



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**JEAN CARLO DE SOUSA E SILVA**

**RIGIDEZ DE MEMBRANA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*  
CAUSADA POR LIPOSSOMAS CONTENDO MILTEFOSINA E/OU  
ANFOTERICINA B**

**GOIÂNIA  
SETEMBRO/2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE FÍSICA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

**E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação     Tese     Outro\*: \_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

**Exemplos:** Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

**2. Nome completo do autor**

Jean Carlo de Sousa e Silva

**3. Título do trabalho**

Rigidez de membrana em *Leishmania amazonensis* causada por lipossomas contendo miltefosina e/ou anfotericina B

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo**

**orientador)** Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: **a)** consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

---

- Solicitação de registro de patente;

- Submissão de artigo em revista científica;- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 18/09/2024, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jean Carlo De Sousa E Silva, Discente**, em 19/09/2024, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4833072** e o código CRC **BE3C763A**.

JEAN CARLO DE SOUSA E SILVA

**RIGIDEZ DE MEMBRANA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*  
CAUSADA POR LIPOSSOMAS CONTENDO MILTEFOSINA E/OU  
ANFOTERICINA B**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Física, do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Doutorado em Física.

Área de concentração: Física  
Linha de pesquisa: Biofísica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso

GOIÂNIA  
**SETEMBRO/2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Sousa e Silva, Jean Carlo de

Rigidez de membrana em leishmania amazonensis causada por lipossomas contendo miltefosina e/ou anfotericina B [manuscrito] / Jean Carlo de Sousa e Silva. - 2024. LXXIX, 79 f.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Leishmania. 2. Miltefosina. 3. Anfotericina B. 4. EPR. 5. Rigidez de membrana. I. Alonso, Antonio, orient. II. Título.

CDU 53



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 74 da sessão de Defesa de Tese de Jean Carlo de Sousa e Silva que confere o título de Doutor em Física, na área de concentração em Física.

Aos 06 dias do mês de setembro de 2024, a partir das 13h00min, no Laboratório de Mídias do Instituto de Física da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "Rigidez de membrana em *Leishmania amazonensis* causada por lipossomas contendo miltefosina e/ou anfotericina B". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Antonio Alonso (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor Rodrigo Saar Gomes (IPTSP/UFG), membro titular externo; Professora Doutora Eliana Martins Lima (FF/UFG), membro titular externo; Professor Doutor Kleber Santiago Freitas e Silva (FF/UFG), membro titular externo; e Professor Doutor Sebastião Antônio Mendanha Neto (IF/UFG), membro titular interno. Durante a arguição, os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese, tendo sido o candidato aprovado pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Antonio Alonso, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 06 dias do mês de setembro de 2024.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 06/09/2024, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastiao Antonio Mendanha Neto, Professor do Magistério Superior**, em 06/09/2024, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Saar Gomes, Usuário Externo**, em 06/09/2024, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kleber Santiago Freitas e Silva, Usuário Externo**, em 06/09/2024, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliana Martins Lima, Professora do Magistério Superior**, em 13/09/2024, às 13:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

*"Dado após dado, espectro após espectro, a verdade que é enfatizada a cada avanço da Ciência é esta, que grandes são as obras do Senhor."*

**Joseph John Thomson (1856 - 1940)**

*Prêmio Nobel em Física 1906*

*Pai da Espectrometria de Massas e da Física Atômica*

## AGRADECIMENTOS

É impossível não agradecer a Deus, pois por meio d'Ele e para Ele são todas as coisas. Além disso, se não fosse pela Sua graça e misericórdia em me conceder vida e saúde, nada poderia ser feito.

À minha amada esposa, fiel companheira, que sempre me ajudou, fortaleceu e acompanhou durante esse doutorado.

Aos meus filhos, Enzo Gabriel e Emanuel, que são meu combustível para qualquer jornada, por mais árdua que seja.

Aos meus pais, que sempre me sustentaram, ajudaram e motivaram, dando sempre o melhor de si por mim.

À minha irmã, Valdo, Felipe e Beatriz, que me fortaleceram, aconselharam e apoiaram.

À Dn. Vanda, Sr. Nelson e Rafael, que são sempre uma rede de apoio.

Ao Prof. Dr. Antonio Alonso, por toda a sua humanidade na orientação desse trabalho. Deus não poderia ter me conduzido a um orientador melhor.

Aos amigos Tiago Godoi, Solange, Alice e Davi, que sempre me acompanharam e ampararam.

Aos colegas da BioFísica, Eder e Elyêssa pelo companheirismo e imensa contribuição.

Ao FARMATEC por ter proporcionado a preparação e caracterização dos lipossomas. Além da estrutura física aos colegas em especial ao Prof. Dr. Sebastião, pela prontidão em ajudar, assim como seu filho científico Lucas, que não mediram esforços para me auxiliar. Além da colaboração do Dr. Kleber com o cultivo dos parasitas e macrófagos e do Tácio com a quantificação dos fármacos.

À UFG, pela oportunidade de pesquisa com docentes e laboratórios excepcionais.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical, ainda negligenciada, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, representando um sério problema de saúde pública em muitas regiões do mundo. Neste estudo, foram preparadas formulações de lipossomas contendo os fármacos leishmanicidas miltefosina (MTF) e anfotericina B (AmB). Os lipossomas devem funcionar como veículos para os fármacos, dispensando o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos e auxiliando na entrega deles às células alvos.

Para caracterizar os lipossomas foi feita a análise por DLS para avaliar o tamanho das vesículas, o potencial Zeta para avaliar a estabilidade dos lipossomas, a quantificação de fármacos para estimar as perdas durante o processo de preparação usando o HPLC para os lipossomas com MTF e absorvância para os lipossomas contendo AmB. A Ressonância paramagnética eletrônica (RPE), foi utilizada para desvendar as interações cruciais dos fármacos com a membrana dos lipossomos, do estrato córneo (EC), dos parasitas e dos macrófagos, pavimentando o caminho para avanços significativos na compreensão do mecanismo de ação dos mesmos.

As formulações foram aplicadas no EC com a finalidade de avaliar o resultado da interação desses com os lipossomas. Os dados de RPE revelaram que as formulações contendo fosfatidilcolina de soja (PC) causaram um aumento na fluidez no estrato córneo enquanto as contendo diestearoilfosfatidilglicerol (um lipídio da AmB lipossomal comercial) não causam alterações. O aumento de fluidez proporcionado pela PC deve facilitar a entrega direcionada dos compostos aos parasitas, aumentando assim a eficiência terapêutica no caso do tratamento tópico da leishmaniose cutânea.

Os fármacos, quando encapsulados em lipossomas, também causaram aumento de rigidez nas membranas de *Leishmanias* após 24 h de exposição, sugerindo que ambos os fármacos geram estresse oxidativo no parasita. Entretanto, as formulações não causaram alterações na membrana do macrófago não infectado. Por outro lado, causaram rigidez de membrana no sistema de macrófagos infectados por *Leishmania* em concentrações na faixa de seus valores de IC<sub>50</sub> em promastigotas. Os dados de RPE também indicaram que as membranas do sistema macrófago-amastigota podem sofrer processos oxidativos mesmo sem tratamento.

Este trabalho mostrou ainda que tanto a MTF quanto o AmB são drogas ativas na membrana plasmática do parasita da *Leishmania* e sugerem que seus mecanismos de atividade antileishmania estão associados aos seus efeitos primários na membrana celular. O aumento de fluidez causado pela MTF, ou a formação de poros produzida pela AmB, são alterações de membrana que podem provavelmente resultar em vazamento iônico, levando a despolarização da membrana plasmática, que por sua vez deve hiperpolarizar a membrana mitocondrial e, assim, aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), desencadeando outros eventos, como a rigidez de membrana, que resultam na morte do parasita.

Esses achados têm potencial de contribuir significativamente para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e seguras para o tratamento da leishmaniose. No entanto, são necessários estudos adicionais para validar esses resultados em ensaios clínicos e para aprimorar ainda mais as formulações lipossomais.

**Palavras-chave:** *Leishmania*; miltefosina; anfotericina B, ressonância paramagnética eletrônica; Rigidez de membrana em *leishmania amazonensis* causada por lipossomas contendo miltefosina e/ou anfotericina B; estresse oxidativo; marcador de spin

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a tropical disease, still neglected, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, representing a serious public health problem in many regions of the world. In this study, liposome formulations containing the leishmanicidal drugs miltefosine (MTF) and amphotericin B (AmB) were prepared. The liposomes are intended to function as carriers for the drugs, eliminating the need for potentially toxic organic solvents and aiding in their delivery to target cells.

To characterize the liposomes, Dynamic Light Scattering (DLS) analysis was performed to assess vesicle size, and Zeta potential was measured to evaluate liposome stability. Drug quantification was carried out to estimate losses during the preparation process, using HPLC for MTF-containing liposomes and absorbance for AmB-containing liposomes. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) was employed to uncover the crucial interactions of the drugs with the liposome membrane, the stratum corneum (SC), parasites, and macrophages, paving the way for significant advancements in the understanding of their mechanism of action.

The formulations were applied to the SC to evaluate the outcome of their interaction with the liposomes. EPR data revealed that formulations containing soybean phosphatidylcholine (PC) caused an increase in stratum corneum fluidity, while those containing distearoylphosphatidylglycerol (a lipid found in commercial liposomal AmB) did not cause significant changes. The increase in fluidity provided by PC is expected to facilitate the targeted delivery of the compounds to the parasites, thereby enhancing therapeutic efficacy in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis.

The drugs, when encapsulated in liposomes, also caused increased rigidity in *Leishmania* membranes after 24 hours of exposure, suggesting that both drugs generate oxidative stress in the parasite. However, the formulations did not cause changes in the membrane of the uninfected macrophage. On the other hand, they caused membrane rigidity in the system of *Leishmania*-infected macrophages at concentrations in the range of their IC<sub>50</sub> values in promastigotes. The EPR data also indicated that the membranes of the macrophage-amastigote system can also undergo oxidative processes even without treatment.

This work further showed that both MTF and AmB are active drugs at the plasma membrane of the *Leishmania* parasite and suggest that their antileishmanial mechanisms of activity are associated with their primary effects on the cell membrane. The increase in fluidity caused by MTF or the pore formation produced by AmB are membrane alterations that can likely result in ionic leakage, leading to plasma membrane depolarization, which in turn should hyperpolarize the mitochondrial membrane and thus increase the formation of reactive oxygen species (ROS), triggering other events such as membrane rigidity, which result in the death of the parasite.

These findings have the potential to significantly contribute to the development of more effective and safer therapies for the treatment of leishmaniasis. However, additional studies are needed to validate these results in clinical trials and to further improve the liposomal formulations.

**Key-words:** *Leishmania*; miltefosine; amphotericin B; electron paramagnetic resonance; Membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* caused by liposomes containing miltefosine and/or amphotericin B; oxidative stress; spin label.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
1.1. LEISHMANIOSE.....	24
1.1.1. Sintomas.....	27
1.1.2. Tratamento.....	27
1.1.3. Miltefosina.....	28
1.1.4. Anfotericina B.....	30
1.2. CARREADORES LIPOSSOMAIS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
1.3. MACROFÁGO E ESTRATO CÓRNEO.....	33
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>3. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....</b>	<b>37</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1. PRODUTOS QUÍMICOS .....	51
4.2. LIPOSSOMAS SINTÉTICOS.....	51
4.2.1. Lipossomas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2. Caracterização dos Lipossomas.....	53
4.3. MARCADORES DE SPIN UTILIZADOS .....	53
4.3.1. Marcador de spin 5-DSA.....	53
4.3.2. Marcador de spin 5-PC.....	54
4.4. CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE RPE.....	55
4.5. ESPECTROSCOPIA DE RPE NAS FORMULAÇÕES.....	55
4.6. ESPECTROSCOPIA DE RPE NO ESTRATO CÓRNEO.....	56
4.7. PARASITAS E CULTURAS DE MACRÓFAGOS.....	56
4.8. ESPECTROSCOPIA DE RPE EM PROMASTIGOTAS E MACRÓFAGOS .....	57
4.9. MTT .....	58
4.10. PROCESSAMENTO DE DADOS.....	59
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS .....	60
5.2. ESPECTROSCOPIA DE RPE NOS LIPOSSOMAS .....	62
5.3. FORMULAÇÕES CONTENDO PC POSSUEM EFEITO FLUIDIZANTE NOS LÍPÍDEOS DO ESTRATO CÓRNEO.....	64
5.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LEISHMANIAS.....	67
5.5. ESPECTROSCOPIA DE RPE NO ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DAS FORMULAÇÕES EM LEISHMANIAS .....	69
5.5.1. A presença física das formulações não mostrou efeito na membrana de Leishmania.....	69
5.5.2. Formulações causam rigidez de membrana no parasita da Leishmania.....	70
5.5.3. A rigidez da membrana causada pelas formulações pode ser atribuída ao estresse oxidativo ....	74
5.6. ESPECTROSCOPIA DE RPE EM MACRÓFAGO .....	76
5.6.1. Sem efeito de presença física das formulações nos macrófagos nem mesmo efeito de rigidez após 24 h de tratamento.....	76
5.7. ESPECTROSCOPIA DE RPE EM MACRÓFAGO INFECTADO POR LEISHMANIA .....	79
5.7.1. Os lipossomas causam rigidez de membrana no sistema de macrófagos infectados pela Leishmania	79
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>83</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>

## SIGLAS E ABREVIACÕES

5-DSA - 5-DOXIL ácido esteárico

AmB - Anfotericina B

CC<sub>50</sub> - Concentração citotóxica para 50% das células

Col - Colesterol

EC – Estrato córneo

ERO – Espécie reativas de Oxigênio

SFB – Soro Fetal Bovino

HSPC - Fosfatidilcolina hidrogenada de soja

IC<sub>50</sub> - Concentração de inibição da proliferação de 50% de células

IS – Índice de seletividade

MTF - Miltefosina

MTT - (3-4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina

PBS - Tampão Fosfato Salino

PC - Fosfatidilcolina de soja

PDI - Índice de polidispersão

RPE - Ressonância paraeletromagnética eletrônica

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Formas da <i>Leishmania</i> . A – Forma amastigota, de vida intracelular. B – Forma promastigota, extracelular. ....	25
Figura 2 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	26
Figura 3 - Estrutura molecular da Miltefosina.....	28
Figura 4 - Estrutura molecular da anfotericina B. ....	30
Figura 5 - Desenhos esquemáticos ilustrando as formações dos agregados de lipídios anfipáticos em meio aquoso.....	32
Figura 6 - Desenho esquemático das camadas da epiderme com ênfase no estrato córneo. ....	34
Figura 7 - Ilustração do efeito Zeeman eletrônico.....	39
Figura 8 - Representação do Efeito Zeeman bem como das curvas de absorção e da derivada do espectro de absorção.....	42
Figura 9 - Representação do Efeito Zeeman e interação hiperfina com as curvas de absorção e da derivada do espectro de absorção. ....	43
Figura 10 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de RPE.....	43
Figura 11 - Efeito do campo de modulação na saída do detector de corrente.....	45
Figura 12 - Estrutura molecular geral do radical nitróxido. Os grupos químicos que variam de um marcador para outro estão representados por R <sub>1</sub> e R <sub>2</sub> . ....	46
Figura 13 - Radical nitróxido e seu sistema de coordenadas com os ângulos formados entre os eixos coordenados e o campo magnético. ....	48
Figura 14 - Indicação de leitura dos parâmetros A <sub>  </sub> e A <sub>⊥</sub> em um espectro de RPE. ....	49
Figura 15 - Estrutura molecular do marcador de spin 5-DSA.....	54
Figura 16 - Estrutura molecular do marcador de spin 5-PC.....	54
Figura 17 - Espectrômetro Bruker EMXplus.....	55
Figura 18 - Reação de redução de MTT em formazan.....	58
Figura 19 - Espectros representativos de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado nas <i>Leishmanias</i> tratadas com formulações por 5 min. ....	70
Figura 20 - Espectros representativos de RPE do marcador 5-DSA incorporado nas membranas de <i>Leishmanias</i> tratadas com formulações por 24 h.....	72
Figura 21 - Espectros representativos de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado na membrana plasmática de macrófagos não tratados ou tratados com 100 µL das formulações indicadas. ....	78
Figura 22 - Espectros de RPE representativos do marcador de spin 5-DSA inserido nas membranas de macrófagos J774.A1 infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Percentuais e massas dos componentes das formulações lipossomais.....	52
Tabela 2 – Tamanho e índice de polidispersão dos lipossomas das formulações. ....	60
Tabela 3 - Potencial zeta e densidade populacional dos lipossomas das formulações.....	62
Tabela 4 - Concentrações inicial e restante dos fármacos nas formulações.....	62
Tabela 5 – Valores de IC <sub>50</sub> dos lipossomas em promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . Os valores medidos em volume foram convertidos em concentrações correspondentes dos fármacos presentes nas formulações, com base na composição teórica e medida das formulações. ....	67
Tabela 6 – Valores de CC <sub>50</sub> das formulações em macrófagos J774A.1 baseado na viabilidade celular em ensaio de 24 h. ....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical causada por protozoários do gênero *Leishmania*, representando um sério problema de saúde pública em muitas regiões do mundo. Na América, existe registro da doença desde o sul estadunidense até o norte da Argentina. A leishmaniose é classificada em dois tipos: leishmaniose tegumentar ou cutânea e a leishmaniose visceral ou calazar (BRASIL, 2017). Segundo a Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, entre 2019 e 2022, a média anual de casos da leishmaniose tegumentar foi de 491 casos, contrapondo com número de casos no período de 166 casos da forma da leishmaniose visceral. No primeiro semestre de 2023, houve mais de 100 registros sendo 11 na cidade de Santa Helena de Goiás, 9 em Goiânia e 8 em Cavalcante (RODRIGUES, 2024). Existem muitos compostos conhecidos com ação leishmanicida, mas apenas alguns deles são utilizados para tratamento em humanos. A Miltefosina (MTF) foi o primeiro fármaco aprovado para uso oral no tratamento das leishmanioses. Possuindo bom êxito quanto ao tratamento (OLLIARO et al., 2005). Entretanto, depois do desenvolvimento de resistência dos parasitas a esse fármaco, a Anfotericina B (AmB) tem sido considerado o medicamento de primeira linha no tratamento da leishmaniose na Índia (KUMARI et al., 2022).

A questão reside no fato de que os medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose tegumentar ou cutânea possuem alta toxicidade, apresentam alto custo, necessidade de uso prolongado e alguns parasitas são resistentes à medicação (SUNDAR, 2018). Por conta disso, existe a necessidade de encontrar novos tratamentos tornando-os mais seguros, eficazes e mais acessíveis (MANN et al., 2021).

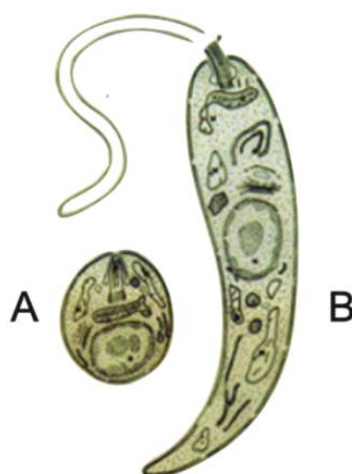
### 1.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antropozoonose, consideradas um grande problema para saúde pública por conta da sua complexidade e diversidade epidemiológica. Segundo a OMS, está entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas com mais de 12 milhões de pessoas infectadas. Sendo considerada uma doença endêmica em cerca de 100 países, estando entre as seis doenças infecciosas mais importantes por conta do seu alto coeficiente de detecção e sua capacidade de deformidades (BRASIL, 2017).

Existem dois tipos de leishmanioses, sendo do tipo tegumentar/cutânea ou visceral. A forma tegumentar é a que tem ampla distribuição mundial inclusive no nosso continente. Em Goiás, entre 2019 e 2022, a forma Tegumentar teve 491 casos enquanto a forma visceral 166

casos (RODRIGUES, 2024). Sendo que o grande desafio reside na diversidade em sua transmissão, tanto quanto nos agentes, reservatórios, bem como nos vetores. Devido a uma maior relevância, em virtude do número de casos, esse trabalho abordará a forma tegumentar da doença.

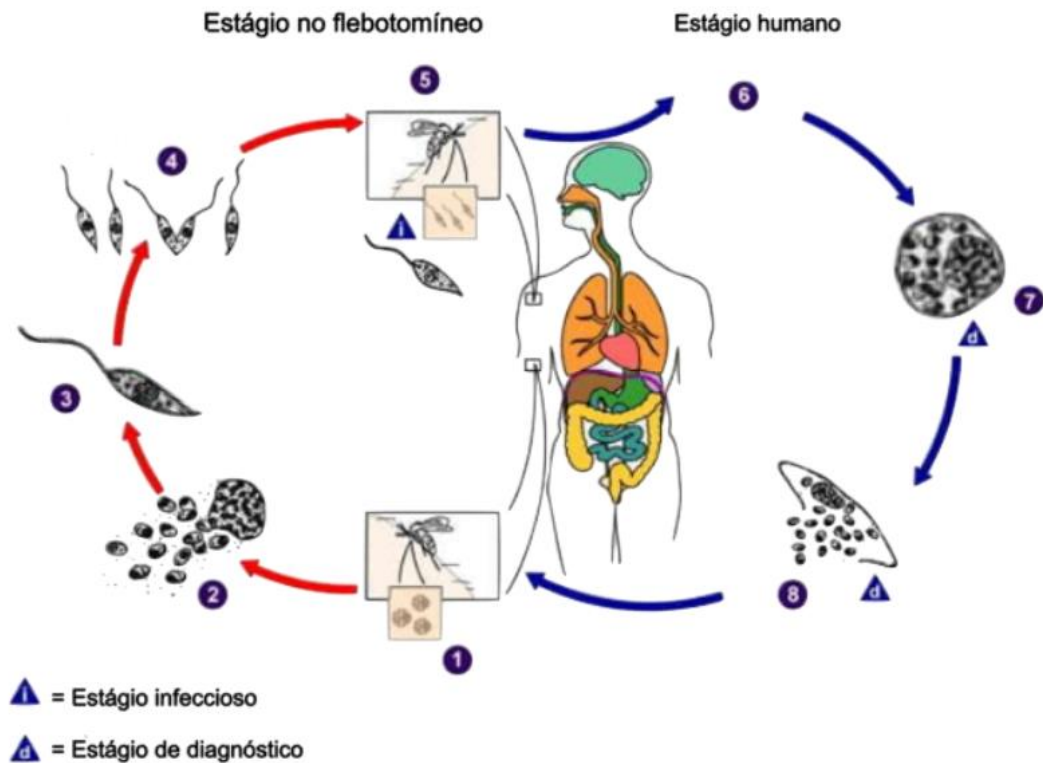
A leishmaniose tegumentar ou cutânea é uma doença infecciosa, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, mas não contagiosa. Acometendo pele e mucosas, por isso conhecida como leishmaniose cutânea. O agente etiológico é um protozoário da família *Trypanosomatidae*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagócito mononuclear. Tendo um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, alterna entre um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. Possuindo duas formas evolutivas, a forma promastigota, extracelular que possui flagelo e a forma amastigota ou aflagelada, que é intracelular e sem movimento (Figura 1).



**Figura 1 - Formas da *Leishmania*. A – Forma amastigota, de vida intracelular. B – Forma promastigota, extracelular. Figura adaptada de Roosevelt, 2007.**

Os vetores da leishmaniose tegumentar ou cutânea são os flebotomíneos, insetos do Gênero *Lutzomyia*, conhecidos como mosquito-palha, tatuquira, birigui entre outros a depender da localização geográfica. Sendo que a transmissão ocorre por meio da picada desses insetos, quando infectados. Não existindo transmissão de pessoa a pessoa (BRASIL, 2017).

O ciclo de transmissão (Figura 2) vai depender do gênero dos protozoários. No caso das *Leishmania amazonensis* tem como reservatório os roedores do gênero *Proechymis* e o *Oryzmys*. Os flebotomíneos, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. Reducta* e *Lu. Olmeca* são os vetores. Como essas espécies são pouco antropofílicas, temos menos casos de infecções humanas comparada a dos animais.



**Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania***  
 Adaptado de CDC - DPDx - *Leishmanias*

No esquema acima temos o ciclo da *Leishmania* começando quando os flebotomíneos se alimentam do sangue de um hospedeiro infectado, sendo infectados pela ingestão de macrófagos contaminados com *Leishmanias* na forma amastigotas. Em seu intestino médio, essas amastigotas se transformam em promastigotas. Em um período de 4 a 7 dias, esses parasitas se multiplicam por divisões celulares diferenciando em promastigota metacíclicas, por um processo denominado metaciclologênese, perdendo a capacidade de permanecerem fixas na parede do intestino do inseto e, portanto, migram para probóscide, nas glândulas salivares.

Na etapa 5, as fêmeas infectadas irão regurgitar os parasitas dentro da pele do hospedeiro vertebrado. As promastigotas recém-chegadas rapidamente infectam células do sistema imunológico; linfócitos T e B, macrófagos e outras células mononucleares fagocíticas, diferenciando na forma desprovida de flagelo. As amastigotas conseguem sobreviver e se multiplicar em meio ao ambiente ácido do fagolisossomo. Nessa multiplicação as células infectadas são lisadas e ocorre a liberação das amastigotas que infectarão novas células (FERNANDES, 2016).

### 1.1.1. Sintomas

A infecção das *Leishmanias* começa logo após a inoculação das promastigotas dentro da pele. Esses parasitas, na forma metacíclicas são fagocitadas, principalmente, pelos macrófagos, transformando-se em formas amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos, fagolisossoma. Nesse momento, as *Leishmanias* desenvolvem mecanismos de defesa que permitem não só sobreviverem nesse ambiente potencialmente tóxico, como também multiplicar-se até a ruptura da célula, propagando a infecção.

A principal célula efetora da eliminação das amastigotas é o próprio macrófago, após serem ativados pelos linfócitos T. Os linfócitos T, por meio da secreção da linfocina (citocinas produzidas por eles), ativam os macrófagos tornando-os capazes de destruir as amastigotas. Sendo assim, os macrófagos são hospedeiros e efetores para destruição dos parasitos, ao mesmo tempo.

A doença começa a manifestação com lesão ulcerada, com borda elevada e sem dor. Tais lesões podem ser cutâneas ou nas mucosas (oral, nasal ou genital) dependendo do tipo de espécie de protozoário envolvido. O diagnóstico é feito por meio de exame parasitológico direto.

### 1.1.2. Tratamento

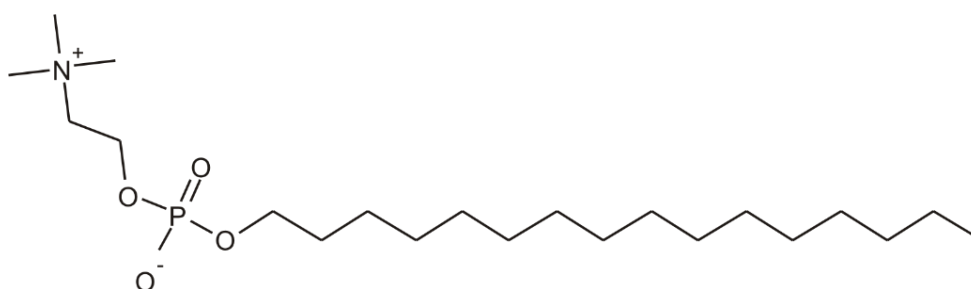
O tratamento é oferecido pelo Sistema Único de Saúde de forma gratuita. Ele é feito com medicamentos específicos, repouso e uma boa alimentação. Os medicamentos disponíveis são antimoniais estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-methyl glucamine (Glucantime), AmB (AmB dispersa em deoxicolato de sódio e suas formas lipossomais), MTF, pentamidina, pentoxifilina.

Em 2013, a Organização Pan-Americana da Saúde fez adaptações e novas recomendações à Organização Mundial de Saúde com a realidade das Américas. Com base nas evidências de segurança e eficácia desse guia e outros estudos brasileiros, o Ministério da Saúde decidiu atualizar as recomendações sobre o manejo dos pacientes com leishmaniose tegumentar ou cutânea para a realidade nacional. Assim o tratamento deve ser indicado de acordo com a forma clínica da doença e disponibilidade do medicamento (BRASIL, 2017). No manual de vigilância da leishmaniose tegumentar ou cutânea de 2017, têm-se a descrição dos tratamentos para cada uma das manifestações. Importante salientar que em todas as manifestações da leishmaniose tegumentar ou cutânea a AmB lipossomal é indicada como primeira opção em todos os casos. Sendo que os demais medicamentos, mencionados acima, podem ser indicados

como primeira ou segunda linha ou de não indicação para cada manifestação clínica. A leishmaniose é uma doença tratável e curável. Entretanto, requer um sistema imunocompetente, porque os medicamentos sozinhos não eliminarão os parasitas do corpo. Por essa razão, pode ocorrer recidiva em caso de imunossupressão (LEISHMANIASIS, 2023).

### 1.1.3. Miltefosina

Medicamento da classe das alquifosfocolinas, inicialmente utilizada no tratamento de metástase da neoplasia de mama, sendo registrada em 2002, na Índia para tratamento de Leishmaniose Visceral. A MTF ou hexadecilfosfocolina possui fórmula molecular  $C_{21}H_{46}NO_4P$  e massa molar de 407,57 g/mol. A MTF é um composto anfifílico e zwitteriônico, por conta do grupo amina quaternária carregada positivamente e do grupo fosfórico carregado negativamente (Figura 3).



**Figura 3 - Estrutura molecular da Miltefosina.**

Conforme Nota Informativa N°13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS, de 01 de Julho de 2020, a MTF foi incorporada para tratamento de Leishmaniose Tegumentar no âmbito do Sistema Único de Saúde, sendo que sua atividade antileishmania foi descrita pela primeira vez por Croft e colaboradores (1987). Existe alguns trabalhos que visam elucidar os mecanismos de ação da MTF, Lira e colaboradores (2001) com um estudo em *Trypanosoma cruzi* verificou uma inibição da biossíntese de PC do parasita, sendo que essa ação é potencializada pelo esterol. Investigação feita com Leishmanias também constatou diminuição na quantidade de PC (RAKOTOMANGA et al., 2007).

Devido sua estrutura química, a MTF possui uma alta afinidade por membranas, por essa razão, acredita-se que os primeiros alvos moleculares desse fármaco sejam no nível da membrana plasmática. Além desse ataque às membranas, há relatos de ação da MTF nas mitocôndrias, com a inibição do citocromo c oxidase além de alteração no consumo de  $O_2$  e queda nos níveis de ATP (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007).

Vários estudos usando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica observaram um aumento na fluidez da membrana plasmática das *L. amazonensis* tratadas com MTF (MOREIRA et al., 2014; FERNANDES et al., 2017; ALONSO et al., 2019; ALONSO et al., 2021). Sendo que esses aumentos de fluidez são detectados pelos marcadores de spin proteicos bem como os lipídicos, mostrando a interação da MTF tanto com as proteínas bem como com os lipídeos das membranas. Além da mudança na dinâmica molecular das membranas, existe estudo, como de Pinto-Martinez et al. (2017), que demonstram um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , além de despolarização da membrana mitocondrial, formação interna de espécies reativas de oxigênio. Outras drogas como amiodarona e dronedarona também tem como resultado de ação leshimanicida a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares (GARCÍA-GARCÍA et al., 2016).

Outros estudos propuseram que para os efeitos da MTF se manifestarem é necessário seu acúmulo intracelular. Tal processo de acúmulo acontece em três etapas: Ligação do fármaco à membrana plasmática do parasita; internalização e após alcançar o alvo, dá-se início à ação metabólica (SUNDAR, 2007). A MTF, em condições normais, se liga às proteínas, que agem como um reservatório para o fármaco. Devido a sua natureza anfifílica, a MTF é capaz de formar micelas em água e se ligar às monocamadas lipídicas buscando o equilíbrio entre a quantidade que se liga a cada uma, sendo que esse depende da concentração do fármaco, da quantidade de proteína e do número de células presentes.

Sobre o processo de internalização do fármaco, existem dois possíveis mecanismos sugeridos: a endocitose dos monômeros de MTF incorporados na membrana plasmática, mecanismo esse mais comum em alta concentração do fármaco ligado à membrana (PONTE-SUCRE et al., 2013) e o transporte ativo, com gasto de energia, feito por proteínas flipases específicas (PÉREZ-VICTORIA et al., 2003).

No interior das células, a MTF deve ser incorporada nas membranas das organelas. Há estudos que elucidam a interação da MTF com o retículo endoplasmático (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010), com a mitocôndria (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007), além de ter a capacidade de romper as membranas das organelas intracelulares com efeito tipo detergente (PÉREZ-VICTORIA et al., 2001).

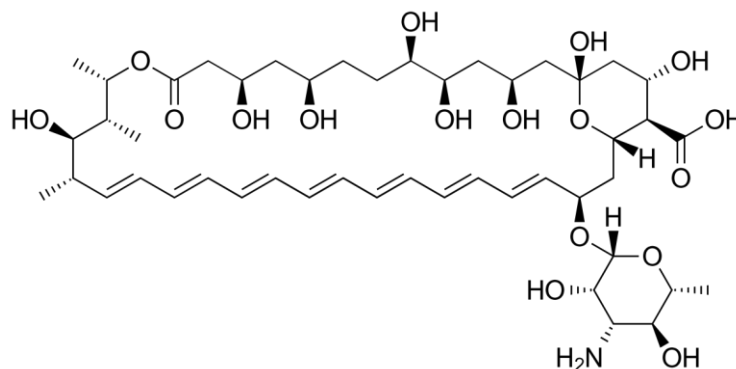
Para minimizar a toxicidade da MTF existe estudos que exploram a incorporação do fármaco em nanopartículas. Experimentos conduzidos com larvas de *Galleria mellonella* infectadas por *Candida albicans* e *Cryptococcus gattii* revelaram que a MTF, quando encapsulada em nanopartículas de alginato, reduz eficazmente a carga fúngica sem causar hemólise ou toxicidade nas larvas (SPADARI, 2019).

#### 1.1.4. Anfotericina B

É um antibiótico, da classe dos polienios macrolídeos, com importante atividade fungicida, inclusive contra a *Leishmania*. Possui fórmula molecular  $C_{47}H_{73}NO_{17}$  com massa molar de 924g/mol. Sendo um pó amarelo alaranjado, com sensibilidade à luz e ao calor. Insolúvel em água com pH neutro, mas solúvel em dimetilsufóxido, dimetilformamida e etanol (DAMASCENO, 2010).

Existem duas apresentações comerciais da AmB, o deoxicolato de AmB e a forma lipossomal. Ambas tendo eficácias comparáveis, mas com a lipossomal apresentando menor toxicidade (BRASIL, 2017). Como a AmB se liga fortemente na membrana lipossomal, por conta de sua afinidade pelos lipídeos, ela não é liberada assim que entra na circulação sanguínea, sendo menos captadas pelas células renais reduzindo assim sua toxicidade (FARIA,2020).

A estrutura química muito complexa da AmB apresenta características hidrofílicas, por conta de inúmeros grupos hidroxila na sua cadeia poli-ol, e também característica hidrofóbicas por conta das sete duplas ligações conjugadas carbono-carbono na parte apolar da cadeia polieno da molécula. A AmB possui uma alta afinidade pelas membranas (ALONSO et al, 2021) (Figura 4).



**Figura 4 - Estrutura molecular da anfotericina B.**

O primeiro e mais estudado mecanismo de ação da AmB foi proposto por Finkelstein e Holz (1973) que é o modelo de canais iônicos. Para esse modelo, as moléculas de AmB se agregam formando um barril através de uma bicamada. Com isso, poros podem ser criados em ambas as monocamadas da membrana, ou podem ser formados meios-poros. Quando dois meios-poros se unem, estando um em cada monocamada, pode ocorrer o vazamento iônico ou de pequenas moléculas. Esses poros são responsáveis pelo vazamento de íons de potássio e pequenas partículas orgânicas vitais para a função celular (KAMINSKI, 2014). Outro mecanismo defendido baseia-se no dano oxidativo celular, onde a AmB induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que oxidam a membrana lipídica (SOKOL-

ANDERSON et al., 1986). Para Brajtburg e colaboradores (1985), esse dano oxidativo não aumenta a permeabilização da membrana, mas está relacionado à ação lítica da AmB. Há ainda relatos de que a AmB forma um complexo de canal iônico em membranas com ergosterol maior do que em membranas que possuam só colesterol (MOURI et al., 2008).

A AmB tem também como possível mecanismo de ação, contra parasitas e fungos, formação complexos com as moléculas de esterol da membrana celular proporcionando os canais iônicos, que desencadeiam em morte celular. Sawaya e colaboradores (1991) relataram que a AmB provoca abertura de canais de  $Ca^{2+}$ , induzida pela despolarização em estudos em ratos. Mesa-Arango e colaboradores (2014), avaliando o efeito fungicida da AmB, propôs a produção de ERO como um mecanismo de ação da AmB, além de alterações na taxa respiratória bem como no potencial de membrana mitocondrial.

A espectroscopia RPE de marcadores de spin tem fornecido uma enorme contribuição complementar na elucidação do mecanismo de ação da AmB contra as *Leishmanias*. Alguns resultados tem sugerido que a AmB tem uma seletividade por membranas que contem ergosterol comparadas as membranas com colesterol (TEERLINK et al., 1980; BRAJTBURG et al., 1984). Sendo assim a AmB não entra nas bicamadas lipídicas de membranas modelos, como proposto pelo modelo da esponja de esterol (ANDERSON et al., 2014), entretanto, novos estudos, indicam a preferência da AmB por membranas que possuem proteínas, os marcadores de spin, inseridos na bicamada lipídica, detectam fortes interações com supostos complexos de AmB/esterol no interior da bicamada lipídica, as quais resultam em rigidez de membrana celular (ALONSO et al, 2021).

Devido à baixa solubilidade, existem duas formas principais de utilização da AmB para administração intravenosa. A primeira é utilizá-la com solventes, como exemplo temos o Fungizone, que é uma mistura de AmB e deoxicolato de sódio e está associada a uma nefrotoxicidade grave. A segunda forma inclui formulações baseadas em lipídios, que embora reduzam a nefrotoxicidade, são mais caras e exigem doses maiores comparadas ao Fungizone. Exemplos dessas formulações lipossomais incluem AmBisome, Anfotec, Anfocil e Abelcet (NEKKANTI, 2015). Portanto, há uma necessidade de um sistema de entrega mais econômico com menor toxicidade (NIMTRAKUL, 2019).

Um estudo investigou o uso de nanopartículas de gelatina para a incorporação da AmB, com o objetivo de reduzir a toxicidade e os custos do tratamento, mantendo a eficácia do fármaco. Os resultados mostraram que uma menor concentração de AmB foi necessária para alcançar a eficiência desejada, utilizando o sistema nanoestruturado (SILVA, 2022).

## 1.2. LIPOSSOMAS

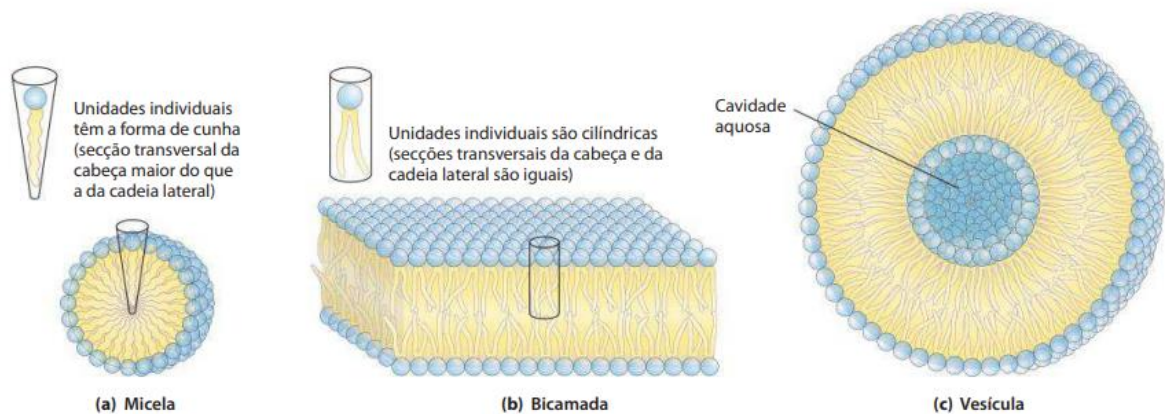
Membranas são importantes estruturas celulares por definirem o limite celular regulando o trânsito molecular. São essenciais para a conservação da energia celular e comunicação célula-célula, mesmo sendo estruturas estáveis, não são estáticas, daí o modelo mais difundido do mosaico fluido para a estrutura das membranas de Singer e Nicholson (1972).

Ao introduzirmos moléculas lipídicas em meio aquoso, devido a sua natureza anfifílica, teremos acomodação de suas estruturas, formando três tipos possíveis de agregados:

- As micelas são estruturas esféricas com parte hidrofóbica, que é a parte apolar representada pelos ácidos graxos, e seus grupos hidrofílicos, a parte polar denominada cabeça, localizada na superfície em contato com a água. Tal agregado é mais provável quando a área transversal da cabeça polar é maior que a da cadeia lateral, tendo as unidades individuais um formato de cunha.

- A bicamada é uma lâmina bidimensional formada por duas monocamadas de lipídios. A bicamada é geralmente formada quando as áreas transversais dos grupos da cabeça e das cadeias de acilas laterais são semelhantes.

- Vesículas ou lipossomas são esferas ocas formadas pela curvatura das regiões hidrofóbicas nas margens da bicamada em contato com a água. Como elucidado na Figura 5.



**Figura 5 - Desenhos esquemáticos ilustrando as formações dos agregados de lipídios anfipáticos em meio aquoso.**

A composição lipídica da membrana tem relação com suas atribuições. Além dos lipídios que participam na formação das membranas biológicas, temos também a presença de proteínas de membrana com variadas funções. As proteínas fornecem uma das principais características da membrana que é a seletividade, pois elas atuam como filtro celular (CARDOSO, 2023). Membranas que realizam muitos processos metabólicos catalisados por enzimas (como das bactérias, mitocôndrias e cloroplastos) contêm mais proteínas do que

lipídios. No entanto, membranas com função de proteção ou isolamento, como no caso da bainha de mielina, os lipídios são predominantes. Nas *Leishmanias*, a membrana recobre todo o parasita, de ciclo heteroxênico, possibilitando sobrevivência em diferentes condições do meio, por isso são estruturas complexas, com diversos lipídios e proteínas aumentando a resistência e virulência dele (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Os lipossomas são utilizados como carreadores de fármacos, pois proporcionam melhores índices terapêuticos por aumentarem a eficiência e segurança dos fármacos (BATISTA et al., 2007). Além de possuírem semelhança com as membranas celulares e menor complexidade estrutural. Os benefícios clínicos da utilização de lipossomas associados a moléculas de fármacos demonstram sua eficácia em aplicações de distribuição de medicamentos, graças à liberação controlada e sustentada. Além disso, os lipossomas contribuem para a redução da toxicidade sistêmica e a melhoria das propriedades farmacocinéticas, evidenciando o potencial das formulações lipossomais na administração de medicamentos (NEKKANTI, 2015).

O sistema de administração de medicamentos lipossomais se mostra promissor para aumentar a eficácia do tratamento, especialmente em pacientes com câncer colorretal, o terceiro tipo de câncer mais comum e o quarto mais letal mundialmente. As vantagens incluem maior biocompatibilidade, entrega específica no local alvo, redução dos efeitos colaterais em tecidos saudáveis, melhores propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, e liberação controlada dos medicamentos em comparação com os medicamentos convencionais (SANG, 2021). Outro estudo também explora o uso de carreadores lipossomais para a entrega de vacinas (ANDRA, 2022).

Saleem e colaboradores (2019) enfatizam a necessidade de pesquisas para desenvolver medicamentos acessíveis e eficazes contra a leishmaniose, indicando as formulações nanolipídicas como uma estratégia potencial. Um exemplo é o AmBisome, embora seu alto custo seja um desafio. Os estudos mostram que os lipossomas podem penetrar nos macrófagos através da fagocitose, entregando a droga diretamente ao local do parasita. Assim, a incorporação de miltefosina e anfotericina B em lipossomas pode superar problemas de toxicidade e custo elevado das formulações lipossomais (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, 2016).

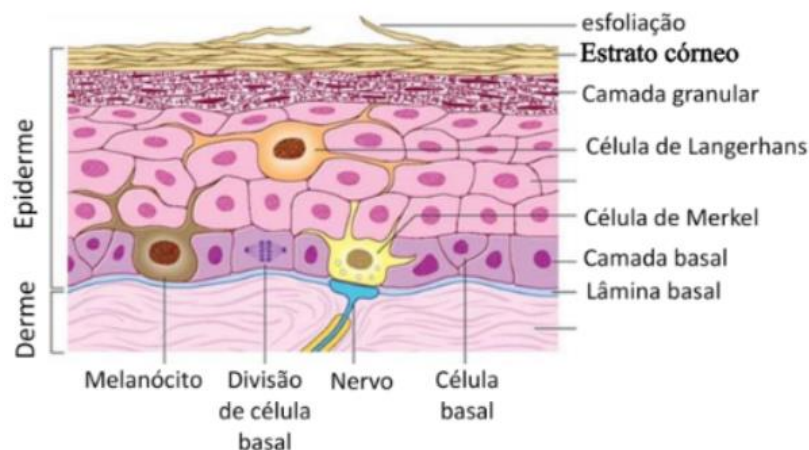
### 1.3. MACROFÁGO E ESTRATO CÓRNEO

Como mencionado na secção 1.1.1, os macrófagos são células de defesa do corpo humano, sendo essenciais para o pleno funcionamento do organismo. O macrófago participa do

processo de endocitose para eliminação de células danificadas ou envelhecidas, restos celulares ou agentes estranhos. Os monócitos, um dos tipos de leucócitos agranulosos, são distribuídos pela corrente sanguínea para os tecidos do corpo onde são diferenciados em macrófagos. Por conta da diversidade de células, os macrófagos terão algumas particularidades a depender do tipo de célula que foi originado (CRUVINEL et al, 2010).

Na membrana dos macrófagos existem proteínas conhecidas como receptores de superfície. Essas proteínas são as responsáveis pela interação entre os macrófagos e a superfície dos parasitas e outras partículas. Ao início do processo de fagocitose, essa ligação gera sinais que determina se a partícula deverá ou não ser ingerida. Se os antígenos do patógeno forem reconhecidos, ocorre a elongação da membrana do macrófago, os pseudópodes (BOUZON, 2010), que envolverão o alvo englobando-o em uma vesícula, conhecida como fagossomo. Os lisossomos fundem-se aos fagossomos, que foram aderidos à célula, iniciando a digestão celular com liberação de enzimas que degradarão a superfície do parasita resultando em sua morte (APPELBERG, 2005).

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Tem como função a proteção contra patógenos, evitar a perda excessiva de água e ainda a regulação térmica. Os queratinócitos são as principais células da epiderme, camada mais superficial da pele, estando em constante renovação. Conforme ilustrado na Figura 6, nas camadas mais externas, os queratinócitos se transformam em cornéocitos que juntos com lipídios formam o estrato córneo (EC), uma camada semitransparente que controla a perda da água transpidérmal, restringe a penetração da luz solar e protege contra a invasão de patógenos. O EC constitui a principal barreira física da pele, por isso tem sido objeto de muitos estudos. Nele também são aplicados os produtos de uso tópico que dependem da penetração na pele (ALONSO, 2018).



**Figura 6 - Desenho esquemático das camadas da epiderme com ênfase no estrato córneo.**

Williams e Barry, 2004, mostram que existem facilitadores da penetração transdérmica que podem aumentar a permeabilidade de um fármaco pelo EC. Tem sido demonstrado por espectroscopia de RPE que um aumento na hidratação do EC leva a um aumento na fluidez de suas membranas intercelulares (ALONSO et al., 1995; ALONSO, et al., 1996).

## 2. OBJETIVOS

O objeto desta pesquisa é avaliar a ação leishmanicida de formulações lipossomais contendo a MTF e AmB, bem como conhecer os mecanismos de ação desses lipossomas com fármacos encapsulados nas *Leishmanias* e macrófago além de investigar a interação das mesmas com o estrato córneo, utilizando a espectroscopia de RPE de marcador de spin, avaliando assim a possibilidade do uso tópico dessas formulações visando o tratamento da leishmaniose cutânea.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Preparar as formulações lipossomais contendo MTF e AmB;
- ✓ Estudar a ação da MTF e AmB na bicamada lipídica dos lipossomas por meio da RPE de marcadores de spin;
- ✓ Analisar o uso das formulações contendo MTF e AmB no EC visando o tratamento da leishmaniose cutânea;
- ✓ Examinar as atividades leishmanicidas das formulações em *Leishmania amazonensis*, pelo teste de MTT, no intuito de encontrar a concentração que inibe pela metade o crescimento do parasita ( $IC_{50}$ );
- ✓ Analisar a citotoxicidade das formulações preparadas nos macrófagos J774.A1 pelo teste de MTT, com finalidade de descobrir a concentração mínima que reduz a viabilidade celular em 50% ( $CC_{50}$ );
- ✓ Verificar a ação das formulações lipossomais contendo MTF e AmB nas membranas dos macrófagos infectados e não infectados por meio da RPE;

### 3. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica da física experimental muito útil para a pesquisa na área das ciências biológicas. Essa técnica permite estudar algumas propriedades de amostras, sem danificá-las ou modificá-las. Com a RPE é possível verificar, dentre outras características, o estado de rigidez da membrana celular. Sendo essa uma importante propriedade que pode revelar o estado das células e até mesmo a causa da morte celular (SWARTZ et al., 1972).

Essa técnica foi descoberta no século XX por Evgeny K. Kazan, na antiga União Soviética. Kazan, como era entusiasta de radioamadorismo, tinha a ideia de utilizar os campos eletromagnéticos das radiofrequências para investigar a estrutura e propriedades da matéria. No início, ele investigou a absorção por ressonância dos componentes do campo elétrico; depois, rendeu-se a ressonância magnética, inicialmente nuclear e posteriormente eletrônica (SALIKHOV, 1945).

O fundamento está na absorção, de forma ressonante, das ondas eletromagnéticas na região das micro-ondas, por materiais paramagnéticos com presença de campo magnético estático e campo de modulação, que é o campo auxiliar.

A RPE tem como diferencial, em relação às outras técnicas de espectroscopia, o foco na interação do campo magnético com os elétrons. Essa interação entre o momento magnético e a componente do campo magnético causa transições energéticas que são percebidas na ressonância. A ressonância paramagnética nuclear estuda a interação do campo magnético com os núcleos dos átomos, tendo como desvantagem em relação à RPE o fato dessas transições nucleares serem menos energéticas. Sendo que as ondas estarão na faixa de ondas de rádio.

Pieter Zeeman, físico holandês, em 1896 estudou sobre o espectro de linhas de emissão do vapor de Sódio; quando aplicou um campo magnético às linhas espectrais de Sódio percebeu uma divisão das linhas em três componentes distintas. Essas linhas da chama de oxihidrogênio foram nomeadas de linhas D. Zeeman percebeu que as linhas D se tornavam mais grossas, as quais se dividiam devido ao campo magnético. Aparecendo uma linha central, sem desvio, e duas laterais simetricamente desviadas. Com o auxílio de Hendrik Lorentz, explicaram que em todos os corpos existiam pequenos elementos moleculares carregados de eletricidade, e que todos os processos elétricos são devido ao movimento ou equilíbrio desses “íons” (ZEEMAN, 1897).

Esse achado antecede a descoberta do elétron, em 1897 por Joseph John Thomson. Devido ao campo magnético aplicado, teriam forças atuantes nesses íons que seriam suficientes

para explicação de tal fenômeno. Esse efeito tem enorme importância para a mecânica quântica, visto que a teoria de Lorentz-Zeeman instaurou as bases para o entendimento de como os níveis de energia dos elétrons nos átomos são afetados pela presença do campo magnético. Essa quebra de degenerescência foi verificada também com o uso do campo elétrico por Johannes Stark, em 1913. Atualmente, o Efeito Zeeman, é a única técnica experimental utilizada para medir o campo magnético em regiões de formação estelar (BASRI, 2006) além de outras enormes aplicações de estudos espectroscópicos como nesse trabalho.

Classicamente o momento angular é definido como relação ao momento angular orbital,  $\vec{L}$ . Entretanto, quanticamente, temos o incremento de momento angular intrínseco dos elétrons e de outras partículas elementares denominado momento angular de Spin,  $\vec{S}$  (DAVID, 1999). Com essa propriedade da matéria se faz necessária a definição de um momento magnético  $\vec{\mu}$  dado pela equação:

$$\vec{\mu} = -g \cdot \beta \cdot \vec{S}.$$

Onde  $\beta$  é o magnéton de Bohr, sendo que  $\beta = \frac{e \cdot \hbar}{2 \cdot m \cdot c} = 9,27 \times 10^{-21} \text{ erg/G}$ . Uma vez que “e” e “m” indicam respectivamente a carga e a massa do elétron, g é uma constante adimensional conhecida como fator-g do elétron ou fator g de Landé, que para o caso do elétron vale aproximadamente 2 (SAKURAI, 1994).

O momento angular de spin do elétron, por ser quantizado, apresentando duas orientações possíveis, +1/2 e -1/2, tem como consequência uma diferença de energia entre esses dois estados do elétron quando o mesmo estiver sob a ação de campo magnético estático. Essa energia de interação entre o campo magnético  $\vec{B}$  e o momento magnético pode ser calculada pelo produto escalar abaixo:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = g \cdot \beta \cdot \vec{S} \cdot \vec{B}$$

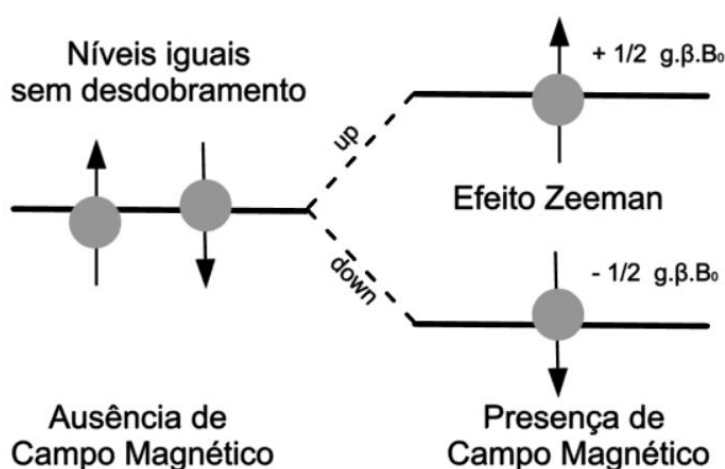
Considerando que o campo magnético  $\vec{B}$  tenha somente uma componente  $B_0$  ao longo eixo z do sistema de coordenadas, teremos que a energia pode ser definida como:

$$E = g \cdot \beta \cdot S_z \cdot B_0$$

Como o Spin pode assumir duas orientações: “up” com  $S_z = +1/2$ , sendo esse o estado de maior energia, com orientação paralela à do campo magnético e “down” com  $S_z = -1/2$ , o estado menos energético e com orientação antiparalela ao campo magnético. Temos que os estados de energia assumirão valores:

$$E_{\pm} = \pm \frac{1}{2} g \cdot \beta \cdot B_0$$

Essa separação energética ou quebra de degenerescência do nível de energia do spin devido a presença do campo magnético é o efeito Zeeman, que na ausência de campo magnético os estados de spin “up” e “down” apresentam energia nula. Com o campo magnético estático, não nulo, existe a quebra de degenerescência em dois níveis de energia distintos. De forma ilustrativa temos o esquema mostrado na a seguir Figura 7.



**Figura 7 - Ilustração do efeito Zeeman eletrônico.**

Quando uma radiação eletromagnética é aplicada de forma polarizada perpendicularmente ao eixo z, no contexto de um campo magnético alinhado nessa direção, a absorção de energia ocorrerá se a frequência for apropriada. Tal absorção resultará na transição entre os estados “up” e “down”. A condição para que ocorra essa transição de RPE é que a energia da radiação seja igual a diferença entre as energias dos estados. Logo:

$$\Delta E = E_+ - E_- = g \cdot \beta \cdot B_0 = h \cdot \nu$$

Sendo que  $h$  é a constante de Planck e  $\nu$  é a frequência da radiação. O campo magnético de ressonância para radicais orgânicos é próximo de 3500 G, o que implica em uma radiação ressonante de frequência entre 9 GHz e 10 GHz, conhecida com banda-X. Existem outras faixas de frequências também utilizadas em RPE, no entanto, a banda-X oferece uma melhor facilidade de uso aliada a uma boa resolução (AARTSMA, 2008).

De acordo com a distribuição de Boltzmann, temos que a população relativa de dois níveis de energia é dada por:

$$\frac{N_A}{N_B} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

Dado que  $N_A$  e  $N_B$  representam as populações nos estados energéticos A e B, respectivamente;  $\Delta E$  é a diferença de energia entre esses níveis;  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura (POOLE, 1999). Assim, no contexto do spin eletrônico, podemos afirmar que:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} = e^{-\frac{g \cdot \beta \cdot B_0}{kT}}$$

Considerando que, para um elétron livre, o fator  $g$  é aproximadamente igual a 2 e levando em consideração a temperatura ambiente, a população associada à menor energia será ligeiramente maior. Esse desequilíbrio é o bastante para que a absorção das micro-ondas supere a emissão, possibilitando assim a detecção do sinal de absorção na RPE. A interação do spin com a rede é crucial, pois a aplicação contínua do campo de micro-ondas resultaria na equalização das populações de spins com diferentes energias. Nesse cenário, após um breve intervalo de tempo, o sinal de absorção da RPE desapareceria. Todavia, com a interação spin rede, ocorre a restauração do equilíbrio, onde a população menos energética é maior, possibilitando a observação contínua do sinal de absorção. Isso se dá por meio da dissipação de energia magnética em forma de energia térmica.

A interação do spin do elétron com a vizinhança, mencionada no tópico anterior, possibilita o reinício do efeito Zeeman. Esse processo é chamado de relaxamento. Classificado em relaxamento spin-rede ou longitudinal e relaxamento spin-spin ou transversal. O relaxamento longitudinal é devido à perda de energia magnética em energia térmica para a vizinhança. A taxa de restauração do equilíbrio térmico é definida por um tempo característico conhecido como tempo de relaxação spin-rede ou longitudinal representado por  $T_1$ . Esse tempo seria o tempo de vida médio do spin de maior energia. Esse processo pode ser descrito como decaimento exponencial de primeira ordem.

O tempo de relaxação longitudinal depende do fator- $g$  do elétron e da rede que ele está. Sendo que quanto maior for a mobilidade da rede menor será o valor de  $T_1$ , haja vista que

uma mobilidade maior favorece as transições de energia entre os diferentes estados energéticos (BRUSTOLOM, 2009).

A relação da incerteza tempo-energia, de Heisenberg, diz que:

$$\Delta t \cdot \Delta E \geq \hbar$$

Com base nessa equação e lembrando que  $\Delta E = h \cdot \nu$  chega-se em:

$$\Delta E \cdot T_1 \approx \hbar$$

$$h \cdot \Delta \nu \cdot T_1 \approx \hbar$$

$$\Delta \nu \approx \frac{1}{T_1}$$

Assim, da condição para que ocorra transição de RPE, da identidade acima e explicitando  $\Delta B_0$  conclui-se que:

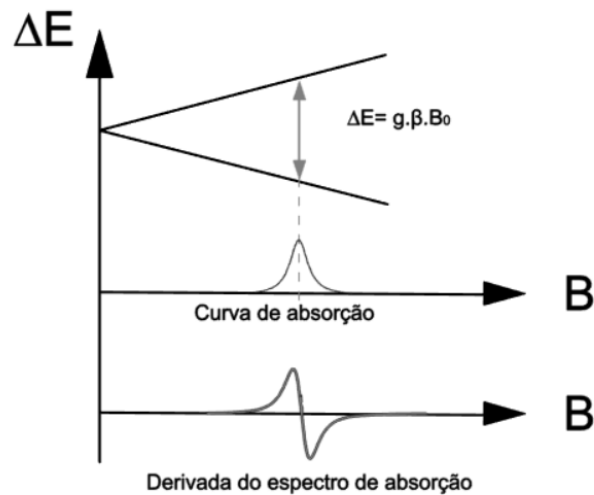
$$\Delta B_0 \approx \frac{\hbar}{g \cdot \beta \cdot T_1}$$

Tendo  $\Delta B_0$  como a variação do campo magnético externo que representa as linhas de espectro. Para  $T_1$  pequeno, ou seja, um tempo curto, terá um aumento na largura das linhas de ressonância. Entretanto, para esse tempo longo, implica em  $\Delta B_0$  próximo de zero. Nesse caso os spins de menor energia irão absorver radiação progredindo para o estado mais energético, sem que ocorra o inverso. Saturando assim o processo e cessando o efeito Zeeman.

Ao contrário da relaxação spin-rede, a relaxação spin-spin não influencia a saturação ou dissipação de energia magnética do sistema. Contribui para o alargamento da linha, pois reduz o tempo de vida do spin no estado excitado. Majoritariamente, o tempo de relaxação spin-spin  $T_2$  é o fator limitante da largura da linha observada. De acordo com a teoria mencionada anteriormente, obtemos que:

$$\Delta \nu \approx \frac{1}{T_2}$$

Sendo essa a situação mais comum em RPE de radicais livres em solução, inclusive o utilizado nesse trabalho. Assim a forma da curva é uma Lorentziana e o objeto de análise é a primeira derivada dessa curva, como representado na Figura 8.



**Figura 8 - Representação do Efeito Zeeman bem como das curvas de absorção e da derivada do espectro de absorção.**

Em um sistema em que o spin do elétron esteja cercado por dipolos magnéticos de núcleos vizinhos, entre os quais podem ser de átomos vizinhos ou do próprio átomo (COHEN et al., 1977) tem-se que a hamiltoniana para descrever tal sistema é:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_{hf}$$

Onde o termo  $\hat{H}_0$  é a hamiltoniana de ordem zero. Chamado assim por não levar em consideração o spin do elétron com o spin de outras partículas. Referindo-se a interação dos momentos magnéticos tanto do núcleo como do elétron com o campo magnético  $\vec{B}$ , ou seja, efeito Zeeman nuclear e eletrônico, respectivamente. Dado que a interação Zeeman nuclear é três ordens de grandeza menor do que a interação Zeeman eletrônica, por conta do magnéton de Bohr nuclear ser quase 2000 vezes menor do que o eletrônico, fato esse devido às massas de repouso do elétron e do próton. Considerando apenas a interação Zeeman eletrônico. Com isso tem-se:

$$\hat{H}_0 = g \cdot \beta \cdot \vec{S} \cdot \vec{B}$$

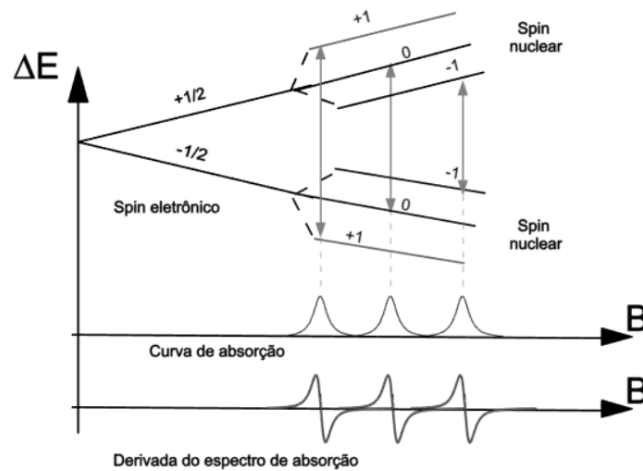
O segundo termo,  $\hat{H}_{hf}$ , trata-se da interação hiperfina. Que é a interação com o spin nuclear não nulo  $\vec{I}$ . Esse spin nuclear interagindo com o sistema paramagnético próximo pode assumir  $2I + 1$  valores. A hamiltoniana dessa interação é:

$$\hat{H}_{hf} = A \cdot \vec{S} \cdot \vec{I} = A \cdot (S_x I_x + S_y I_y + S_z I_z)$$

Levando em consideração apenas a perturbação de primeira ordem, tem-se que:

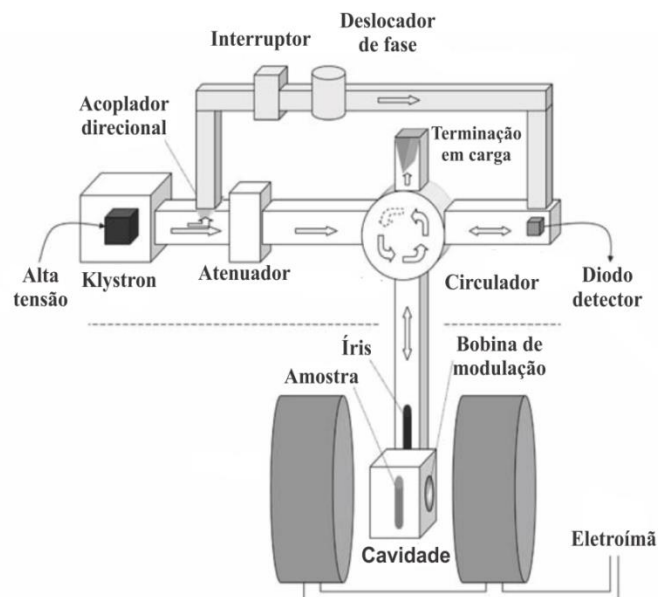
$$\hat{H}_{hf} = A \cdot \vec{S}_x \cdot \vec{I}_x$$

onde,  $A$  é denominada constante de acoplamento hiperfino. Com o valor de  $I = 1$  têm-se três graus de degenerescência conhecido como desdobramento hiperfino (Figura 9). Outras interações tais como a super hiperfina, ou interação entre o spin nuclear e o campo magnético são desprezíveis nas condições normais dos experimentos de RPE (SCHREIER, 1979).



**Figura 9 - Representação do Efeito Zeeman e interação hiperfina com as curvas de absorção e da derivada do espectro de absorção.**

Como previamente elucidado, a técnica de RPE fundamenta-se na detecção das micro-ondas absorvidas por um sistema de spins quando este é submetido a um campo magnético externo. Os espectrômetros utilizados nessa abordagem incluem uma fonte de micro-ondas, cavidade ressonante, eletroímã, fonte de energia, e um sistema de modulação e detecção (Figura 10).



**Figura 10 - Diagrama esquemático de um espectrômetro de RPE.**

Por simplificação, pode-se nomear de fonte de micro-ondas os componentes responsáveis por gerar e transmitir as micro-ondas até a cavidade onde está a amostra, sendo variado o campo magnético. A fonte de micro-ondas propriamente dita, pode ser via válvula Klystron ou por uma fonte de estado sólido, como um diodo Gunn. Por conta da complexidade dos guias de onda, os equipamentos operam com frequências fixas de micro-ondas. Nessa parte temos ainda o atenuador, que tem a função de regular a entrada de energia, e o circulador, que direciona as ondas da fonte para a cavidade ao mesmo tempo as ondas refletidas são direcionadas para o detector (DAVID, 1999; HAGEN, 2009).

Uma parcela da radiação produzida pela fonte é desviada antes do atenuador por uma guia de onda de referência em direção ao detector. Essa radiação será útil para apontar o decréscimo da corrente no aparelho. Pois nessa guia tem-se um dispositivo para inverter a fase das ondas provocando interferência destrutiva com as ondas que saem do circulador para o detector.

Na cavidade temos o ressonador, esse é o âmago do equipamento, local onde é colocada a amostra. Essa cavidade deve estar em uma região entre os eletroímãs, de forma que tenha um valor máximo de campo magnético e mínimo de campo elétrico. Os campos magnéticos estáticos e o das micro-ondas devem ser perpendiculares para promoverem a transição de spin. A eficiência da cavidade é determinada por um fator Q. A cavidade será mais eficiente quanto maior for a razão entre a energia armazenada na cavidade e a energia perdida durante um período de oscilação da radiação de micro-ondas.

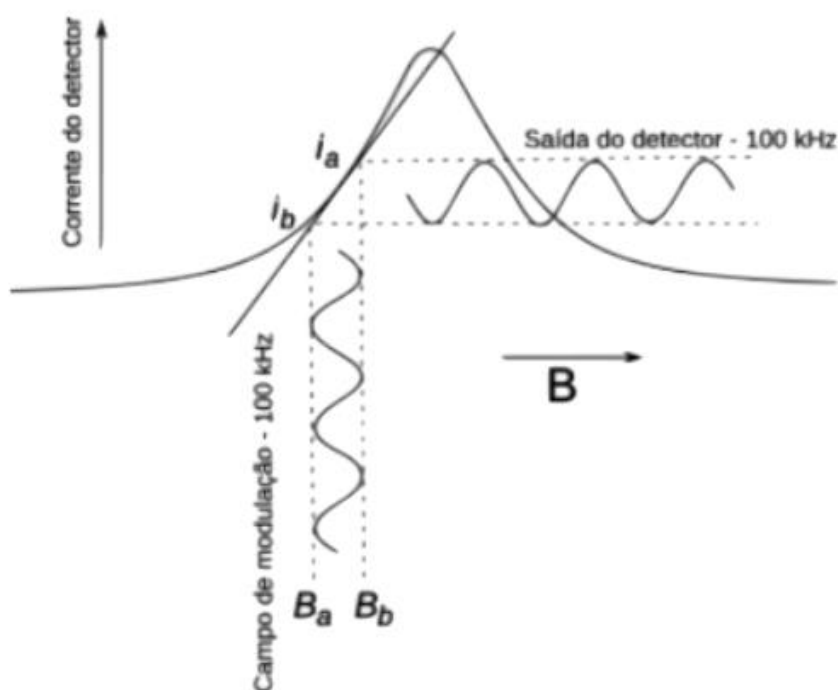
$$Q = \frac{2 \cdot \pi \cdot \text{Energia}_{armazenada}}{\text{Energia}_{perdida}}$$

Esse fator de qualidade ou fator Q indica a eficiência da cavidade em armazenar as micro-ondas e assim, à medida que ele aumenta, tem-se maior sensibilidade do espectrômetro. Tal fator também tem influência da interação da amostra com os componentes da micro-onda, tornando-se maior quanto maior for a constante dielétrica da amostra. Utilizando amostras biológicas tendo a água como solvente pode-se ter redução no fator Q. Para minimizar esse efeito, utiliza uma quantidade menor de água e amostra em um capilar.

Por fim temos o detector, que é um dispositivo que converte a energia das micro-ondas em corrente elétrica contínua. Esse detector é na verdade um sistema de detecção. Nesse sistema temos um diodo detector, amplificador de sinal e um sistema de frequência de

modulação do campo. O amplificador serve para aumentar o sinal para a detecção sem alterar a razão sinal-ruído.

Para a melhoria da razão sinal-ruído, utilizam-se bobinas de Helmholtz dentro da cavidade. Essas bobinas são impulsionadas por um oscilador para que o campo magnético oscilante produzido, de pequena amplitude e frequência em torno de 100 kHz, seja sobreposto ao campo magnético externo. Essa modulação garante a detecção do sinal refletido pela cavidade, que só ocorre quando há absorção de micro-ondas, e que chega ao detector. O sinal, em fase com a modulação de 100 kHz, será proporcional à derivada da curva de absorção, como mostrado na Figura 11 (SWARTZ et al., 1972).



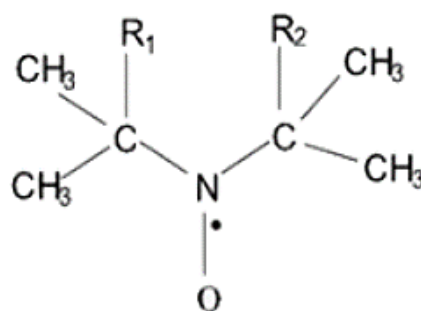
**Figura 11 - Efeito do campo de modulação na saída do detector de corrente.  
Adaptado de Swartz,1972.**

A RPE é extremamente útil na caracterização de amostras que possuem elétrons desemparelhados. Pois essa técnica não prejudica o objeto de estudo e proporciona várias informações úteis. Dessa forma, a RPE consegue investigar sistemas que possuem momento magnético não nulo. No entanto, existem muitos casos onde o exemplar em análise não possui tal característica. Nesses casos, não seria possível o uso da técnica se não fossem os marcadores de spin. Marcadores de spin, ou “spin label”, são sondas específicas que apresentam um centro paramagnético, geralmente o radical nitróxido, que ligado a sistemas diamagnéticos confere um centro paramagnético aos mesmos.

O método de marcadores de spin surgiu em 1965 com Onishi e McConnell. Foi introduzido um radical de cátion de cloropromazina em moléculas de ácido desoxi-ribonucléico RNA (OHNISHI e MCCONNELL, 1965). Já em 1990, Wayne L. Hubbell obteve resultados muito promissores por ser eficiente na elucidação de estruturas e dinâmicas conformacionais em condições muito próximas ao estado fisiológico do sistema. Pela dificuldade em utilizar a RPE em materiais diamagnéticos, Onishi e McConnell desenvolveram os marcadores de spin. Moléculas com radical livre, ligante a sítios específicos das moléculas. Permitindo à mesma um caráter paramagnético suficiente para aplicação da técnica de RPE. Assim, faz-se a medida da dinâmica do marcador, mas como está ligado à molécula, ele revela as características da mesma (CARDOSO, 2023).

Uma grande propriedade dos marcadores de spin é que eles não reagem com a amostra, preservando ao máximo as características do objeto em estudo. Assim a combinação da RPE com o método de marcadores de spin torna-se uma ferramenta muito eficiente para elucidar estruturas de biomoléculas em condições similares às fisiológicas. Experimentos com tais técnicas foram pioneiros em evidenciarem os tipos de movimentos característicos dos lipídeos presentes nas membranas (SCHREIER, 1979).

Pode-se usar qualquer espécie paramagnética para ser o marcador de spin. Na prática, utilizam-se radicais derivados de nitróxido. Esses radicais são moléculas com um fragmento paramagnético N-O. O grupo metila na vizinhança do átomo de Nitrogênio confere uma estabilidade necessária e importante para a técnica (PERUSSI et al., 1985). Esses marcadores têm como vantagem: a grande sensibilidade e simplicidade do espectro de RPE resultante bem como de sua estabilidade nas condições de pH e temperatura das amostras biológicas. Isso explica a grande utilização na Biofísica. A Figura 13 ilustra a estrutura molecular do radical nitróxido. O elétron desemparelhado encontra-se no orbital  $2p\pi$  da ligação N-O (Figura 12).



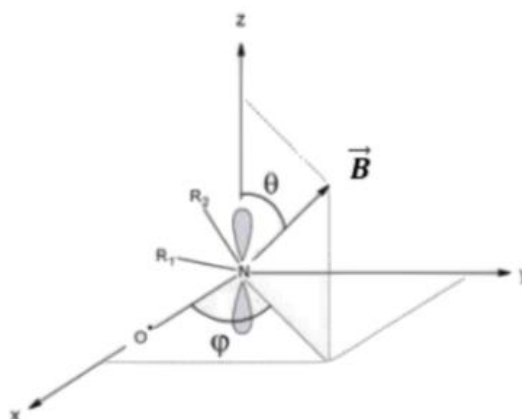
**Figura 12 - Estrutura molecular geral do radical nitróxido. Os grupos químicos que variam de um marcador para outro estão representados por R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>.**

**Figura adaptada de Fernandes, 2016.**

Os radicais  $R_1$  e  $R_2$  são escolhidos de forma conveniente com a molécula em estudo. Devido à relativamente boa estabilidade dos radicais, eles podem participar de reações químicas sem que o elemento paramagnético se envolva. Estabilidade essa por conta da sua energia de ligação, bem como da presença dos quatro grupos metilas impedindo que o elétron desemparelhado circule pelo anel piperidínico. Além dessa possibilidade de escolha, tem-se que os nitróxidos são solúveis tanto em meios polares quanto apolares (ALONSO, 1986). A ligação em meios apolares se dá por conta dos grupos metilas enquanto que nos meios polares o átomo de Oxigênio garante a ligação como receptor de uma ligação de Hidrogênio. Os marcadores de spin de natureza lipídica, aqueles utilizados para estudo de membranas modelos ou micelas, são intercalados fisicamente com os fosfolipídios. Já os marcadores de proteínas podem ser ligados covalentemente as mesmas, através do grupo sulfidril das cisteínas (CAMARGOS et al, 2013).

Como a posição e o desdobramento das linhas do espectro de RPE dependem da direção do campo magnético em relação aos eixos moleculares, fatos esses evidenciados pelos valores de  $g$  e da constante de acoplamento hiperfino, quando uma molécula não é isotrópica, esses parâmetros não serão iguais para todas as direções. Desse modo, com a anisotropia das moléculas, os indicadores “ $g$ ”, fator- $g$  do elétron ou fator  $g$  de Landé, e “ $A$ ”, constante de acoplamento hiperfino, algumas vezes tratados com grandezas escalares, deverão ser substituídos por tensores  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$  (VICTORIA, 2018).

Assim para cada um desses tensores teremos três principais componentes em relação às direções principais, como representado na Figura 14. A anisotropia espectral é normalmente especificada pelos três valores do fator  $g$  ( $g_{XX}, g_{YY}, g_{ZZ}$ ) e da constante de acoplamento hiperfina  $A$  ( $A_{XX}, A_{YY}, A_{ZZ}$ ). Essa propriedade é base fundamental da utilidade do método de marcadores de spin, pois servirão para o cálculo dos parâmetros de ordem em membranas, por exemplo.



**Figura 13 - Radical nitróxido e seu sistema de coordenadas com os ângulos formados entre os eixos coordenados e o campo magnético.**

Quando o radical possui movimento muito rápido na solução, a anisotropia não aparece. Para esse caso, temos uma média temporal e os valores de  $g$  e do desdobramento hiperfino correspondem aos valores médios:

$$A = \frac{(A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ})}{3} \quad \text{e} \quad g = \frac{(g_{XX} + g_{YY} + g_{ZZ})}{3}$$

Assim, o espectro consiste em três linhas finas, de igual intensidade, equidistantes e bem resolvidas, chamado de espectro livre. Mas quando o marcador possui movimento mais lento, essa média já não é tão fiel ao sistema e as contribuições de cada orientação torna-se relevante.

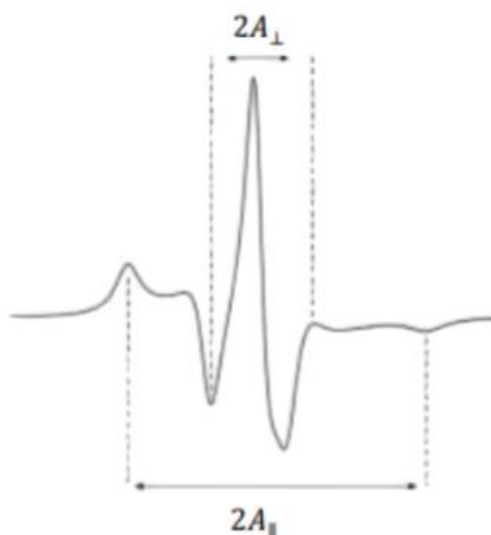
Nos casos onde o sistema molecular é simétrico axialmente, os valores principais dos tensores  $\vec{g}$  e  $\vec{A}$  serão dados por:

$$\begin{aligned} A_{||} &= A_{ZZ} & \text{e} & \quad A_{\perp} = A_{XX} = A_{YY} \\ g_{||} &= g_{ZZ} & \text{e} & \quad g_{\perp} = g_{XX} = g_{YY} \end{aligned}$$

Os lipídios da bicamada lipídica na membrana têm sua orientação limitada pelos lipídios circundantes e o movimento de outras moléculas. As limitações dos movimentos levam ao parâmetro de ordem  $S$  expresso por:

$$S = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} + A_{YY})}$$

onde:  $A_{||}$  e  $A_{\perp}$  são medidos diretamente no espectro e os outros parâmetros são obtidos por um espectro rígido. Esse parâmetro de ordem está compreendido entre 0 e 1. Sendo que no movimento isotrópico assume-se valor zero, e quando a ordem dos lipídios for muito grande será igual a 1. Esse parâmetro representa a medida da orientação da molécula em relação a um eixo de referência. Quanto mais fluída for a região onde estiver o marcador de spin, menor será o valor do parâmetro  $S$ , evidenciando uma maior mobilidade da membrana (Figura 14).



**Figura 14 - Indicação de leitura dos parâmetros  $A_{||}$  e  $A_{\perp}$  em um espectro de RPE.**

Os marcadores de spin junto com a RPE constituem uma ferramenta de grande importância para avaliar o nível de lipoperoxidação e oxidação de proteínas que ocorrem nas membranas biológicas, através da avaliação da rigidez da membrana por conta dos processos oxidativos (ALONSO et al., 1997; CHEN et al., 2002 & MENDANHA et al., 2012).

Juan e colaboradores (2021) mostraram que a peroxidação lipídica acontece quando os fosfolipídios insaturados colocados em contato com agente oxidante provocam alteração nas estruturas membranares, danificando sua integridade e alterando sua fluidez. Alguns compostos leishmanicidas causam rigidez da membrana do parasita. Essa rigidez foi associada à produção excessiva de agente oxidante e à despolarização da membrana mitocondrial. Como a MTF e a AmB são fármacos que também provocam a formação de agente oxidante, investiga-se nesse trabalho a possível rigidez de membrana causadas por eles (ALONSO et al, 2021).

A RPE tem sido utilizada para estudar a estrutura dos lipídios do estrato córneo, demonstrando ser uma ferramenta valiosa na avaliação das propriedades da barreira cutânea e na dinâmica dos lipídios em diferentes condições, como hidratação e exposição a surfactantes (NAKAGAWA, 2017). Além disso, a técnica é fundamental na avaliação precisa da atividade antioxidante em nanopartículas lipídicas (COÊLHO, 2023).

A RPE é muito valorizada por sua capacidade de decifrar a dinâmica complexa em nanoescala de estruturas, como polímeros, sem perturbar a geometria original, uma tarefa que outras técnicas convencionais ainda não alcançaram, tornando a espectroscopia RPE indispensável na ciência moderna (CHEN, 2024; NAVEED, 2018).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. PRODUTOS QUÍMICOS

Os fosfolípidos fosfatidilcolina (PC), fosfatidilcolina hidrogenada de soja (HSPC), Diesteoilfosfatidilglicerol (DSPG), o fármaco miltefosina foram adquiridos da empresa Avanti Polar Lipids (Alabama, EUA). Essas moléculas foram utilizadas para a preparação dos lipossomas juntamente com o colesterol (CHOL), e o fármaco anfotericina B além do meio de cultura RPMI-1640, do meio DMEM, glutamina, penicilina e estreptomicina, os quais foram obtidos da empresa Sigma Aldrich (St. Luis, EUA). O soro bovino fetal inativado pelo calor (FCS) foi adquirido da Corning Life Sciences (NY, EUA). Enquanto os macrófagos J774A.1 foram adquiridos da ATCC® TIB-67.

### 4.2. LIPOSSOMAS

#### 4.2.1. Preparação dos lipossomas

Os lipossomas contendo apenas os lipídios, sem os fármacos, denominados brancos, foram preparados pelo método da hidratação do filme lipídico. Denominamos formulação 1 (F-1), aquele que possui apenas PC, formulação 2 (F-2), aquele composto por 70% de PC e 30% de CHOL e formulação 8 (F-8), a que possui os lipídios HSPC, DSPG e CHOL. Os lipídios foram pesados conforme dados da Tabela 1, posteriormente foi adicionado 5 ml de clorofórmio para diluição.

A formação do filme lipídico foi por rota evaporação do solvente orgânico. Após a evaporação completa do solvente, os filmes foram colocados na estufa para que não houvesse a menor chance de resíduo de solvente. Posteriormente os filmes foram hidratados com 10 ml de água ultra purificada, sendo agitado com vórtex e colocado no ultrassom para que o mesmo se desprendesse e formasse vesículas multilamelares na concentração de 10 mM. Em seguida, o material passou por um processo de extrusão sob pressão em membranas de policarbonato com diâmetros de poro de 400 nm, posteriormente em 200 nm e por fim, nas membranas com diâmetros de 100 nm. Finalmente, foram filtrados para a esterilização, usando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 1 – Percentuais e massas dos componentes das formulações lipossomais em concentração de 10 mM.**

Formulação	Proporção	PC	Colesterol	MTF	AmB	HSPC	DSPG
F-1	(%)	100,00					
	(mg)	73,40					
F-2	(%)	70,00	30,00				
	(mg)	51,38	11,60				
F-3	(%)	60,00	30,00	10,00			
	(mg)	44,04	11,60	4,08			
F-4	(%)	40,00	30,00	30,00			
	(mg)	29,36	11,60	12,23			
F-5	(%)	60,00	30,00		10,00		
	(mg)	44,04	11,60		11,55		
F-6	(%)	50,00	30,00	10,00	10,00		
	(mg)	36,70	11,60	4,08	11,55		
F-7	(%)	30,00	30,00	30,00	10,00		
	(mg)	22,02	11,60	12,23	11,55		
F-8	(%)		26,32			52,63	21,05
	(mg)		10,18			40,11	16,84
F-9	(%)		23,81		9,52	47,62	19,05
	(mg)		9,21		11,00	36,29	15,24

#### 4.2.1.1. Lipossomas com miltefosina

As formulações 3 e 4 possuem, além da presença de PC e de CHOL, a MTF a 10% e 30%, respectivamente, sendo o preparo semelhante ao indicado anteriormente com a adição do fármaco junto com os lipídios antes da rotoevaporação. Os demais processos foram iguais, pois a MTF tem fácil incorporação.

#### 4.2.1.2. Lipossomas com anfotericina B

Os filmes com AmB foram feitos inicialmente com a diluição dos lipídios em clorofórmio seguido pela rotoevaporação. A AmB é uma molécula pouco solúvel na maioria dos solventes, tendo como exceção o dimetilsufóxido (DMSO) e dimetilformamida, que são substâncias de alta toxicidade. A AmB é praticamente insolúvel em soluções aquosas de pH neutro, mas pode formar suspensão em combinação com o surfactante deoxicolato de sódio (FILIPPIN e SOUZA, 2006). Para contornar essa dificuldade, os filmes foram hidratados usando água ultra pura de elevado pH. Com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) a 5 mM o pH da água foi elevado até atingir pH próximo de 12. Adotou-se essa estratégia para melhorar a dissolução da AmB nessa água ultrapura. Essa solução de água e AmB foi sonicada por um

tempo e agitada para ficar o mais uniforme possível. O filme lipídico foi hidratado com essa água com AmB e logo depois foi feita a extrusão da suspensão de lipídios e AmB como nos demais lipossomas. Após a extrusão, os lipossomas foram colocados em membranas de diálises, da empresa Fisherbrands, para neutralizá-los em um meio com PBS.

A formulação 5 possui a base lipídica de PC e CHOL com a adição de 30% de AmB. As formulações 6 e 7 são parecidos com os 3 e 4, mas com a adição de AmB. Já para a formulação 9, os lipídios são diferentes, conforme mostrado na Tabela 1. Foi feita uma medida da quantidade de AmB restante nas amostras após a extrusão, dado a difícil dissolução da AmB. Essa medida foi feita com o espectrofotômetro UV vis Cary 50 Conc (FARIA, 2020).

#### 4.2.2. Caracterização dos Lipossomas

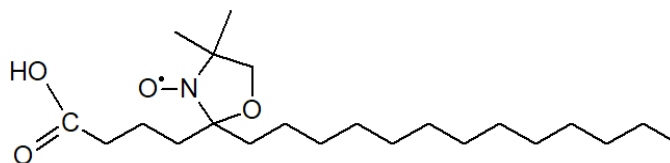
Utilizando a técnica de espalhamento dinâmico da luz (Dynamic Light Scattering – DLS) foi feita a medida do tamanho dos lipossomas. As amostras foram diluídas em água ultra purificada na razão 1:10, homogeneizadas e colocadas na cubeta para a introdução no equipamento zetasizer nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido). Ainda, utilizando o Zetasizer, e mantendo a diluição das amostras em 1:10, e as colocando em cubeta com eletrodos do efeito eletroforético, foi realizada a medida da carga superficial dos lipossomas. Com o método de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, foi analisada a concentração presente de MTF nas formulações após o preparo. Para quantificar a AmB resultante nos lipossomas foi utilizado o Espectrômetro de UV-visível da Cary 50 Conc com os lipossomas diluídos em metanol. Para a determinação do número de vesículas por mL presentes nas amostras de lipossomas foi empregada a técnica de análise de rastreamento de partículas utilizando um equipamento Nanosight NS500 (Malvern Panalytical, Reino Unido). As amostras foram diluídas em água ultrapurificada e em seguida injetadas para leitura. Os dados foram analisados utilizando o software NTA 3.1.

### 4.3. MARCADORES DE SPIN UTILIZADOS

#### 4.3.1. Marcador de spin 5-DSA

É uma molécula derivada do ácido esteárico, 5-doxil ácido esteárico. Tem fórmula molecular  $C_{22}H_{42}NO_4$ , com massa molar de 385 g (Figura 15). Apresenta o núcleo paramagnético no anel de radical nitróxido ligado ao quinto carbono da cadeia acila. Esse

marcador quando intercalado nos lipídios da membrana permite obter informações sobre a fluidez dela.

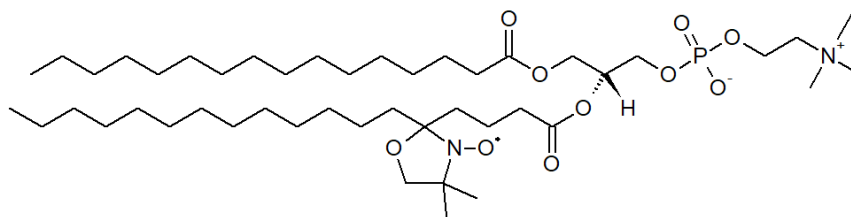


**Figura 15 - Estrutura molecular do marcador de spin 5-DSA.**

Este marcador é altamente valorizado por sua capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a organização espacial e temporal de camadas monomoleculares e sobre a interação e comportamento de moléculas em sistemas biológicos. Sua estrutura específica posiciona o grupo nitróxido paramagnético próximo à superfície de estudo, permitindo a obtenção direta de dados dos espectros de RPE. Isso facilita a detecção de interações e movimentos moleculares sem a necessidade de simulações complexas. Em contrapartida, outros marcadores podem exigir simulações devido à maior distância entre o grupo paramagnético e a superfície ou ao ambiente de estudo, dificultando a interpretação direta dos espectros de RPE sem auxílio adicional (RUTHSTEIN, 2005).

#### 4.3.2. Marcador de spin 5-PC

Esse marcador possui 862 g de massa molar, com fórmula molecular  $C_{46}H_{90}N_2O_{10}P$ , nome 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-sn-glicero-3-fosfocolina (Figura 16).



**Figura 16 - Estrutura molecular do marcador de spin 5-PC.**

O uso do marcador de spin 5-PC no EC apresenta vantagens significativas devido à sua capacidade de fornecer informações sobre a estrutura e dinâmica das membranas. Esse marcador uma vez inserido na membrana encontra alta estabilidade, não saindo facilmente. Isso é especialmente relevante na matriz lipídica complexa do EC, onde tais informações são cruciais para a compreensão das propriedades funcionais e estruturais dos lipídios (SUBCZYNSKI, 2022; DZIKOVSKI, 2012).

#### 4.4.CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO ESPECTRÔMETRO DE RPE

Os espectros de RPE foram obtidos no laboratório de Biofísica da Universidade Federal de Goiás (UFG), utilizando o equipamento EMX-Plus da empresa Bruker (Rheinstetten, Alemanha) equipado com uma ponte de micro-ondas Premium X e cavidade de ressonância de alta sensibilidade para banda X (9,4 GHz). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em torno de 25 °C. Com potência de micro-ondas de 20 mW; frequência de modulação de 100 kHz; amplitude de modulação de 1,0 G; campo magnético de varredura ou largura de varredura de 100,0 G; atenuação de 10 dB (20 mW) e tempo de varredura de 168 s (Figura 17).



**Figura 17 - Espectrômetro Brucker EMXplus.  
Figura adaptada do manual do equipamento.**

#### 4.5. ESPECTROSCOPIA DE RPE NAS FORMULAÇÕES

Incorporou-se o marcador de spin entre os lipídios das membranas dos lipossomas com e sem fármacos adicionando uma pequena alíquota, 0,7  $\mu\text{L}$  do marcador 5- DSA diluído em etanol em 30  $\mu\text{L}$  de cada formulação. Essa quantidade de marcador garante uma distribuição homogênea ao longo das membranas, permitindo que o espectro de RPE descreva o comportamento mais próximo da membrana, evitando possíveis interações magnéticas entre marcadores que poderiam causar distorções nas linhas do espectro.

#### 4.6. ESPECTROSCOPIA DE RPE NO ESTRATO CÓRNEO

As membranas de estrato córneo de ratos neonatais Wistar com menos de 24 h de idade foram preparadas conforme protocolo aprovado em comitê de ética da Universidade Federal de Goiás, 022/16. Após o sacrifício do animal, retirou-se a pele com tesoura cirúrgica e a colocou em béquer contendo água destilada. Estendeu-se a pele sobre um papel filtro com a face do EC em contato com o papel, em seguida, colocou-se em dessecador contendo 0,5 L de hidróxido de amônio sob vácuo moderado por 5 minutos. As peles foram cuidadosamente depositadas em água sem o papel de filtro, permanecendo assim por 2 h. Posteriormente, separou-se cuidadosamente o EC da epiderme com o auxílio do papel filtro, onde o EC fica aderido. O EC foi lavado novamente em água destilada e estendido em uma tela de Teflon para secar à temperatura ambiente por mais 1 h. Em seguida foi feita uma secagem mais eficaz, com uso do dessecador contendo sílica em gel. Quando seco o EC foi retirado da tela de teflon e colocado entre folhas de papel de filtro, as quais foram envolvidas em papel alumínio, sendo o EC dessa forma armazenado no dessecador contendo sílica gel e vácuo até o momento do uso (CAMARGOS, 2010).

Para a medida de RPE fez-se primeiramente a hidratação do EC usando água ultra purificada. Em uma placa de vidro foi adicionada uma alíquota de 1  $\mu$ L do marcador 5-PC dissolvido em etanol (3 mg/mL) para formar uma camada fina sobre o vidro, como um filme, após a evaporação do etanol. O EC hidratado foi colocado sobre o filme de marcador de spin e após diversas passadas suaves do EC sobre o filme ocorre a incorporação do marcador. O EC foi tratado com 30  $\mu$ L de cada formulação por 2 h. Posteriormente, o EC foi introduzido em um capilar com o auxílio de um bastão metálico e o mesmo teve um dos lados selados para em seguida realizar as medidas de RPE.

#### 4.7. PARASITAS E CULTURAS DE MACRÓFAGOS

Foram cultivadas à 26°C as Promastigotas da *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8 ou 75/Josefa ) em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM suplementado com 20% de FCS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina sob condições anaeróbicas.

Macrófagos J774A.1 foram mantidos em meio RPMI 1640 ou DEMEM, pH 7,6, suplementado com L-glutamina e 10% de FCS, incubados a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

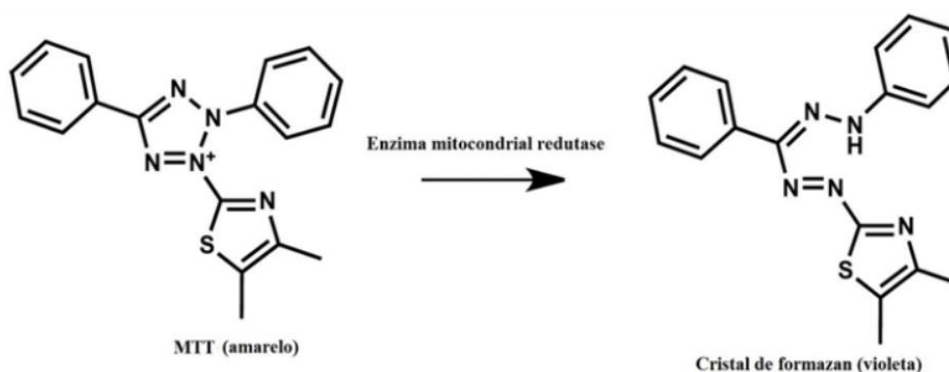
#### 4.8. ESPECTROSCOPIA DE RPE EM PROMASTIGOTAS E MACRÓFAGOS

As promastigotas foram utilizadas para ensaios experimentais quando atingiram a fase estacionária de crescimento, ou seja, no 6º dia de crescimento em cultura. As *L. amazonensis* promastigotas foram primeiro diluídas em meio RPMI 640 ou DMEM, suplementado com 10% de FCS em placas de cultura de 24 poços para uma concentração celular final da ordem de  $1,5 \times 10^7$  parasitas/mL, onde cada poço com conteúdo de 2 mL e tratadas com as formulações em diferentes concentrações (ALONSO et al., 2019). Após períodos de incubação de 5 min ou 24 h a 26 °C, as amostras foram centrifugadas a  $25.000 \times g$  por 10 min para remoção do meio de cultura e possivelmente alguns fragmentos de membrana celular também são precipitados. O sobrenadante foi descartado e os parasitas foram lavados novamente em 1 mL de PBS e ressuspensos em 50 µL de PBS. Utilizando o marcador de spin 5-DSA as amostras foram marcadas. Para incorporar o marcador de spin nas membranas do parasita, uma alíquota de 0,5 µL de uma solução etanólica de 5-DSA (5 mg/mL) foi adicionada a cada amostra de 50 µL. Para a medição do EPR, a amostra foi transferida para um tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno, que foi selado à chama em um dos lados. O capilar foi centrifugado a  $25.000 \times g$  por 5 min e o pellet do parasita de aproximadamente 2 mm foi colocado no centro da cavidade de ressonância.

Os experimentos de RPE com macrófagos foram realizados seguindo procedimento semelhante ao utilizado para medidas de *Leishmania*, com a diferença de que a concentração de macrófagos foi 30 vezes menor ( $5 \times 10^5$  células/mL). No caso dos macrófagos infectados por *Leishmania*, utilizou-se a mesma concentração celular e dois poços de 2 mL por amostra. Os macrófagos foram adicionados aos poços e aguardaram um período de 2 h para que aderissem à placa. Após esse período, as *Leishmania amazonensis* promastigotas foram adicionadas em uma proporção de aproximadamente 20 parasitas/macrófago. Após 24 h, a maior parte das *Leishmanias* não internalizadas foi removida com troca de meio e então foi realizado o tratamento com as formulações. Após 72 h de incubação, as células e o meio foram retirados da placa e transferidos para tubos eppendorfes, que foram centrifugados a 3500 g por 10 min a 4 °C. Cada amostra foi lavada uma vez em 1 mL de PBS e os procedimentos para marcação de spin e medições de RPE foram como descritos acima para parasitas. As condições de operação do equipamento de RPE estão descritas na seção 4.4. Para parte das amostras de RPE, foi adicionado MTT para avaliar a viabilidade celular.

#### 4.9. MTT

O teste do MTT serve para avaliar a viabilidade celular. Possui boa eficácia e o teste é de fácil manuseio. A função do teste de MTT é embasada na ação mitocondrial, por meio da desidrogenase, transformando o MTT, de cor amarelada, em um composto de coloração roxa, o formazan, reação essa ilustrada na Figura 18 (MOSMANN, 1983).



**Figura 18 - Reação de redução de MTT em formazan.**  
**Figura retirada de CARDOSO, 2023.**

As placas de 96 poços foram preparadas de forma estratégica para avaliar diferentes formulações em diversas concentrações. Cada coluna da placa representava uma formulação distinta, enquanto que de uma linha para a sua seguinte teria uma diminuição da quantidade de formulação em 50% mantendo o volume constante para todos os poços. Posteriormente parasitas foram diluídos em meio RPMI ou DEMEM suplementado com 10% de SFB, de forma a apresentarem uma quantidade de parasitas da ordem de  $1 \times 10^7$  células por mL, e alocadas nos 96 poços da placa. Terminada a diluição, o volume final ficou em 100  $\mu$ L, sendo metade de meio mais formulações e outra metade dos parasitas também diluídos em meio de cultura.

Após a etapa de preparação da placa, ela foi colocada na estufa em temperatura de 26 °C por 24 h. Após esse período, adicionou-se 20  $\mu$ L de MTT em cada poço, retornando a placa para estufa por um período de 3 a 4 h para que o MTT pudesse reagir por completo. Seguidamente, cada poço recebeu 50  $\mu$ L de uma solução ácida contendo SDS, para diluir os cristais de formazan e revelar a coloração roxa nos poços com viabilidade celular. Sendo assim, os poços que não apresentaram a coloração roxa são aqueles onde a concentração de formulação obteve êxito na atividade leishmanicida. A avaliação da quantidade de formazan formada foi realizada no espectrofotômetro UV/vis, utilizando um comprimento de onda de 540 nm. Os valores da metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ ) das formulações foram estimados com base na cor da suspensão contendo formazan e os dados foram expressos como

valores médios e desvios padrão levando em consideração pelo menos três experimentos independentes.

A citotoxicidade em macrófagos J774A.1 foi avaliada usando uma concentração de macrófago de  $5 \times 10^5$  células/mL e o volume final em cada poço foi de 200  $\mu$ L. Após 2 h de aderência dos macrófagos à placa, foram adicionados volumes variáveis (1 a 64  $\mu$ L) de meio de cultura contendo uma concentração fixa de lipossoma, até completar um volume final de 200  $\mu$ L de suspensão. De modo similar ao descrito acima para os parasitas de *Leishmania*, assim foi feita uma diluição seriada da quantidade de lipossoma ao longo de uma coluna da placa, isto é, de uma linha para a seguinte a quantidade de lipossoma caía pela metade. A placa foi incubada em uma estufa a 37 °C por 24 h. Após esse período, 20  $\mu$ L de MTT foram adicionados a cada poço, seguido pelo retorno da placa à estufa por mais 2 h. Após esse período de tempo a solução ácida de SDS foi adicionada e a leitura da quantidade de formazan formada foi determinada como descrito acima. A partir de três experiências independentes, foram calculados valores médios e desvios padrão de  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células).

Para o ensaio com macrófagos infectados, procedimento semelhante foi utilizado com a diferença de que após 2 h de aderência dos macrófagos à placa, promastigotas de *L. amazonensis* foram adicionados a cada poço na proporção de células de 10 parasitas/macrófago. Após 24 horas de infecção, o meio de cultura contendo a maioria dos parasitas não internalizados foi removido. Foi adicionado um novo meio de cultura (200  $\mu$ L) contendo concentrações variadas de lipossoma. Após 48 h de tratamento, adicionou-se MTT e como descrito acima a percentagem de células metabolicamente viáveis foi determinada para obter médias e desvios padrão de  $CC_{50}$  de três experiências independentes.

#### 4.10. PROCESSAMENTO DE DADOS

Cada experimento foi conduzido pelo menos três vezes independentes e os dados são expressos como média e desvio padrão. As médias foram comparadas por meio de análise de variância unidirecional (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para identificar diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos diferentes tratamentos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

As propriedades físico-químicas dos carreadores estão diretamente relacionadas com seus objetivos de utilização, considerando as barreiras biológicas que as nanopartículas precisam atravessar, a escolha das características dos carreadores se torna crucial. Estudos mostram que um dos fatores preponderantes na determinação do tempo de circulação e biodistribuição das nanopartículas são o tamanho da mesma. Lipossomas de tamanhos compreendidos entre 150 e 200 nm tem um tempo de circulação sanguíneo prolongado, sendo essa a faixa de tamanho ideal para carreadores com tais objetivos (LITZINGER et al., 1994).

Outra característica importante dos carreadores é a homogeneidade das suspensões, que pode ser verificada com base no índice de polidispersão (PDI). Esse parâmetro é tal que amostras altamente monodispersa possuem valores menores que 0,05, enquanto amostra com distribuição de tamanho muito largo tem valores maiores do que 0,70. Nos estudos de técnicas que facilitam a entrega de moléculas terapêuticas, os carreadores lipídicos com valores de PDI inferiores a 0,30 são considerados aceitáveis indicando uma população homogênea de partículas (STETEFELD et al., 2016). Na Tabela 2, temos os valores do tamanho médio das partículas e o PDI para cada uma das formulações preparadas nesse trabalho, com base em três medições.

**Tabela 2 – Diâmetro das partículas e índice de polidispersão dos lipossomas das formulações.**

Formulação	Composição	Diâmetro (nm)	PDI
F-1*	PC	95 ± 4	0,2
F-2	70% PC, 30% Col	88 ± 3	0,1
F-3	60% PC, 30% Col, 10% MTF	75 ± 1	0,1
F-4	40% PC, 30% Col, 30% MTF	76 ± 1	0,1
F-5	60% PC, 30% Col, 10% AmB	155 ± 1	0,2
F-6	50% PC, 30% Col, 10% MTF, 10% AmB	137 ± 5	0,2
F-7	30% PC, 30% Col, 30% MTF, 10% AmB	117 ± 5	0,1
F-8	Base Lipídica do AmBisome	226 ± 11	0,2
F-9	Cópia do AmBisome	196 ± 5	0,3

Com exceção da F-8, que foi utilizada apenas para obtenção dos espectros de RPE, avaliando se os lipídios diferentes, principalmente o HSPC teriam interações diferentes, e caracterização quanto à incorporação da AmB, as demais formulações ficaram com tamanho abaixo dos 200 nm, possibilitando a esterilização em filtro Millex de 0,22  $\mu\text{m}$ , sendo que este procedimento de filtração também deve possibilitar um aumento no tempo de circulação sanguínea (LITZINGER et al., 1994).

Como o valor do PDI dos lipossomas foi menor que 0,3, as suspensões podem ser tratadas como suspensões monodispersas de vesículas lipídicas. Evidenciando que o tamanho médio encontrado representa de fato o tamanho das vesículas da maior parte da população. Esse resultado indicando uma uniformidade relativamente boa das vesículas se deve ao número de vezes que os lipossomas passaram pela membrana do extrusor.

Outro fator relevante na caracterização dos carreadores lipídicos é o potencial zeta, que está relacionado com a carga elétrica na superfície das vesículas. O potencial zeta pode ser medido tomando a diferença de potencial entre a superfície da nanopartícula e a fase aquosa na qual a nanopartícula reside, utilizando a mudança na velocidade da partícula se movendo em direção a um eletrodo. Essa medida pode indicar estabilidade do lipossoma, pois quanto maior o seu módulo, maior será a força elétrica de repulsão entre as vesículas impedindo a agregação de tais partículas. Existem indicadores que lipossomas de potencial negativo, com valores abaixo de - 30 mV indicam um sistema estável, sugerindo que nesse trabalho todas as formulações são estáveis (RAVAL et al., 2019).

O potencial zeta mais elevado conduz tipicamente ao aumento da repulsão electrostática, contribuindo para uma maior estabilidade. Assim o valor do potencial zeta está diretamente ligado à estabilidade das suspensões coloidais, por isso a adição do colesterol contribui para uma maior estabilidade dos lipossomas (HUNTER, 2013).

Na Tabela 3, temos os valores do potencial zeta para cada uma das formulações e também a densidade de vesículas das formulações. Os resultados dessas medidas indicam uma estabilidade nas formulações F-6, F-7, F-8 e F-9. Além de sugerir que quanto maior a quantidade de MTF, nas formulações contendo AmB, mais negativo teremos o potencial zeta, pois comparando os valores de F-5, F-6, e F-7, onde a quantidade do fármaco era nula na primeira e aumentou para 10% e 30%, respectivamente. Outro fator que se deve salientar é que a retirada de PC dessas amostras também contribui para a diminuição do módulo do potencial zeta, haja vista que o colesterol pode neutralizar parcialmente a carga negativa das cabeças dos fosfolipídios o que iria deixar o potencial zeta maior (SZCZES, 2013; OLIVEIRA, 2021).

**Tabela 3 - Potencial zeta e densidade populacional dos lipossomas das formulações.**

Lipossoma	Potencial zeta (mV)	Densidade populacional x 10 <sup>11</sup> ( Partículas/ mL )
F-1	-20 ± 1	-
F-2	-22 ± 1	-
F-3	-17 ± 1	5,4 ± 0,3
F-4	-14 ± 1	1,6 ± 0,1
F-5	-26 ± 1	2,2 ± 0,5
F-6	-28 ± 1	5,2 ± 0,1
F-7	-30 ± 1	3,7 ± 0,4
F-8	-50 ± 3	-
F-9	-41 ± 3	1,8 ± 0,1

No HPLC, com as formulações diluídas em metanol, após a curva de calibração da MTF, foram obtidas as concentrações finais do fármaco presente nas formulações como mostrado na Tabela 4. Como a AmB tem possibilidade de formação de sais aglomerados que podem ser perdidos nos processos de extrusão e filtragem (LEMKE et al., 2005), nas amostras com a presença de AmB foi feita uma medida da concentração final do fármaco após a preparação dos lipossomas. Com base nesta avaliação foi verificado que houve uma diminuição da quantidade de AmB em relação ao que foi inicialmente colocado. Ainda na Tabela 4, estão apresentadas as quantidades de AmB que foi aferida para os lipossomas e a quantidade restante nas amostras.

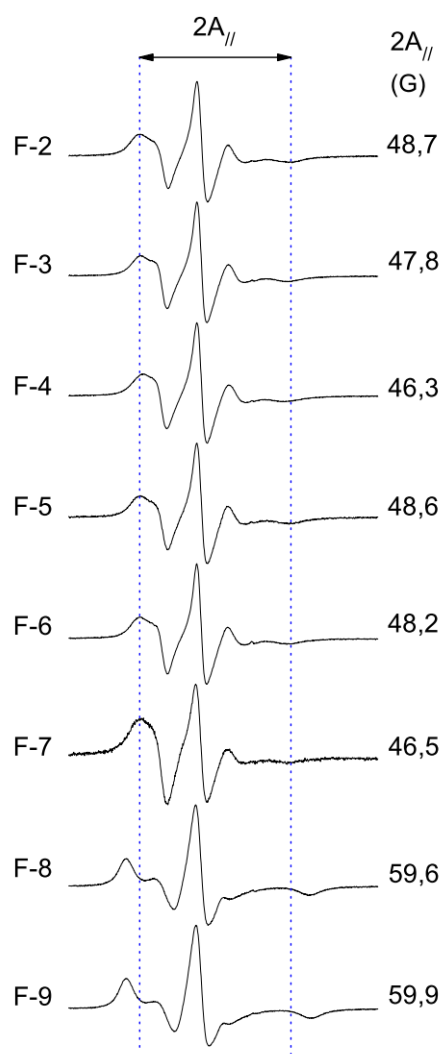
**Tabela 4 - Concentrações inicial e restante dos fármacos nas formulações.**

Formulação	MTF		AmB	
	Concentração inicial (mM)	Concentração medida (mM)	Concentração inicial (mM)	Concentração medida (mM)
F-3	1,00	1,19		
F-4	3,00	2,22		
F-5			1,00	0,45 ± 0,32
F-6	1,00	0,92	1,00	0,49 ± 0,32
F-7	3,00	2,22	1,00	0,49 ± 0,11
F-9			1,00	0,77 ± 0,65

## 5.2. ESPECTROSCOPIA DE RPE NOS LIPOSSOMAS

Na espectroscopia de RPE de marcador de spin, o parâmetro  $2A_{//}$  (desdobramento hiperfino externo) indica o estado de fluidez ou rigidez da membrana, quanto maior esse parâmetro mais rígido está o meio onde se encontra o marcador. Esse parâmetro é medido

diretamente no espectro RPE, sendo dado pela separação em valores de campo magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido (Figura 19).



**Figura 19 – Espectros de RPE representativos do marcador de spin 5-DSA incorporado nas bicamadas lipídicas das formulações. Os valores do parâmetro de RPE  $2A_{//}$  (desdobramento hiperfino externo) estão indicados para cada espectro sendo que seu erro experimental estimado é de 0,5 G. A intensidade dos espectros foi normalizada e está em unidades arbitrárias (eixo Y). A faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro RPE foi de 100 G (eixo X).**

\*F-1: PC; F-2: 70% PC, 30% Col; F-3: 60% PC, 30% Col, 10% MTF; F-4: 40% PC, 30% Col, 30% MTF; F-5: 60% PC, 30% Col, 10% AmB; F-6: 50% PC, 30% Col, 10% MTF, 10% AmB; F-7: 30% PC, 30% Col, 30% MTF, 10% AmB; F-8: Base Lipídica do AmBisome; F-9: Cópia do AmBisome

A formulação F-2, é a base lipídica das demais formulações, com exceção da F-8 e F-9, que contém o HSPC. Por essa razão medimos o valor do  $2A_{//}$  para tê-lo como parâmetro para a análise da ação dos fármacos na membrana do carreador. É conhecida a ação fluidizante

tanto da PC como da MTF, assim, mesmo que F-3 e F-4 tenham menos PC do que F-2 percebe-se que causam a diminuição do parâmetro  $2A_{//}$  do espectro, evidenciando o aumento de fluidez dessas formulações ocasionado pela MTF. Nota-se ainda que quanto maior a concentração de MTF, 10% em F-3 e 30% em F-4, menos rígida, ou melhor, mais fluida se torna a formulação como verificado no trabalho de Lais Alonso e colaboradores (2021).

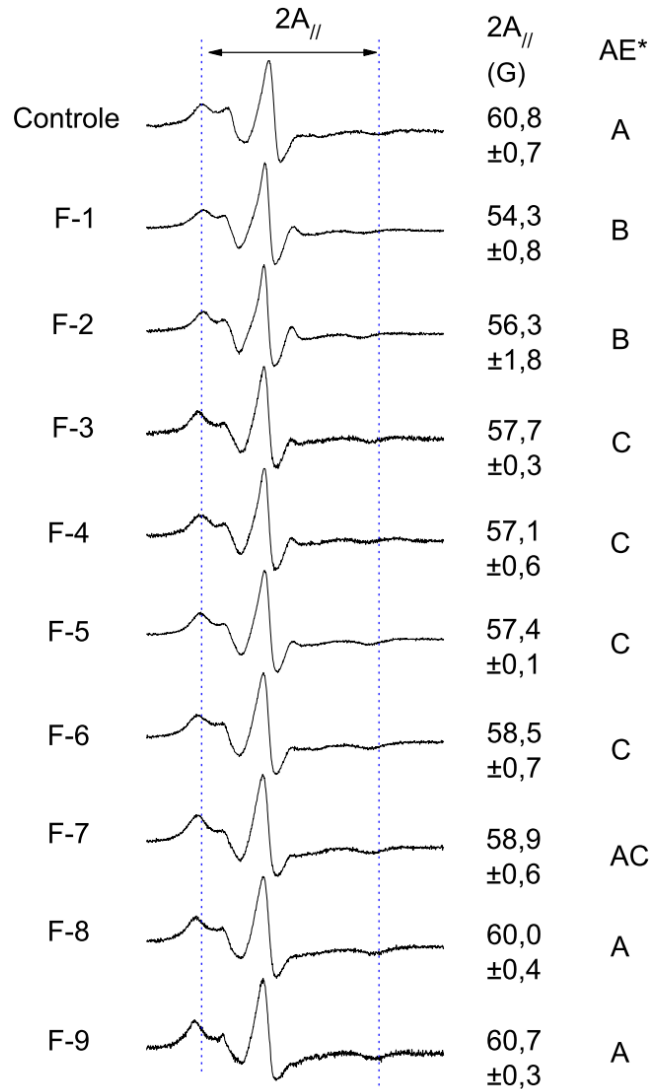
As medidas desse trabalho não indicam alteração nas membranas no espectro de RPE por conta da AmB. Nota-se que respeitando a margem do erro experimental estimado de 0,5 G temos que o  $2A_{//}$  das F-2 e F-5, que diferem apenas pela presença ou não da AmB, é essencialmente o mesmo. Resultado similar está evidente comparando F-3 com F-6, F-4 com F-7, e também F-8 com F-9, onde as mudanças entre os pares de formulação se atribuem apenas à presença ou ausência de AmB, respectivamente. Estes dados revelam que a AmB não altera a fluidez de membrana dos lipossomas, o que está de acordo com o que foi verificado por Lais Alonso e colaboradores (2020), sobre a não alteração de fluidez em membranas modelos induzida pela AmB. Os resultados também concordam com o modelo da esponja de esterol, onde a AmB não entra nas bicamadas lipídicas e apenas forma agregados extramembranares (ANDERSON et al., 2014).

Já as duas últimas formulações, F-8 e F-9 possuem PC na forma hidrogenada em sua composição o HSPC. Como a HSPC é uma forma hidrogenada da PC, ela perde duplas ligações deixando sua cadeia mais saturada. Essa saturação aumenta a linearidade das cadeias, facilitando o empacotamento e resultando em uma membrana mais rígida. A diferença da F-9 em relação a F-8 é a adição de AmB, que não altera a fluidez da membrana modelo como mencionado acima.

### 5.3. FORMULAÇÕES CONTENDO PC POSSUEM EFEITO FLUIDIZANTE NOS LIPÍDEOS DO ESTRATO CÓRNEO

O estrato córneo é a principal barreira de permeabilidade da pele, localizado na camada epidérmica superior, sendo composto por corneócitos circundados por uma matriz lipídica multilamelar. Como um dos objetivos do trabalho é obter uma formulação para tratamento tópico da Leishmaniose cutânea, é importante investigar como os lipossomas alteram a fluidez das membranas intercelulares do EC, a qual está relacionada com as mudanças de permeabilidade que as formulações poderiam causar na pele (ALONSO et al., 1995 e ALONSO et al., 1996). Dessa forma a espectroscopia de RPE de marcadores de spin incorporados no EC pode revelar em que grau as formulações pode mudar o estado de fluidez

das membranas intercelulares, a principal barreira física da permeabilidade na pele. A Figura 20 mostra espectros representativos de RPE do marcador 5-PC incorporado no EC que foi tratado com as formulações por 2 h.



**Figura 20 - Espectros de RPE representativos do marcador de spin 5-PC incorporado nas membranas intercelulares do Estrato Córneo, após 2 h de tratamento. Os valores de média e desvio padrão do parâmetro de RPE  $2A_{//}$  são indicados para cada espectro. \*AE = análise estatística: As médias indicadas com letras maiúsculas em comum não são estatisticamente diferentes com  $P < 0,05$ .**

Pela análise dos espectros verifica-se a ação fluidizante da fosfatidilcolina no EC. Pois comparando o valor do  $2A_{//}$  do controle (somente o EC com o marcador 5-PC) com o espectro do marcador do EC tratado com a F-1, que possui apenas PC, vemos uma diminuição de 6,5 G, o que mostra um aumento expressivo na fluidez, considerando que o erro experimental é de apenas 0,5 G. A F-2 possui 30% de colesterol, por conta disso, menos PC. Estima-se assim que o aumento do parâmetro  $2A_{//}$  do marcador no EC tratado com a F-2 comparado ao que foi

tratado com F-1 seja devido à retirada de PC e não por conta da adição do colesterol, que foi colocado para melhorar a estabilidade da formulação. Mesmo assim F-2 com uma diminuição do valor do  $2A_{//}$  em relação ao controle de 4,5 G, o que revela um grande aumento na fluidez do EC e ainda temos que F-1 e F-2 são estatisticamente iguais. Pode-se notar também que o lipídeo HSPC presente nas F-8 e F-9, mantendo o valor de controle em torno de 60 G. Isto nos leva a acreditar que tal lipídio não modifica a permeabilidade do EC.

Alonso e colaboradores (2012) demonstraram a ação fluidizante da MTF nas membranas intercelulares de EC. Entretanto, a F-3 e F-4 possui um valor do  $2A_{//}$  maior do que os das F-2 e F-1, indicando uma menor ação fluidizante e nos levando a crer que a PC tem maior ação fluidizante do que a MTF, ou seja, a retirada da PC deu maior efeito de rigidez do que o efeito de fluidez proporcionado pela MTF adicionada. No entanto, os efeitos parecem não serem lineares, sendo que a MTF em maior concentração tende a ter uma ação fluidizante mais eficaz, pois ao reduzir a concentração na F-4 em relação a F-3, aumentando a concentração de MTF, o valor do  $2A_{//}$  aumentou um pouco, mas temos uma igualdade estatística entre as formulações F-3, F-4, F-5, F-6 e F-7. Sendo que F-7 não possui diferença estatística com F-8 e F-9, evidenciando que a retirada da PC ou a substituição pela sua forma hidrogenada diminui o efeito de fluidez das formulações no EC.

A AmB não alterou a fluidez das membranas intercelulares do EC assim como não altera nas membranas modelo, como sugerido pelo modelo de esponja de esterol e também verificado em outros trabalhos (ANDERSON et al., 2014; ALONSO et al., 2020; ALONSO et al., 2021). Podemos verificar isso comparando o resultado de F-8 e F-9 que tendo a mesma composição lipídica não mudou o valor do parâmetro  $2A_{//}$  tendo resultado estatisticamente iguais. Em trabalhos anteriores de nosso laboratório foi proposto pela primeira vez que a AmB só entra em membranas contendo proteínas (ALONSO et al., 2020; ALONSO et al., 2021). No caso do EC é bem aceito que as membranas intercelulares não possuem proteínas embebidas nas camadas lipídicas.

Olhando para os valores de F-5 e F-3 pressupõe-se que o aumento de rigidez em relação à F-1 é devido exclusivamente à retirada da PC, pois ambas as F-5 e F-3 têm a mesma quantidade de PC, diferenciando as formulações somente pelo fármaco presente, sendo que a F-5 contém AmB e F-3 contém 10% de MTF. Esses dados também indicaram que a adição de apenas 10% de MTF na formulação não produziu efeito no EC.

A capacidade fluidizante da PC em comparação com o HSPC é uma justificativa para uso tópico, pois ao fluidizar o EC deixa-o mais permeável, o que facilita a passagem do fármaco na pele, facilitando o acesso do princípio ativo aos parasitas. A MTF em maior

quantidade também tem efeito fluidizante, mas ela não é considerada boa facilitadora da permeação cutânea por conta da sua toxicidade (ALONSO et al., 2012).

#### 5.4. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM LEISHMANIAS

Embora as atividades dos fármacos MTF e AmB contra *L. amazonensis* já tenham sido relatadas, este estudo realizou novas análises para comparar os resultados da ação dos fármacos isolados com os das formulações lipídicas que os contêm. A Tabela 5 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> com a concentração teórica dos fármacos presente em cada formulação. O valor IC<sub>50</sub> representa a concentração de um composto necessário para inibir 50% do crescimento em comparação com o controle. É um parâmetro crucial na avaliação da potência de um fármaco contra um parasita ou agente patogênico específico. Os parâmetros de atividade antiproliferativa apresentados na Tabela 6 estão próximos dos dados relatados.

Fernandes e colaboradores (2017) verificaram que os valores de IC<sub>50</sub> dependem da concentração celular, foram relatados valores de IC<sub>50</sub> de 12 µM de MTF em promastigotas. Já Scariot e colaboradores (2017) encontraram valores de IC<sub>50</sub> para a MTF de 21 µM para promastigotas e 2 µM para amastigotas. Para AmB, os valores de IC<sub>50</sub> relatados foram menores do que 1 µM em ambos os estudos. Sendo os resultados encontrados nesse trabalho coerentes com os relatados acima.

**Tabela 5 – Valores de IC<sub>50</sub> dos lipossomas em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os valores medidos em volume foram convertidos em concentrações correspondentes dos fármacos presentes nas formulações, com base na composição medida das formulações.**

Form.	IC <sub>50</sub> (µL) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>	
	Lipossoma	Carreadores /parasitas	MTF	AmB
F-4	0,333 ± 0,152	35,52	7,383 ± 3,38	-
F-5	0,012 ± 0,006	1,76	-	0,058 ± 0,029
F-6	0,009 ± 0,001	3,12	0,086 ± 0,01	0,045 ± 0,006
F-7	0,009 ± 0,001	2,22	0,207 ± 0,03	0,045 ± 0,006
F-9	0,012 ± 0,006	1,44	-	0,097 ± 0,049

<sup>a</sup>Volume de lipossoma presente em 100 µL de meio de cultura para inibir pela metade o crescimento do parasita.

<sup>b</sup>Valores calculados com base na concentração medida de fármaco na formulação.

Curiosamente, as concentrações relatadas das formulações que são inibitórias para os parasitas são semelhantes àquelas onde começam os efeitos de rigidez na membrana das

*Leishmanias* após 24 h de tratamento como indicado na Figura 20. Assim, é provável que a ação primária das formulações contra os parasitas seja na membrana dos mesmos.

Os valores de  $CC_{50}$ , representando as concentrações em que a viabilidade celular é reduzida em 50%, fornecem informações sobre os efeitos citotóxicos dos compostos em diferentes tipos de células. Estes valores são essenciais para avaliar a segurança e tolerabilidade terapêutica em células de mamíferos (Tabela 6).

**Tabela 6 – Valores de  $CC_{50}$  das formulações em macrófagos J774A.1 baseado na viabilidade celular em ensaio de 24 h.**

Formulação	$CC_{50}$ (%) <sup>a</sup>	$CC_{50}$	$CC_{50}$ ( $\mu$ M) <sup>b</sup>		IS <sup>c</sup>
	Lipossoma	Carreadores /macrofágos	MTF	AmB	
F-4	> 25	80.000	> 554	-	> 75
F-5	> 10	44.000	-	> 45,4	> 833
F-6	> 10	104.000	> 92	> 48,7	> 1111
F-7	> 10	74.000	> 222	> 48,7	> 1111
F-9	> 10	36.000	-	> 76,8	> 833

<sup>a</sup>Percentual de volume de lipossoma presente no meio de cultura para reduzir pela metade a viabilidade celular.

<sup>b</sup>Valores calculados com base na concentração medida de fármaco na formulação.

<sup>c</sup>Baseado no volume de formulação;  $IS = CC_{50}/IC_{50}$ .

A tabela revela os valores das concentrações molares com base nos volumes de formulações encontrados em microlitros, para uma ação citotóxica. Foi necessário um volume relativamente alto das formulações, indicando que as mesmas possuem baixa toxicidade. Scariot e colaboradores (2017) encontraram valores de  $CC_{50}$  para a MTF em macrófagos J774.A1 de aproximadamente de 55  $\mu$ M enquanto que para a AmB, o valor de  $CC_{50}$  relatados foi de 3,74  $\mu$ M. Sendo os resultados encontrados nesse trabalho com menor toxicidade por ter valores de  $CC_{50}$  bem maiores do que o relatado acima para ambos os fármacos.

O  $IC_{50}$  indica a atividade inibitória enquanto  $CC_{50}$  a atividade citotóxica de um composto, e a razão entre o  $CC_{50}$  e o  $IC_{50}$  é conhecida como índice de seletividade (IS) de uma substância. Quanto maior esse índice, mais seletivo e seguro é o composto, ou a formulação (Tabela 6). A F-9 é uma representação da formulação comercial utilizada no tratamento contra a leishmaniose, apresentou alto IS, denotando sua eficácia e segurança. As formulações contendo AmB preparadas nesse trabalho mostraram valores de IS tão altos quanto os da F-9, sugerindo que neste particular são tão boas quanto a formulação comercial, inclusive se o IS for calculado tendo como base os valores de  $CC_{50}$  e o  $IC_{50}$  com relação ao número de vesículas

por macrófagos e por *Leishmanias* respectivamente teremos valores iguais dessas duas formulações a 25.000 indicando que ambas as formulações são seletivas e seguras.

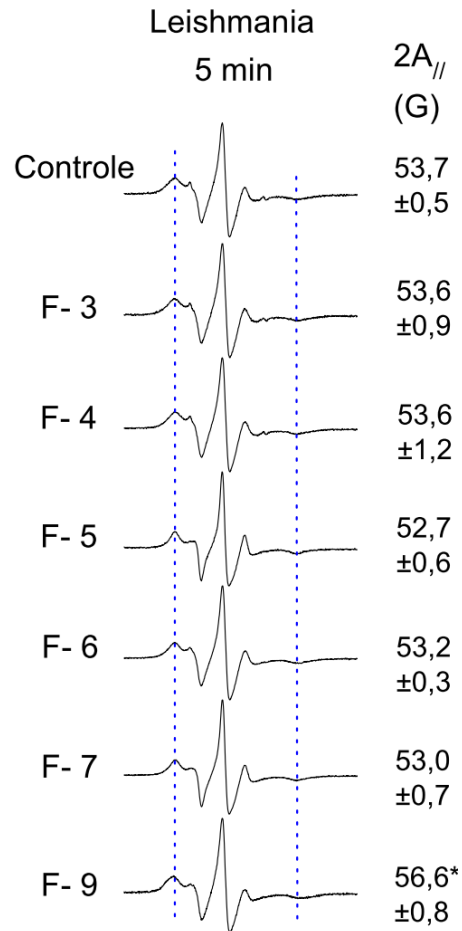
## 5.5. ESPECTROSCOPIA DE RPE NO ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DAS FORMULAÇÕES EM LEISHMANIAS

### 5.5.1. A presença física das formulações não mostrou efeito na membrana de *Leishmania*

Ao analisar os espectros medidos após 5 min de tratamento das *Leishmanias* com 80  $\mu\text{L}$  de formulação em 2000  $\mu\text{L}$  de meio com os parasitas, buscou-se encontrar o efeito da presença física das formulações nas membranas das *Leishmanias*. Em estudos anteriores, com os fármacos, MTF e AmB dissolvidos em PBS, foi demonstrado que os mesmos causam alterações na fluidez da membrana das *L. amazonensis* promastigotas. Para uma concentração de MTF a partir de 10  $\mu\text{M}$  foi observado um aumento na fluidez da membrana, sendo a ação do fármaco principalmente no componente proteico da membrana plasmática (MOREIRA et al., 2014; FERNANDES et al., 2017; ALONSO et al., 2019)

Os espectros RPE mostrados na Figura 19 mostram que não há mudança significativa em relação ao controle. Trabalhos com a AmB em concentrações a partir de 4  $\mu\text{M}$  causa aumentos pronunciados na rigidez da membrana das *Leishmanias* como efeito de presença física (ALONSO et al., 2021; DAS et al., 2013). No entanto, foi observado que ao incorporar a AmB aos carreadores lipídicos, tal resultado não é observado. O espectro de F-5 assemelha-se ao do controle, sem diferença estatística, sugerindo que os marcadores estão em maior parte na formulação e não nas membranas das *Leishmanias*. Comparando F-6 com F-3 e F-7 com F-4, nota-se que a AmB não mostrou efeito de presença física nas membranas do parasita. Pois nesses experimentos tem-se uma concentração de 28  $\mu\text{M}$  de AmB e em trabalhos anteriores foi reportado que concentrações de AmB de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$  já apresentamm efeito de rigidez de membrana nos parasitas (ALONSO et al., 2021). Isto mostra que a AmB não é transferida rapidamente dos lipossomas para a membrana do parasita.

A diferença no espectro do F-9 pode ser devido aos componentes lipídicos diferentes. O HSPC é mais rígido do que o PC, logo esse efeito rigidez como presença física pode ser atribuído à formulação lipídica.

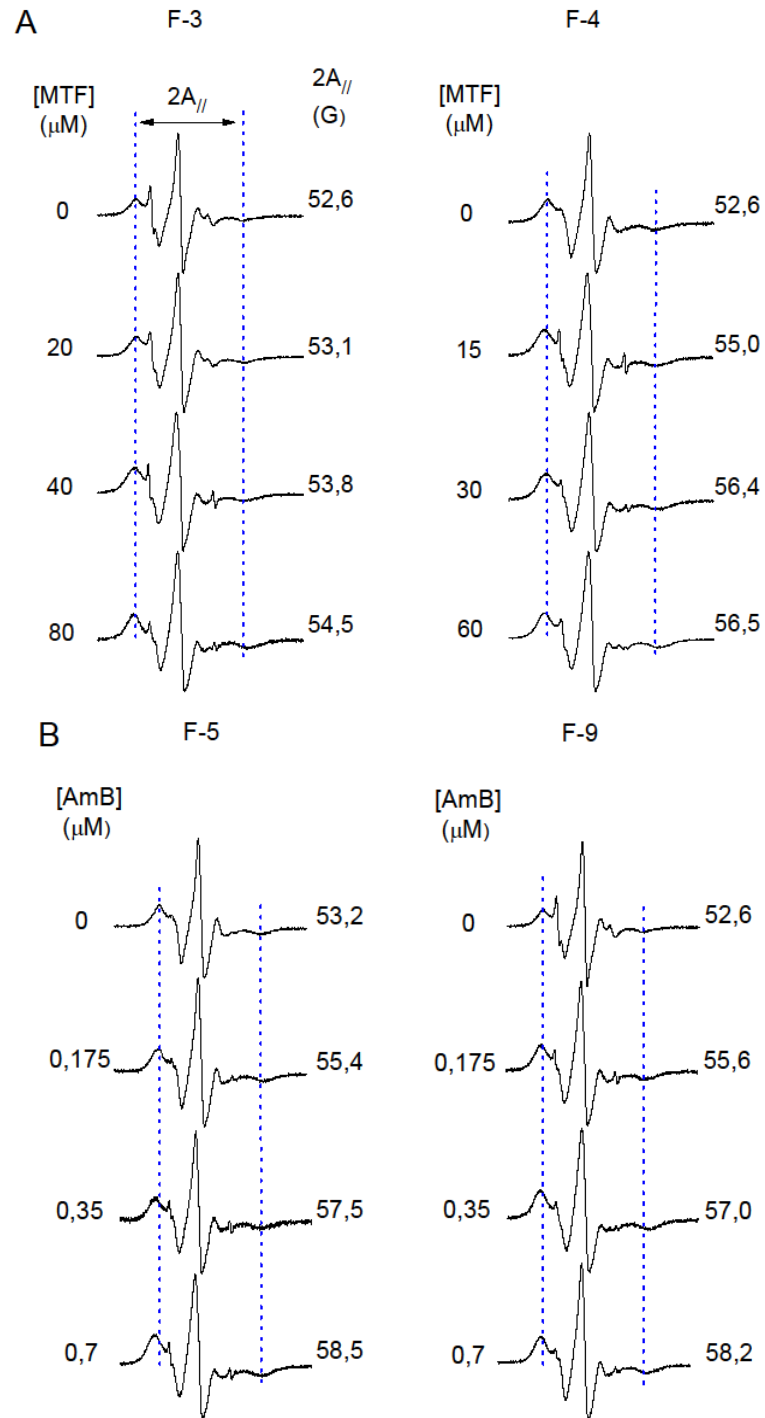


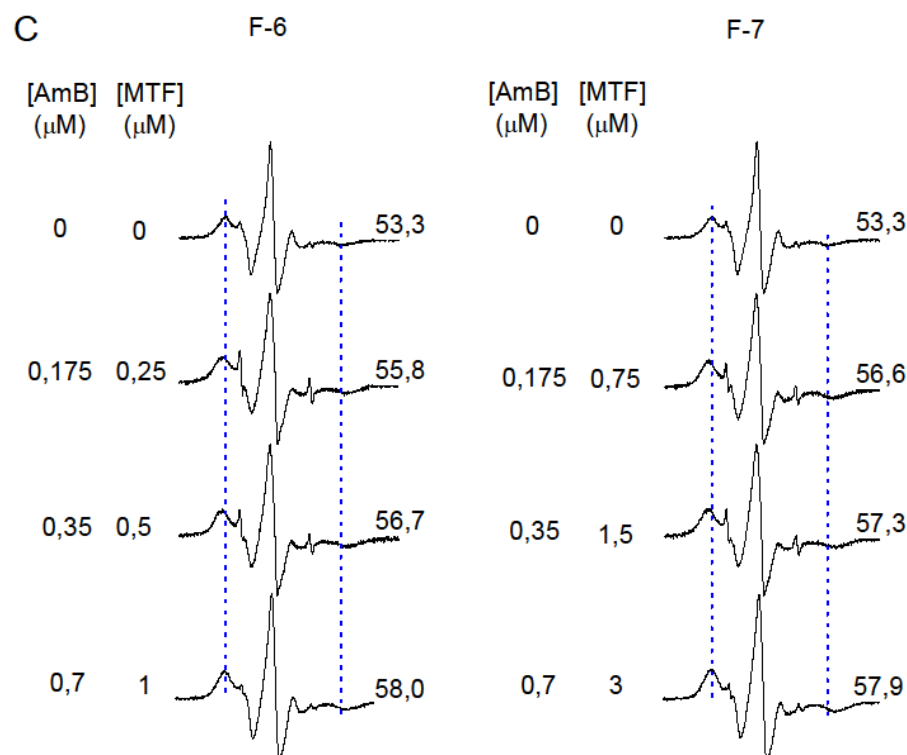
**Figura 219 - Espectros representativos de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado nas Leishmanias tratadas com formulações por 5 min.**

**A cada 2 mL de volume total contém 90  $\mu$ L de cada formulação informada. Os valores do parâmetro de RPE  $2A_{//}$  estão indicados para cada espectro. \*Somente a formulação F-9 é estatisticamente diferente da amostra de controle com  $P < 0,05$ .**

#### 5.5.2. Formulações causam rigidez de membrana da *Leishmania*

Na Figura 20, temos os espectros representativos de RPE do 5-DSA na membrana plasmática de *L. amazonensis* promastigota para células não tratadas e tratadas com diferentes concentrações das formulações contendo MTF e AmB. Como o erro experimental estimado do parâmetro  $2A_{//}$  é de apenas 0,5 G, percebe-se a ação das formulações após 24 h de tratamento, com efeito de tornar as membranas mais rígidas, o qual foi dependente da concentração.





**Figura 20 - Espectros representativos de RPE do marcador 5-DSA incorporado nas membranas de *Leishmanias* tratadas com formulações por 24 h. As concentrações dos fármacos estão indicadas para cada uma das formulações. Os valores do parâmetro RPE  $2A_{//}$  são indicados para cada espectro sendo que seu erro experimental estimado é de 0,5 G.**

No painel A da Figura 20, observa-se que a MTF provoca rigidez na membrana das *Leishmanias*. Sendo que o resultado interessante é que a F-4 foi mais eficaz do que a F-3, indicando que a concentração de 30%, em massa molar de MTF, confere mais rigidez às membranas dos parasitas que os carreadores com 10% de MTF. Como a F-4 não havia causado fluidez nem rigidez no teste de 5 min e houve efeito de rigidez no teste de 24 h, sugere que a causa seja a ocorrência de peroxidação lipídica e/ou oxidação das proteínas das membranas.

Segundo a Nota Informativa N° 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS (Ministério da Saúde, 2020) a MTF tem um efeito inibidor de biossíntese de fosfolipídios e esteróis na membrana celular das *Leishmanias* o que levará a morte do parasita por conta de alguns mecanismos de ação ainda não elucidados por possuir mais de um sítio de ação celular.

que causam morte nas *Leishmanias* também induz um aumento na fluidez na membrana dos parasitas, sugerindo que tal efeito é a ação inicial que possibilita o resultado leishmanicida do fármaco. O estudo mostra que a MTF tem um efeito de aumentar a dinâmica da cadeia polipeptídica das proteínas ligadas à membrana. Tal conclusão foi tomada a partir da análise dos espectros de RPE com base nos valores do parâmetro  $2A_{//}$ , mostrando que quanto

maior a concentração de MTF maior o efeito sobre a membrana. Além de citarem outros trabalhos onde a MTF tem efeitos semelhantes sobre outros patógenos.

Outro estudo da ação da MTF mostrou que os macrófagos são menos sensíveis ao fármaco do que as *Leishmanias*. Indicando ainda que a MTF gera mudanças na fluidez da membrana e causam lise celular com concentrações semelhantes para ambos os efeitos. O que indica que o primeiro alvo do fármaco nos parasitas sejam as membranas dos mesmos. Revelaram ainda que a MTF não simplesmente passa através da membrana plasmática para se acumular dentro dos parasitas, mas na verdade se acumulam em seus componentes lipídicos e proteicos em grandes taxas (FERNANDES et al., 2017). Laís Alonso e colaboradores (2021) também mostraram que a ação primordial da MTF está na membrana plasmática do parasita uma vez que a concentração mínima que causa alteração no espectro de RPE é semelhante daquela que apresenta atividade antiproliferativa/citotóxica.

Estudo com outras técnicas também indicam que a MTF causa perda na integridade das membranas das *Leishmanias* além de produção de ERO e também danos mitocondriais em protozoários mostrando ações que levam a morte celular por apoptose. Além de apresentar os mecanismos de ação, tal pesquisa evidência a seletividade medicamentosa da MTF, pois as células de mamíferos foram afetadas de forma diferente (SCARIOT et al., 2017).

É bem conhecido que o aumento na produção de ERO provoca peroxidação lipídica o que altera a permeabilidade das membranas e pode inclusive provocar a apoptose celular. Tal aumento ainda pode afetar o funcionamento das mitocôndrias (JOVANOVIC et al., 2019; ZHONG e YIN, 2015). Estudos em cepas de *Leishmanias* resistentes a MTF sugeriram que o metabolismo das *Leishmanias* resistentes é melhor na resistência ao estresse oxidativo (DAS et al., 2013). Veronica e colaboradores (2019) indicaram que nos parasitas resistentes à MTF não ocorrem a formação de ERO após o tratamento com o fármaco.

No Painel B da figura 23, temos que a ação de rigidez das formulações F-5 e F-9 é semelhante. F-9 é uma formulação semelhante à formulação comercial AmBisome, que possui boa eficácia mas alto custo. A F-5 é uma nova alternativa para o tratamento da leishmaniose sugerida por esse trabalho, tendo resultados de testes *in vitro* semelhantes à formulação comercial conhecida, com o diferencial de ter um custo menor de produção por conta de sua composição lipídica. Outra vantagem para o uso tópico da formulação F-5 em relação à F-9 está no fato de sua ação fluidizante no EC o que facilita sua absorção e consequentemente sua chegada às células infectadas.

Laís Alonso e colaboradores (2020), por meio da espectroscopia de RPE dos lipídios marcados por spin sugeriram que a AmB não entra nos modelos de membranas e

provavelmente forma agregados extramembranosos, como previsto pelo modelo de esponja de esterol. Também demonstraram uma interação diferente da AmB com a membrana da célula que contém proteínas. A fluidez da membrana celular diminui gradualmente com o aumento da concentração de AmB, indicando que o fármaco induz diminuições acentuadas na dinâmica lipídica. Sendo que esses resultados são consistentes com a teoria geralmente aceita de que a AmB forma agregados com esteróis no interior da membrana, que resulta em canais iônicos. Esses canais podem restringir a mobilidade do marcador de spin levando a um aumento do parâmetro  $2A_{//}$ . Encontraram ainda um aumento expressivo de tal parâmetro para concentrações de AmB superiores a 25% molar.

No Painel B, ainda vemos um grande aumento no parâmetro  $2A_{//}$  indicando uma diminuição na dinâmica das membranas das *Leishmanias* para concentrações bem menores de AmB do que no trabalho citado acima. Os resultados deste trabalho mostraram que ambos os fármacos MTF e AmB causaram rigidez de membrana no parasita e as formulações foram capazes de fazer uma entrega eficiente dos fármacos para as membranas das *Leishmanias*.

Ainda na Figura 23, em seu painel C, temos outras formulações sugeridas por esse trabalho com uma composição mista dos fármacos AmB e MTF. Neste caso, as formulações contendo a MTF não apresentaram maiores efeitos porque o efeito da AmB é predominante. A MTF e AmB, são fármacos que possuem atividade contra o parasita em concentrações muito diferentes com valores de  $IC_{50}$  de aproximadamente 10 e 0,1  $\mu$ M, respectivamente (ALONSO et al., 2019; ALONSO et al., 2021). A razão entre essas concentrações é de  $\sim 100x$  e nas formulações foi colocado inicialmente no máximo 3x mais MTF do que AmB (30% de MTF e 10% de AmB). Assim, nas formulações F-6 e F-7 os efeitos antiproliferativos foram basicamente os da AmB e a contribuição da MTF não foi significativa.

### 5.5.3. A rigidez da membrana causada pelas formulações pode ser atribuída ao estresse oxidativo

Conhecer os mecanismos de ação dos fármacos contra os patógenos é o caminho para a procura de novos fármacos, sendo isso fundamental em situações onde os patógenos tornam-se resistentes aos medicamentos existentes. Nesse intuito observou-se que os fármacos que matam os microrganismos através da formação de ERO é uma estratégia potencial (para um trabalho de revisão recente veja LAM et al., 2020). A morte dos parasitas devido ao estresse

oxidativo é proveniente do desequilíbrio entre as ERO e a capacidade do sistema de defesa antioxidante. As ERO são definidas como um número de moléculas altamente reativas que compõem o oxigênio molecular ( $O_2$ ) como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $\bullet OH$ ) (LAM et al., 2020).

Shahina e colaboradores (2022) mostram que os monoterpenos ativos de 1,8-cineol e  $\alpha$ -pineno, que estão presentes no óleo essencial de alecrim, induzem letalidade em *Candida albicans* dependente de ERO. Esses monoterpenos causam despolarização da membrana citoplasmática, que foi avaliada por meio sonda sensível ao potencial de membrana.

Também estudos de 1986 feitos por Sokol-Andreson e colaboradores, avaliaram o vazamento de íon potássio induzido por AmB em protoplastos de *Candida albicans*. Os efeitos letais e líticos devido a AmB nas células foram protegidos pela presença de catalase exógena e superóxido dismutase. A redução de oxigênio no ambiente também diminuiu significativamente os efeitos do vazamento dos íons provocados pela AmB. Tais fatos indicam que a atividade da AmB foi mediada por estresse oxidativo.

Os compostos miconazol e ciclopiroz juntamente com a AmB foram identificados como agentes antifúngicos com uma via comum de morte celular por estresse oxidativo em *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Foi demonstrado que tal letalidade envolve a produção de ERO de maneira dependente do ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia respiratória (BELENKY et al., 2013).

Outro estudo, aponta que a AmB é responsável por indução intracelular de ERO em 44 diferentes espécies de leveduras patogênicas. Nesse estudo, ainda é demonstrado que a rotenona inibe a cadeia respiratória mitocondrial reduzindo a indução de ERO, bem como a ação antifúngica da AmB. Mostrou ainda, que em cepas resistentes à AmB houve uma redução significativa na produção de ERO, alteração no potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxigênio e ainda maior atividade da catalase do que nas demais cepas que foram suscetíveis à AmB. Mostrando assim que a produção de ERO é um mecanismo de ação universal e correlacionando com sua atividade fungicida da AmB (MESA-ARANGO et al., 2014).

Das e colaboradores (2013) investigaram a resistência da *Leishmania* à MTF e sua relação com as ERO. O estudo demonstrou que a superóxido dismutase de ferro mitocondrial (FeSOD) de *Leishmania donovani* desempenha um papel crucial na proteção do parasita contra o estresse oxidativo induzido pela MTF. Ao neutralizar as ERO, a FeSOD mitocondrial ajuda a preservar a viabilidade do parasita em condições adversas, contribuindo assim para a resistência à MTF. A superóxido dismutase é uma enzima vital que transforma o ânio

superóxido em  $H_2O_2$ , que é menos tóxico, e oxigênio. A Ascorbato peroxidase elimina  $H_2O_2$  convertendo-o em água. Assim essas enzimas protegem o parasita do estresse oxidativo e danos subsequentes. Existe uma correlação direta entre ERO e dano mitocondrial e alteração no potencial de membrana mitocondrial. Outros estudos (GETACHEW e GEDAMU, 2012; VERONICA et al., 2019) revelaram por meio de análises diferentes o mesmo resultado, que os parasitas resistentes a MTF mostraram uma diminuição considerável na formação de ERO após o tratamento com MTF.

A rigidez da membrana dos parasitas, detectada por espectroscopia de RPE, tem sido associada à produção excessiva de ERO e à redução do potencial de membrana. Estudos de Alonso e colaboradores (2021, 2022), bem como o de Desoti e colaboradores (2012), constataram essa mesma rigidez em suas pesquisas. Além disso, foi relatado que altos níveis de rigidez nas promastigotas de *Leishmania amazonensis* podem ser induzidos pelo tratamento com o agente oxidante peróxido de hidrogênio, conforme descrito em Alonso e colaboradores (2020).

É bem conhecido que a ivermectina ativa canais de cloreto dependentes de glutamato no parasita, dando origem a um influxo de íons de cloro e consequente hiperpolarização da membrana plasmática. Esse aumento provoca uma alteração no potencial de membrana mitocondrial, que por sua vez desencadeia em outros eventos, tais como a produção de ânion superóxido a partir do vazamento de elétrons da membrana mitocondrial. A subsequente peroxidação lipídica causada pelo ânion superóxido leva à formação de aldeídos reativos que causam a rigidez da membrana (KANE et al., 2000).

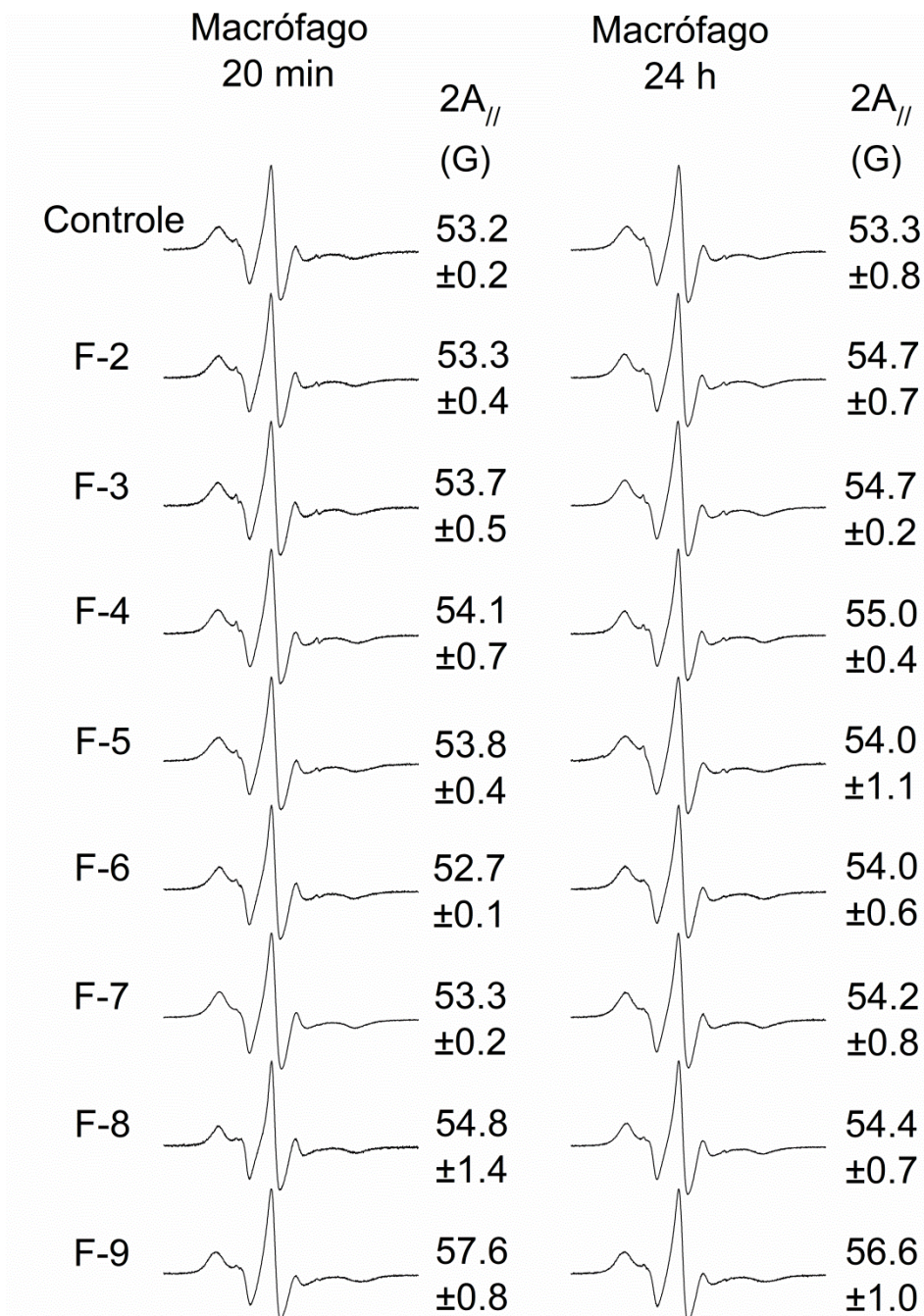
A espectroscopia de RPE com um marcador de spin incorporado à membrana plasmática das *Leishmanias* demonstrou que o tratamento com as formulações em meio de cultura causa rigidez de membrana de forma dependente de concentração, devido a processos oxidativos.

## 5.6. ESPECTROSCOPIA DE RPE EM MACRÓFAGO

### 5.6.1. Sem efeito de presença física das formulações nos macrófagos nem mesmo efeito de rigidez após 24 h de tratamento.

Na Figura 21 estão mostrados os espectros de RPE do 5-DSA para amostras de macrófagos não tratados e após o tratamento de 5 minutos ou 24 h. Considerando o desvio padrão da análise estatística, pode ser observado que somente a formulação F-9 apresenta

rigidez de membrana do parasita para período de incubação de apenas 5 min. A rigidez observada no macrófago tratado com F-9 é devido à rápida entrega da AmB do lipossoma contendo HSPC para os macrófagos. Para o tratamento de 24 h efeitos similares aos de 5 min foram observados. A única formulação que apresentou um aumento claro no  $2A_{//}$  foi a F-9, um efeito que pode ser atribuído à presença física da AmB haja vista que tal rigidez foi observado também em 5 min, o efeito não deve estar associado ao estresse oxidativo da membrana. Além disso, a concentração utilizada neste experimento é suficientemente alta para mostrar o efeito de presença física dos compostos. O volume de formulação de 120  $\mu\text{L}$ , em um total de 2000  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, corresponde a 6% de formulação, o que equivale a aproximadamente 42  $\mu\text{M}$  de AmB. Esta concentração de fármaco é muito alta, sendo que para 4  $\mu\text{M}$  de AmB já foi observado um efeito de redução de fluidez de membrana do parasita, devido à presença física deste fármaco na membrana (ALONSO et al, 2021).



**Figura 21 - Espectros representativos de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado na membrana plasmática de macrófagos não tratados ou tratados com 100  $\mu$ L das formulações indicadas.**

**O período de tratamento foi de 20 min ou 24 h. Análise estatística envolvendo todas as médias de cada coluna mostrou que somente a média da F-9 difere da média da amostra de controles com  $P < 0,05$ , tanto para 20 min quanto para 24 h.**

F-2: 70% PC, 30% Colesterol; F-3: 60% PC, 30% Colesterol, 10% Miltefosina; F-4: 40% PC, 30% Colesterol, 30% Miltefosina; F-5: 60% PC, 30% Colesterol, 10% Anfotericina B; F-6: 50% PC, 30% Colesterol, 10% Miltefosina, 10% Anfotericina B; F-7: 30% PC, 30% Colesterol, 30% Miltefosina, 10% Anfotericina B; F-8: Base Lipídica do AmBisome; F-9: Cópia do AmBisome.

Ao contrário do observado com as *Leishmanias amazonensis*, foi verificado que as formulações não aumentam a rigidez em macrófagos J774A.1 tratados por 24 h. Os macrófagos são bons produtores de óxido nítrico que são utilizados para reduzir infecções. Foi evidenciado que o óxido nítrico não só desempenha uma função na atividade antimicrobiana do macrófago, mas também pode limitar a migração de outros fagócitos derivados de monócitos para tecidos infectados, o que, por sua vez, impediria a proliferação do patógeno. Formaglio e colaboradores, 2021, relatam que o óxido nítrico inibe a peroxidação lipídica por um mecanismo antioxidante de quebra de cadeia. Além disso, tal óxido pode reagir rapidamente com o ânion superóxido para formar peroxinitrico. Tal reação resultaria em uma diminuição de formação de ERO, o que explicaria a não alteração no parâmetro 2A// que está relacionado com a rigidez das membranas.

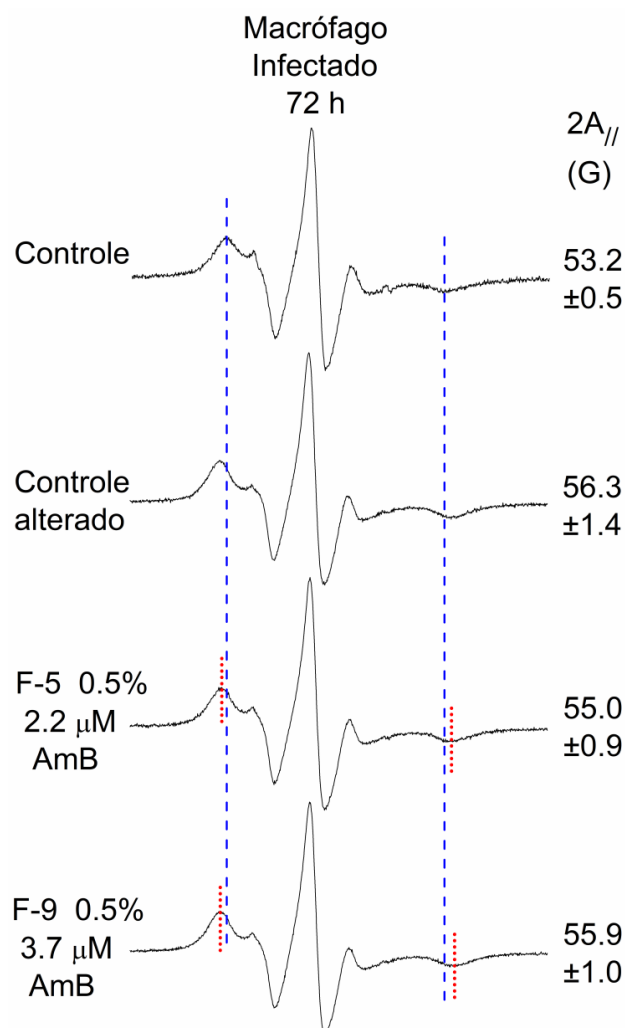
## 5.7. ESPECTROSCOPIA DE RPE EM MACRÓFAGO INFECTADO POR *LEISHMANIA*

### 5.7.1. Os lipossomas causam rigidez de membrana dos macrófagos infectados pela *Leishmania*

Para examinar se os compostos poderiam produzir mudanças na dinâmica da membrana do parasita internalizado em macrófagos, realizamos uma marcação geral de spin das membranas presentes no sistema de macrófagos infectados por *Leishmania*. No entanto, espera-se que a marcação de spin acesse apenas as membranas externas do sistema macrófago-amastigota. Isso ocorre porque o radical nitróxido presente na sonda de spin sofre redução e perde seu sinal de RPE ao entrar na célula. O nitróxido pode ser reduzido por agentes presentes no citoplasma, como ácido ascórbico,  $Fe^{2+}$  ou grupos tiol livres. Além disso, para evitar uma perda parcial do sinal, as medições de RPE são feitas com menos de 15 minutos após a marcação de spin e assim não há tempo suficiente para o marcador penetrar mais profundamente no conjunto de células.

A Figura 22 mostra espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA nas membranas dos macrófagos-amastigotas para amostras não tratadas e aquelas tratadas com 10  $\mu$ L das formulações F-5 e F-9. Este volume representa apenas 0,5% do volume total do meio de cultura e a concentração de AmB é de 2,2  $\mu$ M para a F-5 e 3,7  $\mu$ M para a F-9. O primeiro controle representa experimentos com macrófagos infectados por *Leishmania* nos quais nenhuma

mudança significativa na fluidez de membrana foi detectada nas membranas do sistema após 72 h de infecção. Para estes experimentos, o tratamento com as formulações F-5 e F-9 causou rigidez de membrana no sistema, com o  $2A_{//}$  aumentando aproximadamente 2 G. O controle 2 representa experimentos nos quais, após 72 h de infecção, uma significativa rigidez de membrana foi observada no sistema sem qualquer tratamento. Após repetições desses experimentos, notou-se que para macrófagos de boa qualidade, ou seja, quando apresentam boa adesão à placa e homogeneidade de tamanho, a alteração na fluidez da membrana geralmente não ocorre após 72 h de infecção, mas, de outra forma, a rigidez da membrana pode aparecer mesmo para períodos de incubação menores, como 24 ou 48 h.



**Figura 24 - Espectros de RPE representativos do marcador de spin 5-DSA inserido nas membranas de macrófagos J774.A1 infectados com *L. amazonensis*.**

O primeiro controle representa amostras que não sofreram alteração após 72 h da infecção. Para estes experimentos os lipossomas aumentaram significativamente o valor do  $2A_{//}$ . Para outros experimentos já ocorreu o aumento mesmo sem tratamento, como indicado no segundo controle.

Nestes experimentos, os espectros de RPE não permitem distinguir se o marcador de spin está na membrana do macrófago, da amastigota ou de ambas as células. No entanto, o fato de haver uma quantidade muito maior de membranas de macrófagos no sistema, e o indicativo de que o marcador de spin deve estar preferencialmente localizado nas membranas mais externas das células, são fatores sugerindo que os espectros devem refletir essencialmente a fluidez da membrana do macrófago. É possível que processos oxidativos na amastigota gerem produtos como o 4-HNE que poderiam alcançar as proteínas da membrana do macrófago para formar adutos de proteína-HNE (ALONSO, 2022; JOVANOVIC, 2019 e POLI, 2008) e, assim, reduzir a fluidez da membrana.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou a preparação e caracterizações físico-químicas de carreadores lipossomais contendo MTF e/ou AmB. Através da análise da espectroscopia de RPE de marcador de spin foi demonstrada a ação fluidizante da MTF nas bicamadas lipídicas dos carreadores lipossomais enquanto a AmB não tem efeito algum sobre as mesmas. Os dados de RPE também indicaram que as formulações contendo PC aumentam a dinâmica das membranas do EC facilitando a permeação, o que deve contribuir para a entrega do fármaco às células alvos. A MTF quando na concentração de 30% molar também exibe essa ação fluidizante no EC enquanto a AmB não gerou mudanças significativas de fluidez.

Os resultados de RPE mostram que tanto a MTF quanto a AmB induzem rigidez de membrana em *L. amazonensis* sob as condições experimentais semelhantes às dos ensaios antiproliferativos e em aproximadamente as mesmas concentrações de fármaco que inibem o crescimento do parasita. As formulações causaram rigidez de membrana no parasita, que foi atribuída ao estresse oxidativo gerado no interior da célula devido ao aumento na formação de ERO promovido pelos fármacos presentes nas formulações. Em experimento de RPE, com 5 minutos de tratamento não foram observadas mudanças de fluidez, mas o efeito de rigidez foi observado após 24 h de tratamento, consistente com o processo oxidativo que deve precisar de um período de tempo para exibir seus efeitos.

No entanto, a rigidez de membrana induzida pelo estresse oxidativo não foi observada no macrófago J774A.1. Em vez disso, a rigidez da membrana foi detectada no sistema de macrófagos infectados por *Leishmania*, sugerindo a ocorrência de estresse oxidativo também na membrana do macrófago. Para culturas de macrófagos que não mostraram redução na fluidez da membrana até 72 h após a infecção, o tratamento com as formulações F-5 ou F-9 desencadeou estresse oxidativo que resulta na rigidez da membrana.

Em termos dos mecanismos de ação das atividades antileishmania desses fármacos, interpreta-se que seus efeitos primários ocorrem na membrana plasmática, criando vazamento iônico que resulta na despolarização da membrana celular e, como consequência, hiperpolariza a membrana mitocondrial, promovendo assim aumento da formação de ERO que resulta na rigidez de membrana e também desencadeia outros eventos que resulta na morte do parasita.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudar a relação entre o número de partículas das formulações e a ação dessas nas *Leishmanias* e nos macrófagos.

Desenvolver um gel com as formulações preparadas nesse trabalho para tratamento tópico da leishmaniose cutânea. Esse gel poderia conter emulsificantes que facilitariam a aplicação e também a inclusão de um facilitador da permeação no estrato córneo, como o nerolidol, que além de facilitador da permeação (SCHAFER, 2023; MENDANHA, 2017 e UTSUMI, 2016) também tem atividade leishmanicida (ALONSO, 2019). Uma vez obtida a formulação, poderiam ser feitos os testes em animais com leishmaniose cutânea induzida.

## 8. REFERÊNCIAS

ALONSO, L. et al. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of nerolidol are associated with changes in plasma membrane dynamics. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1861, n. 6, p. 1049–1056, 2019.

ALONSO, L. et al. Plasma membrane rigidity effects of 4-hydroxy-2-nonenal in Leishmania, erythrocyte and macrophage. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 79, n. 105294, p. 105294, 2022.

ALONSO, A. et al. Water increases the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: Correlation with water permeability, elastic, and electrical resistance properties. **The journal of investigative dermatology**, v. 106, n. 5, p. 1058–1063, 1996.

ALONSO, A. **Estudos por RPE de um radical nítróxico em monocristal: interação com prótons e relaxação eletrônica**. [s.l.] Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2015.

ALONSO, A.; MEIRELLES, N. C.; TABAK, M. Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1237, n. 1, p. 6–15, 1995.

ALONSO, A.; QUEIROZ, C. S.; MAGALHÃES, A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1323, n. 1, p. 75–84, 1997.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared to those of miltefosine. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 183, n. 110421, p. 110421, 2019.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 151, n. 105407, p. 105407, 2020a.

ALONSO, L. et al. Analysis of the interactions of amphotericin B with the *Leishmania* plasma membrane using EPR spectroscopy. **The journal of physical chemistry. B**, v. 124, n. 45, p. 10157–10165, 2020b.

ALONSO, L. et al. Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of  $\beta$ -carboline derivatives. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1863, n. 1, p. 183473, 2021a.

ALONSO, L. et al. Comparative EPR spectroscopy analysis of amphotericin B and miltefosine interactions with *Leishmania*, erythrocyte and macrophage membranes. **European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences**, v. 163, n. 105859, p. 105859, 2021b.

ALONSO, L. et al. Antileishmanial activity of 3,4,5-trisubstituted isoxazoles by interaction with *Leishmania amazonensis* plasma membrane. **Journal of molecular structure**, v. 1249, n. 131604, p. 131604, 2022.

ALONSO, L.; DORTA, M. L.; ALONSO, A. Ivermectin and curcumin cause plasma membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* due to oxidative stress. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1864, n. 9, p. 183977, 2022.

ALONSO, L. E. et al. Estudo De Fotossensibilizadores Em Eritrócito, Estrato Córneo E Leishmânia. 2018.

ANDRA, V. V. S. N. L. et al. A comprehensive review on novel liposomal methodologies, commercial formulations, clinical trials and patents. **BioNanoScience**, v. 12, n. 1, p. 274–291, 2022.

ANDERSON, T. M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400–406, 2014.

APPELBERG, R. As células Fagocíticas. **C. Avevedo. Biologia Celular e Molecular**, [s.d.].

AARTSMA, T.; MATYSIK, J. (EDS.). **Biophysical techniques in photosynthesis: Volume II**. 2008. ed. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008.

BASRI, G. Astronomy. Big fields on small stars. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5761, p. 618–619, 2006.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmac?uticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. **Cell reports**, v. 3, n. 2, p. 350–358, 2013.

BOUZON, Z.; LAURITA BIOLOGIA CELULAR ZENILDA LAURITA BOUZON, R.; GARGIONI, L. Zenilda Laurita Biologia celular / Zenilda Laurita Bouzon, Rogério Gargioni, Luciane Ouriques. [s.d.].

BRAJTBURG, J. et al. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. **The journal of infectious diseases**, v. 149, n. 6, p. 986–997, 1984.

BRAJTBURG, J. et al. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 27, n. 2, p. 172–176, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRUSTOLON, M. G. E. **Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit**. New Jersey: [s.n.].

CAMARGOS, H. S. et al. Molecular dynamics and partitioning of Di-*tert*-butyl nitroxide in stratum corneum membranes: Effect of terpenes. **Lipids**, v. 45, n. 5, p. 419–427, 2010.

CARDOSO, E. J. S. **Estudo das interações dos surfactantes iônicos SDS, CTAC e HPS e miltefosina com membranas de leishmania, macrófagos e eritrócitos. 2023. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física.** Goiânia: [s.n.].

CHEN, L. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 149–156, 2002.

CHEN, X. et al. Photophysics and photochemistry of thermally activated delayed fluorescence emitters based on the multiple resonance effect: transient optical and electron paramagnetic resonance studies. **Chemical science (Royal Society of Chemistry: 2010)**, v. 15, n. 28, p. 10867–10881, 2024.

COÊLHO, A. G. et al. Solid Lipid Nanoparticles from *Platonia insignis* seeds, a Brazilian Amazon fruit: Characterization, in vitro and in vivo toxicological and antioxidant activities. **Journal of composites science**, v. 7, n. 9, p. 368, 2023.

COHEN-TANNOUDJI, C.; DIU, B.; LALOË, F. Q. **Quantum Mechanics.** 1977.

COX, M.; LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica 3b: Edicion.** [s.l.] Omega, 2004.

CRUVINEL, W. M. Título do Artigo. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–461, 2010.

DAMASCENO, B. P. G. L. **Sistema microemulsionado como carreador lipídico para fármacos insolúveis. 130 f. Tese de Doutorado.** [s.l.: s.n.].

DAS, M. et al. Miltefosine-unresponsive *Leishmania donovani* has a greater ability than miltefosine-responsive *L. donovani* to resist reactive oxygen species. **The FEBS journal**, v. 280, n. 19, p. 4807–4815, 2013.

DAVID, J. **Classical Electrodynamics.** New York: John Wiley, 1999.

DESOTI, V. C. et al. Trypanocidal action of (–)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. **Marine drugs**, v. 10, n. 8, p. 1631–1646, 2012.

DORLO, T. P. C. et al. Characterization and identification of suspected counterfeit miltefosine capsules. **The Analyst**, v. 137, n. 5, p. 1265, 2012.

DZIKOVSKI, B.; FREE, J. **Spin Labels in the Gel Phase and Frozen Lipid Bilayers: Do They Truly Manifest a Polarity Gradient? Nitroxides - Theory, Experiment and Applications.** 2012.

FARIA, K. **Formulação de anfotericina B em lipossomas de circulação prolongada para o tratamento da leishmaniose visceral.** [s.l.] EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

FERNANDES, K. S. **Estudo das interações da miltefosina com membranas de L. (Leishmania) amazonensis e macrófagos peritoneais**. Goiânia: [s.n.].

FERNANDES, K. S. et al. The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1859, n. 1, p. 1–9, 2017.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.

FINKELSTEIN, A.; HOLZ, R. Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. **Membranes**, v. 2, p. 377–408, 1973.

FORMAGLIO, P. et al. Nitric oxide controls proliferation of *Leishmania major* by inhibiting the recruitment of permissive host cells. **Immunity**, v. 54, n. 12, p. 2724–2739.e10, 2021.

GARCÍA-GARCÍA, V.; OLDFIELD, E.; BENAÏM, G. Inhibition of *Leishmania mexicana* Growth by the Tuberculosis Drug SQ109. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6386–6389, 2016.

GETACHEW, F.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 183, n. 1, p. 42–51, 2012.

HAGEN, W. R. **Biomolecular EPR spectroscopy**. Londres, England: CRC Press, 2020.

HUANG, W. et al. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophysical journal**, v. 83, n. 6, p. 3245–3255, 2002.

HUNTER, R. J. **Zeta potential in colloid science: principles and applications**. Academic press, 2013.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M. et al. Alterations in the Homeostasis of Phospholipids and Cholesterol by Antitumor Alkylphospholipids. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 33, p. 1–10, [s.d.].

JOVANOVIĆ, O. et al. Covalent modification of phosphatidylethanolamine by 4-hydroxy-2-nonenal increases sodium permeability across phospholipid bilayer membranes. **Free radical biology & medicine**, v. 143, p. 433–440, 2019.

KAMIŃSKI, D. M. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European biophysics journal: EBJ**, v. 43, n. 10–11, p. 453–467, 2014.

KANE, N. S. et al. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13949–13954, 2000.

KUMARI, S. et al. Amphotericin B: A drug of choice for Visceral Leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 235, n. 106661, p. 106661, 2022.

LAM, P.-L. et al. The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. **Chemico-biological interactions**, v. 320, n. 109023, p. 109023, 2020.

**Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 25 jun. 2024.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, 2005.

LIRA, R. et al. **Mecanismo de ação de análogos lisofosfolipídicos antiproliferativos contra o protozoário parasita Trypanosoma cruzi: potencialização da atividade in vitro pelo inibidor da biossíntese de esteróis cetoconazol**. [s.l: s.n.].

LITZINGER, D. C. et al. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1190, n. 1, p. 99–107, 1994.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1327–1332, 2007.

MANN, S. et al. A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Informativa Nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS**. Brasília, DF:, 2020.

MENDANHA, S. A. et al. Effects of nerolidol and limonene on stratum corneum membranes: A probe EPR and fluorescence spectroscopy study. **International journal of pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 547–554, 2017.

MENDANHA, S. A. et al. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 6, p. 473–481, 2012.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.

MOREIRA, R. A. et al. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania amazonensis* membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3021–3028, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURI, R. et al. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. **Biochemistry**, v. 47, n. 30, p. 7807–7815, 2008.

NAKAGAWA, K. Structure of stratum corneum lipid studied by electron paramagnetic resonance. In: **Textbook of Aging Skin**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 1155–1170, 2017.

NAVEED, K.-U.-R. et al. Recent progress in the electron paramagnetic resonance study of polymers. **Polymer chemistry**, v. 9, n. 24, p. 3306–3335, 2018.

NEKKANTI, V.; KALEPU, S. Recent advances in liposomal drug delivery: A review. **Pharmaceutical nanotechnology**, v. 3, n. 1, p. 35–55, 2015.

NIMTRAKUL, P.; TIYABOONCHAI, W.; LAMLERTTHON, S. Amphotericin B loaded nanostructured lipid carriers for parenteral delivery: Characterization, antifungal and in vitro toxicity assessment. **Current drug delivery**, v. 16, n. 7, p. 645–653, 2019.

OHNISHI, S.-I.; MCCONNELL, H. M. Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 87, n. 10, p. 2293–2293, 1965.

OLIVEIRA, N. F. DE. **Estudo da interação de líquidos iônicos anfifílicos com sistemas biomiméticos de membrana: uma abordagem estrutural e espectroscópica**. [s.l.] Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2021.

OLLIARO, P. L. **Treatment Options for Visceral Leishmaniasis: a Systematic Review of Clinical Studies Done in India**. [s.l.: s.n.].

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 8, p. 2397–2403, 2003.

PÉREZ-VICTORIA, J. M. et al. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2468–2474, 2001.

PERUSSI, J. R.; RUGGIERO, A. C.; TABAK, M. **O método de marcadores de spin aplicado à bioquímica**. Química Nova, p. 313–324, 1985.

POLI, G. et al. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Medicinal research reviews**, v. 28, n. 4, p. 569–631, 2008.

PONTE-SUCRE, A.; DÍAZ, E.; PADRÓN-NIEVES, M. **Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments**. [s.l.] Springer, 2013.

POOLE, C. P.; FARACH, H. A. (EDS.). **Handbook of electron spin resonance: Volume 2**. 1999. ed. New York, NY: Springer, 1999.).

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine Affects Lipid Metabolism in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1425–1430, 2007.

RAVAL, N. et al. Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. Em: **Basic Fundamentals of Drug Delivery**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 369–400.

RODRIGUES, Aline. **Governo de Goiás alerta sobre alto risco de letalidade da leishmaniose**. 2023. Disponível em: <https://www.saude.go.gov.br/noticias/19048-governo-de-goias-alerta-sobre-alto-risco-de-letalidade-da-leishmaniose> Acesso em: 11 jan. 2024.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D., et al. **Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triperpenoid from Sapindus saponaria L.** European Journal of Medicinal Chemistry, 124, 153–159. 2016.

RUTHSTEIN, S. et al. EPR studies on the organization of self-assembled spin-labeled organic monolayers adsorbed on GaAs. **Physical chemistry chemical physics: PCCP**, v. 7, n. 3, p. 524, 2005.

SAKURAI, J. J. **Modern Quantum Mechanics**. Reading, PA, USA: Benjamin-Cummings Publishing Co., Subs. of Addison Wesley Longman, 1985.

SALEEM, K. et al. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: A focus on recent advances and challenges. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 12, p. 1749, 2019

SALIKHOV, K. M.; ZAVOISKAYA, N. E. Zavoisky and the discovery of EPR. **Resonance**, v. 20, n. 11, p. 963–968, 2015.

SANG, R. et al. Liposome technologies towards colorectal cancer therapeutics. **Acta biomaterialia**, v. 127, p. 24–40, 2021.

SCHAFER, N. et al. Natural ingredients of transdermal drug delivery systems as permeation enhancers of active substances through the stratum corneum. **Molecular pharmaceutics**, v. 20, n. 7, p. 3278–3297, 2023.

SCHREIER, S. **Estudos estruturais e dinâmicos de membranas pelo método do marcador de spin**. [s.l.] Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2018.

SHAHINA, Z. et al. Rosemary essential oil and its components 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene induce ROS-dependent lethality and ROS-independent virulence inhibition in *Candida albicans*. **PLoS one**, v. 17, n. 11, p. e0277097, 2022.

SILVA, A. et al. Estudo da Eficiência de Nanocarreador de Anfotericina B Frente a *Cryptococcus Neoformans*. **Revista processos químicos**, v. 17, n. 31, p. 37–43, 2022.

SILVA-LÓPEZ, R. E. DA. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of candida albicans. **The journal of infectious diseases**, v. 154, n. 1, p. 76–83, 1986.

SPADARI, C. DE C. et al. Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 5187–5199, 2019.

SUBCZYNSKI, W. K.; WIDOMSKA, J. Spin-lattice relaxation rates of lipid spin labels as a measure of their rotational diffusion rates in lipid bilayer membranes. **Membranes**, v. 12, n. 10, p. 962, 2022.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical reviews**, v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

STONE, N. R. H. et al. Liposomal amphotericin B (AmBisome®): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. **Drugs**, v. 76, n. 4, p. 485–500, 2016.

SWARTZ, H. M.; BOLTON, J. R.; BORG, D. C. Biological Applications of Electron Spin Resonance. **Biological Applications of Electron Spin Resonance**, [s.d.].

SZCZEŚ, A. Effects of DPPC/Cholesterol liposomes on the properties of freshly precipitated calcium carbonate. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 101, p. 44–48, 2013.

TEERLINK, T.; DE KRUIJFF, B.; DEMEL, R. A. The action of pimarinic, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 599, n. 2, p. 484–492, 1980.

UTSUMI, S. et al. Effect of nerolidol and/or levulinic acid on the thermotropic behavior of lipid lamellar structures in the stratum corneum. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 64, n. 12, p. 1692–1697, 2016.

VERONICA, J. et al. Iron superoxide dismutase contributes to miltefosine resistance in *Leishmania donovani*. **The FEBS journal**, v. 286, n. 17, p. 3488–3503, 2019.

VICTORIA, H. F. V. **Ressonância paramagnética eletrônica de radicais nitróxidos e nanobastões de ouro funcionalizados com marcadores de spin**. [s.l.] UFMG, 5-Jul-2018.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 5, p. 603–618, 2004.

ZEEMAN, P. The effect of magnetisation on the nature of light emitted by a substance. **Nature**, v. 55, n. 1424, p. 347–347, 1897.

ZHONG, H.; YIN, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. **Redox biology**, v. 4, p. 193–199, 2015.