que ε_i é o termo do erro do modelo na i -ésima observação, $a_i \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma_a^2)$ e $|\rho| < 1$ é o parâmetro de autocorrelação. Testamos a presença de autocorrelação por meio das hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \rho = 0. \\ H_1 : \rho \neq 0. \end{cases}$$

Sendo o ε_i resíduo associado a i -ésima observação, temos que a estatística do teste de Durbin-Watson é dada por:

$$dw = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2},$$

em que $0 \leq dw \leq 4$. A distribuição de dw depende da matriz X . Entretanto, podemos tomar a decisão comparando o valor de dw com os valores críticos d_L e d_U da Tabela de Durbin-Watson. Assim,

•se:

$0 \leq dw < d_L \Rightarrow$ rejeitamos H_0 (dependência);

•se:

$d_L \leq dw \leq d_U \Rightarrow$ o teste é inconclusivo;

•se:

$d_U < dw < 4 - d_U \Rightarrow$ não rejeitamos H_0 (independência);

•se:

$4 - d_U \leq dw \leq 4 - d_L \Rightarrow$ o teste é inconclusivo;

•se:

$4 - d_L < dw \leq 4 \Rightarrow$ rejeitamos H_0 (dependência).

Quando $0 \leq dw < d_L$ temos evidência de uma correlação positiva. Já quando $4 - d_L < dw \leq 4$, a correlação é negativa. No caso em que não rejeitamos H_0 , temos que não existe autocorrelação, ou seja, os resíduos são independentes. Podemos também tomar a decisão pelo p-valor.

ANEXO B

Anderson-Darling

O teste de Anderson-Darling é realizado para testar se uma amostra de dados veio de uma população de distribuição específica. Faz uso da distribuição específica no cálculo dos valores críticos, com vantagem de permitir um teste mais sensível.

O teste de normalidade de Anderson-Darling foi efetuado para verificar a probabilidade normal dos dados.

$$A = A^2 \times \left[1 + \frac{0,75}{n} + \frac{2,25}{n^2} \right]$$

$$A^2 = -\sum_{i=1}^n \left[(2i-1) \times \frac{\ln \Phi_{(xi)} + \ln(1 - \Phi_{(xn+1-i)})}{n} \right] - n$$

Onde: Φ = Função de distribuição normal acumulada. Se A exceder valor crítico de 0,752, o nível de significância de 5% rejeita que a distribuição seja normal.

n = tamanho da amostra.

ANEXO C

Teste de Bartlett

O teste de Bartlett é utilizado para testar se as amostras de populações apresentam variâncias iguais, chamada homocedasticidade ou homogeneidade das variâncias. O teste foi usado para testar a hipótese nula H_0 , onde todas as variações da população são iguais, contra alternativa de que pelo menos duas são diferentes. Considerando k número de amostras e n_i o tamanho e variância da amostra (Bartlett, 1937).

$$X^2 = \frac{(N - k) \ln(S_p^2) - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln(S_i^2)}{1 + \frac{1}{3(k-1)} \left(\sum_{i=1}^k \left(\frac{1}{n_i - 1} \right) - \frac{1}{N - k} \right)}$$

Onde:

$$N = \sum_{i=1}^k n_i$$

$$S_p^2 = \frac{1}{N - k} \sum_i (n_i - 1) S_i^2 \quad = \text{estimativa conjunta das variâncias}$$

ANEXO D

Teste de Levene

O teste de Levene é uma alternativa ao teste de Bartlett, quando conjunto de dados não apresenta distribuição normal.

Este procedimento consiste em fazer uma transformação dos dados originais e aplicar aos dados transformados o teste da ANOVA. Levene propôs a seguinte transformação:

$$z_{ij} = |x_{ij} - \bar{x}_{i.}|, \quad i = 1, \dots, k, \quad \text{e} \quad j = 1, \dots, n_i$$

Onde:

z_{ij} : representa os dados após transformação

x_{ij} : representa os dados originais; e

$\bar{x}_{i.}$: representa a média do nível i , para os dados originais

Uma transformação (robusta) alternativa considerada para o procedimento de Levene, proposto por Brown, é substituir a média do nível pela mediana.

Para obter a mediana devemos, em primeiro lugar, ordenar os dados do menor para o maior valor. Se o número de dados for ímpar, a mediana será o dado central. Se o número de dados for par, a mediana será a média aritmética dos dois dados centrais.

Com isso, a expressão a seguir é substituída por:

$$z_{ij} = |x_{ij} - \tilde{x}_{i.}|, \quad i = 1, \dots, k, \quad \text{e} \quad j = 1, \dots, n_i(1)$$

Onde:

z_{ij} : representa os dados após transformação

x_{ij} : representa os dados originais; e

$\tilde{x}_{i.}$: representa a mediana do nível i , para os dados originais.

Após a transformação dos dados originais pela expressão (1), aplicamos o teste da ANOVA. Se a estatística F for significativa rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias.

ANEXO E

ANOVA

Equações aplicadas aos cálculos estatísticos da ANOVA relativo à análise de variância das médias entre k populações.

O teste relativo à análise de variância das médias entre k populações pode ser expresso por:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_K$$

No programa MINTAB® o valor de p é empregado como menor valor que levaria à rejeição da hipótese nula H_0 .

Se o valor de $p \leq 0,05$, para $\alpha = 0,05$ (nível de significância de 95%), então rejeita-se H_0 (hipótese da igualdade das médias)

Soma dos Quadrados para análise da variância (informa se há diferença entre as médias) com iguais tamanhos de amostra em cada tratamento são:

$$SQ_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{y^2}{N}$$

$$SQ_{TRATAMENTOS} = \sum_{i=1}^a \frac{y_i^2}{n} - \frac{y_{..}^2}{N}$$

A soma dos quadrados dos erros é obtida por subtração como:

$$SQ_E = SQ_T - SQ_{TRATAMENTOS}$$

Fonte de variação	Soma de Quadrados	Grau de liberdade	Média Quadrática	Estatística F
Tratamento	$SQ_{tratamentos}$	$a - 1$	$MQ_{tratamentos}$	$\frac{MQ_{tratamentos}}{MQ_E}$
Erro	SQ_E	$a(n - 1)$	MQ_E	
Total	SQ_T	$an - 1$		

Fonte: Montgomery (2004)

Média quadrática do erro:

$$MQ_E = \frac{SQ_E}{a(n - 1)}$$

ANEXO F

Tabela Durbin Watson

n	k=1		k=2		k=3		k=4		k=5	
	dL	dU	dL	dU	dL	dU	dL	dU	dL	dU
6	0.6102	1.4002								
7	0.6996	1.3564	0.4672	1.8964						
8	0.7629	1.3324	0.5591	1.7771	0.3674	2.2866				
9	0.8243	1.3199	0.6291	1.6993	0.4548	2.1282	0.2957	2.5881		
10	0.8791	1.3197	0.6972	1.6413	0.5253	2.0163	0.3760	2.4137	0.2427	2.8217
11	0.9273	1.3241	0.7580	1.6044	0.5948	1.9280	0.4441	2.2833	0.3155	2.6446
12	0.9708	1.3314	0.8122	1.5794	0.6577	1.8640	0.5120	2.1766	0.3796	2.5061
13	1.0097	1.3404	0.8612	1.5621	0.7147	1.8159	0.5745	2.0943	0.4445	2.3897
14	1.0450	1.3503	0.9054	1.5507	0.7667	1.7788	0.6321	2.0296	0.5052	2.2959
15	1.0770	1.3605	0.9455	1.5432	0.8140	1.7501	0.6852	1.9774	0.5620	2.2198
16	1.1062	1.3709	0.9820	1.5386	0.8572	1.7277	0.7340	1.9351	0.6150	2.1567
17	1.1330	1.3812	1.0154	1.5361	0.8968	1.7101	0.7790	1.9005	0.6641	2.1041
18	1.1576	1.3913	1.0461	1.5353	0.9331	1.6961	0.8204	1.8719	0.7098	2.0600
19	1.1804	1.4012	1.0743	1.5355	0.9666	1.6851	0.8588	1.8482	0.7523	2.0226
20	1.2015	1.4107	1.1004	1.5367	0.9976	1.6763	0.8943	1.8283	0.7918	1.9908
21	1.2212	1.4200	1.1246	1.5385	1.0262	1.6694	0.9272	1.8116	0.8286	1.9635
22	1.2395	1.4289	1.1471	1.5408	1.0529	1.6640	0.9578	1.7974	0.8629	1.9400
23	1.2567	1.4375	1.1682	1.5435	1.0778	1.6597	0.9864	1.7855	0.8949	1.9196
24	1.2728	1.4458	1.1878	1.5464	1.1010	1.6565	1.0131	1.7753	0.9249	1.9018
25	1.2879	1.4537	1.2063	1.5495	1.1228	1.6540	1.0381	1.7666	0.9530	1.8863
26	1.3022	1.4614	1.2236	1.5528	1.1432	1.6523	1.0616	1.7591	0.9794	1.8727
27	1.3157	1.4688	1.2399	1.5562	1.1624	1.6510	1.0836	1.7527	1.0042	1.8608
28	1.3284	1.4759	1.2553	1.5596	1.1805	1.6503	1.1044	1.7473	1.0276	1.8502
29	1.3405	1.4828	1.2699	1.5631	1.1976	1.6499	1.1241	1.7426	1.0497	1.8409
30	1.3520	1.4894	1.2837	1.5666	1.2138	1.6498	1.1426	1.7386	1.0706	1.8326
31	1.3630	1.4957	1.2969	1.5701	1.2292	1.6500	1.1602	1.7352	1.0904	1.8252
32	1.3734	1.5019	1.3093	1.5736	1.2437	1.6505	1.1769	1.7323	1.1092	1.8187
33	1.3834	1.5078	1.3212	1.5770	1.2576	1.6511	1.1927	1.7298	1.1270	1.8128
34	1.3929	1.5136	1.3325	1.5805	1.2707	1.6519	1.2078	1.7277	1.1439	1.8076
35	1.4019	1.5191	1.3433	1.5838	1.2833	1.6528	1.2221	1.7259	1.1601	1.8029
36	1.4107	1.5245	1.3537	1.5872	1.2953	1.6539	1.2358	1.7245	1.1755	1.7987
37	1.4190	1.5297	1.3635	1.5904	1.3068	1.6550	1.2489	1.7233	1.1901	1.7950
38	1.4270	1.5348	1.3730	1.5937	1.3177	1.6563	1.2614	1.7223	1.2042	1.7916
39	1.4347	1.5396	1.3821	1.5969	1.3283	1.6575	1.2734	1.7215	1.2176	1.7886
40	1.4421	1.5444	1.3908	1.6000	1.3384	1.6589	1.2848	1.7209	1.2305	1.7859
41	1.4493	1.5490	1.3992	1.6031	1.3480	1.6603	1.2958	1.7205	1.2428	1.7835
42	1.4562	1.5534	1.4073	1.6061	1.3573	1.6617	1.3064	1.7202	1.2546	1.7814
43	1.4628	1.5577	1.4151	1.6091	1.3663	1.6632	1.3166	1.7200	1.2660	1.7794
44	1.4692	1.5619	1.4226	1.6120	1.3749	1.6647	1.3263	1.7200	1.2769	1.7777
45	1.4754	1.5660	1.4298	1.6148	1.3832	1.6662	1.3357	1.7200	1.2874	1.7762
46	1.4814	1.5700	1.4368	1.6176	1.3912	1.6677	1.3448	1.7201	1.2976	1.7748
47	1.4872	1.5739	1.4435	1.6204	1.3989	1.6692	1.3535	1.7203	1.3073	1.7736
48	1.4928	1.5776	1.4500	1.6231	1.4064	1.6708	1.3619	1.7206	1.3167	1.7725
49	1.4982	1.5813	1.4564	1.6257	1.4136	1.6723	1.3701	1.7210	1.3258	1.7716
50	1.5035	1.5849	1.4625	1.6283	1.4206	1.6739	1.3779	1.7214	1.3346	1.7708
51	1.5086	1.5884	1.4684	1.6309	1.4273	1.6754	1.3855	1.7218	1.3431	1.7701
52	1.5135	1.5917	1.4741	1.6334	1.4339	1.6769	1.3929	1.7223	1.3512	1.7694
53	1.5183	1.5951	1.4797	1.6359	1.4402	1.6785	1.4000	1.7228	1.3592	1.7689
54	1.5230	1.5983	1.4851	1.6383	1.4464	1.6800	1.4069	1.7234	1.3669	1.7684
55	1.5276	1.6014	1.4903	1.6406	1.4523	1.6815	1.4136	1.7240	1.3743	1.7681
56	1.5320	1.6045	1.4954	1.6430	1.4581	1.6830	1.4201	1.7246	1.3815	1.7678
57	1.5363	1.6075	1.5004	1.6452	1.4637	1.6845	1.4264	1.7253	1.3885	1.7675
58	1.5405	1.6105	1.5052	1.6475	1.4692	1.6860	1.4325	1.7259	1.3953	1.7673
59	1.5446	1.6134	1.5099	1.6497	1.4745	1.6875	1.4385	1.7266	1.4019	1.7672
60	1.5485	1.6162	1.5144	1.6518	1.4797	1.6889	1.4443	1.7274	1.4083	1.7671
61	1.5524	1.6189	1.5189	1.6540	1.4847	1.6904	1.4499	1.7281	1.4146	1.7671
62	1.5562	1.6216	1.5232	1.6561	1.4896	1.6918	1.4554	1.7288	1.4206	1.7671
63	1.5599	1.6243	1.5274	1.6581	1.4943	1.6932	1.4607	1.7296	1.4265	1.7671
64	1.5635	1.6268	1.5315	1.6601	1.4990	1.6946	1.4659	1.7303	1.4322	1.7672
65	1.5670	1.6294	1.5355	1.6621	1.5035	1.6960	1.4709	1.7311	1.4378	1.7673
66	1.5704	1.6318	1.5395	1.6640	1.5079	1.6974	1.4758	1.7319	1.4433	1.7675
67	1.5738	1.6343	1.5433	1.6660	1.5122	1.6988	1.4806	1.7327	1.4486	1.7676
68	1.5771	1.6367	1.5470	1.6678	1.5164	1.7001	1.4853	1.7335	1.4537	1.7678
69	1.5803	1.6390	1.5507	1.6697	1.5205	1.7015	1.4899	1.7343	1.4588	1.7680
70	1.5834	1.6413	1.5542	1.6715	1.5245	1.7028	1.4943	1.7351	1.4637	1.7683

ANEXO G

Atividades Acadêmicas

Resumo das atividades acadêmicas desenvolvidas

- Participação em eventos:

- ✓ *Cursos*

- (1) Curso: Impurezas e Estudos de Degradação Forçada para Fármacos e Medicamentos. Workshop U.S. Pharmacopeia Brasil, 16 horas, Tamboré - Barueri, 2011.
- (2) Curso: Estabilidade Farmacêutica. Workshop U.S. Pharmacopeia Brasil, 16 horas, Tamboré - Barueri, 2011.
- (3) Curso: Testes Microbiológicos da USP – Métodos Rápidos Workshop U.S. Pharmacopeia Brasil, 16 horas, Tamboré - Barueri, 2011.
- (4) Workshop: Tendências no Desenvolvimento de Formulações Farmacêuticas: Dissolução e o Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Simulations Plus, Inc. (Lancaster, Califórnia) e Sindusfarma – Sindicato da Indústria de Produtos Farmacêuticos no Estado de São Paulo, 6 horas, São Paulo, 2011.

- ✓ *Comunicações em Reuniões Científicas*

- (1) International Seminar of Nanotechnology, São Paulo, SP
 - MONTEIRO, L.M.; KANASHIRO, E.; COTRIM, P.C.; BOU-CHACRA, N.A. Development of *in Vitro* Method for the Evaluation of Leishmanicidal Activity of Nanostructured Hydroxymethynitrofural, 2011.

- (2) XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
 - MONTEIRO, L.M.; RONDON, B.; SILVA, L.; FERREIRA, E.I.; BOU-CHACRA, N.A. Development and Method Validation to Evaluate the Entrapment Efficiency of Polymeric Nanoparticles Containing a New Antileishmanial Drug: Hydroxymethylnitrofurazone.

ANEXO H

Ficha do Aluno

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas****FICHA DO ALUNO**

9139 - 7348244/1 - Lis Marie Monteiro

Email:	lismarie@usp.br
Data de Nascimento:	12/08/1983
Cédula de Identidade:	RG - 6.218.177-0 - PR
Local de Nascimento:	Estado do Paraná
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Estadual de Londrina - Paraná - Brasil - 2006

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	01/02/2011
Início da Contagem de Prazo:	01/02/2011
Data Limite:	02/08/2013
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Nádia Araci Bou Chacra - 01/02/2011 até o presente. E.Mail: chacra@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 01/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 11/04/2012
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 01/02/2011 Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred .	Freq .	Conc .	Exc .	Situação
FBF5777-2/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	10/03/2011	22/06/2011	45	3	80	A	N	Concluída
FBF5798-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Introduction to nanotechnology-based drug delivery systems and drug targeting)	25/04/2011	08/05/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5722-6/2	Espectrofotometria Diferencial no Controle de Qualidade de Medicamentos	10/08/2011	05/10/2011	45	3	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/7	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	23/08/2011	14/11/2011	120	8	83,3	A	N	Concluída
FBF5751-7/1	Introdução aos Métodos Termoanalíticos	23/08/2011	31/10/2011	150	10	98	A	N	Concluída
FBF5804-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Avanços no Controle Microbiológico de Qualidade aplicado a Medicamentos)	24/10/2011	06/11/2011	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	30

Estágios:			
Total:	0	25	30

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP