

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**

**ANTONIO MARCOS HONORATO**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA IMPREGNADO EM  
DIFERENTES TIPOS DE SÍLICAS MESOPOROSAS SOBRE *LEISHMANIA*  
(*LEISHMANIA*) *AMAZONENSIS***

**CAMPO GRANDE**

**2017**

**ANTONIO MARCOS HONORATO**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA IMPREGNADO EM  
DIFERENTES TIPOS DE SÍLICA MESOPOROSA SOBRE *LEISHMANIA*  
*(LEISHMANIA) AMAZONENSIS***

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda.

**CAMPO GRANDE**

**2017**

**ANTONIO MARCOS HONORATO**

**ATIVIDADE IN VITRO DO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA IMPREGNADO EM  
DIFERENTES TIPOS DE SÍLICA MESOPOROSA SOBRE LEISHMANIA  
(LEISHMANIA) AMAZONENSIS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Carla Cardozo Pinto de Arruda

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Cardozo Pinto de Arruda**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fatima Cepa Matos**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Silva Marques**

**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**

*Aos meus pais, pela dedicação e incentivo aos estudos.*

*A minha família pelo apoio incondicional.*

*Por vocês que dedico meu esforço e meu sucesso.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer e me guiar, permitindo que desenvolvesse esse trabalho com muita fé e satisfação.

Aos meus pais, José e Inês, que nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação, sendo sempre minha fortaleza nos momentos difíceis, sem vocês esse sonho não seria possível. É com muito amor que lhes dedico esse trabalho.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado para me apoiar nas decisões que tomei, tornando sempre minha vida mais feliz!

À professora Carla, mais que uma orientadora é um modelo para mim de amizade e profissionalismo. Seus cuidados e esforços certamente tornaram essa minha jornada mais fácil de ser concluída. **MUITO OBRIGADO!**

Às professoras Maria de Fátima, Mônica e Renata, pelo apoio, contribuição e carinho dedicado a esse trabalho e a confiança que depositaram em mim.

Ao Professor Teófilo, por confiar a mim os ensaios biológicos das amostras-teste e pela contribuição direta nesse trabalho.

A Jucelei, Elisa, Aline, Jú Stein, Duda, Alessandra, Eliane, Suellem, Wagner, Nathália, Vanessa e todos do Laboratório de Parasitologia Humana da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelas boas risadas e ajuda durante meu trabalho. Agradeço a Deus a oportunidade de tê-los em meu caminho.

A Nats e Amarith, por essa grande amizade que construímos durante esse período e por toda ajuda em minhas pesquisas. Obrigado meninas!

A minha namorada Karen, pelo apoio, paciência e amor que sempre me dedicou e me fez forte para superar todos os obstáculos.

Aos amigos do ponto verde. Amizade sincera, verdadeira e de longa data. Obrigado por tornar minha vida mais feliz galera!

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia e FUNDECT, pela oportunidade de concluir essa etapa em minha vida profissional.

*“(...) Ainda que eu tivesse o dom da profecia,  
o conhecimento de todos os mistérios e de toda ciência;  
ainda que eu tivesse toda a fé,  
a ponto de transportar montanhas,  
se não tivesse amor,  
eu nada seria.”*

*(Coríntios 13,2. Bíblia Sagrada)*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Ciclo biológico de *Leishmania* sp.
- Figura 2: Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar.
- Figura 3: Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.
- Figura 4: Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina.
- Figura 5: Esquema do mecanismo de obtenção da sílica mesoporosa.
- Figura 1 (manuscrito): Perfil de dissolução em meio RPMI 1640 das matrizes de sílica mesoporosa contendo antimoniato de meglumina com tempo de ensaio até 24 e 120 horas.
- Figura 2 (manuscrito): Fotomicrografias de macrófagos peritoneais infectados e tratados *in vitro* com 12,5 µg/mL de antimoniato de meglumina associado à sílicas mesoporosas (A) MCM-41 Sb, (B) SBA-16 Sb, (C) MSU-3 Sb, (D) MSU-4 Sb.
- Figura 3 (manuscrito): Liberação de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* após o tratamento com os sistemas de sílicas mesoporosas impregnadas ou não com antimoniato de meglumina (MCM-41, SBA-16, MSU-3 e MSU-4) e com as drogas de referência (anfotericina B, pentamidina e antimoniato de meglumina).

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
ANOVA	Análise de Variância
BdB	Broekhoff e Boer
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
CI	Concentração Inibitória
Dp	Diametro de poro
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Grama
ICP-OES	Espectrômetro de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente
IS	Índice de Seletividade
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LM	Leishmanise Mucosa
LTA	Leishmanise Tegumentar Americana
MCM-41	<i>Mobil Composition of Matter 41</i>
MSU-3	<i>Michigan State University 3</i>
MSU-4	<i>Michigan State University 4</i>
ng	Nanograma
NO	Óxido Nítrico
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SA	Área Superficial
Sb	Antimônio
SBA-16	<i>Santa Barbara Amorphous 16</i>
Vp	Volume de poro

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1.1. Leishmanioses .....	3
1.1.1. Agente etiológico e ciclo de vida.....	3
1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	5
1.2.1. Manifestações clínicas da LTA.....	7
1.2.2. Diagnóstico da LTA .....	9
1.2.3. Tratamento.....	10
1.3. Antimoniato de meglumina .....	11
1.4. Drogas de segunda escolha.....	12
1.4.1 Anfotericina B.....	12
1.4.2. Pentamidina .....	13
1.4.3. Outros fármacos.....	13
1.5. Sílicas Mesoporosas .....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	18
1. Introdução.....	28
2. Resultados e Discussão .....	29
3. Materiais e Métodos .....	35
4. Conclusão .....	38
Abreviações.....	38
Referências.....	39





## RESUMO

Quatro sílicas mesoporosas foram sintetizadas e impregnadas com antimoniato de meglumina para otimização da liberação do fármaco e avaliação da atividade antileishmania. MCM-41, SBA-16, MSU-3 e MSU-4 foram caracterizadas por isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77K, difração de Raio-X e microscopia eletrônica de varredura, e avaliadas quanto ao perfil de dissolução do antimoniato de meglumina em meio RPMI 1640, observando-se diferenças quanto ao tamanho, volume e espessura da parede dos poros, com estruturas internas distintas e tamanhos morfológicos variáveis. A atividade foi avaliada sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a citotoxicidade sobre fibroblastos NIH/3T3, para avaliação da seletividade. As matrizes mesoporosas impregnadas com antimoniato de meglumina não apresentaram atividade sobre as formas promastigotas ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). Entretanto, todas foram ativas contra as formas amastigotas intracelulares ( $CI_{50}$  variando entre 2,05 e 11,00  $\mu\text{g/mL}$ ), chegando a uma atividade até dez vezes maior do que a droga livre, que se mostrou moderadamente ativa ( $CI_{50} = 21,54 \mu\text{g/mL}$ ). O sistema MSU-3 Sb foi o que apresentou a melhor atividade antileishmania, provavelmente devido às características estruturais e morfológicas ( $SA = 749,61 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $D_p = 8,54 \text{ nm}$ ,  $V_p = 0,95 \text{ cm}^3/\text{g}$ , Bastão – 2D hexagonal). As sílicas não impregnadas foram, em sua maioria, moderadamente ativas ( $CI_{50} = 22,14- 46,69 \mu\text{g/mL}$ ). As sílicas mesoporosas não tiveram efeito citotóxico sobre as linhagens de células normais testadas, com índices de seletividade expressivos. Todas as sílicas impregnadas induziram aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelas células peritoneais infectadas e tratadas na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , exceto MSU-4 Sb. As sílicas não impregnadas também induziram aumento na produção de NO nas massas equivalentes à liberação de 50  $\mu\text{g/mL}$ , o que sugere a participação do NO como mecanismo leishmanicida. Os resultados demonstram a otimização do efeito do antimoniato de meglumina quando impregnado às matrizes mesoporosas testadas, sugerindo a progressão para avaliação de resposta terapêutica *in vivo*, bem como o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos para o tratamento das leishmanioses, em especial a LTA.

**Palavras-chave:** nanomateriais; *Leishmania amazonensis*; leishmanioses; sistemas de liberação; citotoxicidade.

## ABSTRACT

Four mesoporous silica were synthesized and impregnated with meglumine antimoniate for optimization of drug release and evaluation of the antileishmanial activity. MCM-41, SBA-16, MSU-3, and MSU-4 silicas were characterized by isotherms of Nitrogen adsorption and desorption at 77K, X-ray diffraction and scanning electron microscopy, showing differences concerning size, volume and pore wall thickness, with different internal structures and variable morphological sizes. After meglumine antimoniate (Sb) impregnation, the dissolution profile of Sb in RPMI 1640 medium was determined. Antileishmanial activity was evaluated on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and intracellular amastigotes. Cytotoxicity was evaluated on murine fibroblast cell line NIH/3T3 to determine the selectivity index (SI). Mesoporous matrices impregnated with meglumine antimoniate were not active on promastigote forms ( $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). However, all of them were active against intracellular amastigotes ( $IC_{50}$  values ranging from 2.05 to 11.00  $\mu\text{g/mL}$ ), up to 10 times more active than the free drug, which was moderately active ( $IC_{50} = 21.54 \mu\text{g/mL}$ ). MSU-3 Sb system showed the best antileishmanial activity, probably due to their structural and morphological characteristics ( $SA = 749.61 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $Pd = 8.54 \text{ nm}$ ,  $Pv = 0.95 \text{ cm}^3/\text{g}$ , Stick – 2D hexagonal). Non-impregnated silicas were moderately active ( $IC_{50} = 22,14 - 46,69 \mu\text{g/mL}$ ). None of the systems had cytotoxic effect on the normal cell line tested, showing expressive SI. Impregnated silicas induced an increase of nitric oxide (NO) production by infected cells at the concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  (excepting MSU-4 Sb), which was also observed for non-impregnated silicas. Results demonstrate the optimization of the effect of meglumine antimoniate when associated to the mesoporous matrices, suggesting the progression for *in vivo* tests in order to evaluate the therapeutic response.

**Keywords:** nanomaterials; *Leishmania amazonensis*; leishmaniases; delivery systems; cytotoxicity.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças infectoparasitárias vetoriais causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A principal forma de transmissão destes parasitos é a picada da fêmea do hospedeiro invertebrado, o inseto flebotomíneo pertencente à Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, Gênero *Lutzomyia* (Basano & Camargo 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estas parasitoses são endêmicas em 98 países, sendo que em apenas 30 ocorre sua notificação compulsória. São responsáveis por alto índice de mortalidade, com números girando entre 20.000 e 30.000 mortes anualmente (Alvar et al. 2012, WHO 2014). Entretanto, sabe-se que esses números podem ser ainda maiores devido às subnotificações, principalmente em países com pouco investimento em saúde e levantamentos epidemiológicos (Alvar et al. 2012), bem como dificuldades no diagnóstico e tratamento da doença (Desjeux 2004).

Com características clínicas e epidemiológicas individualizadas e propriedades inerentes à sua patologia, as leishmanioses são distribuídas em duas entidades nosológicas principais: as formas visceral e cutânea (Altamiro-Enciso 2003). Isso se dá devido à grande variedade de espécies envolvidas, bem como às respostas no organismo parasitado, em nível imunológico e histopatológico (Silveira 2004). Esse amplo espectro clínico indica a complexidade da doença, tendo como catalizador não só a grande diversidade de espécies causadoras, mas também o alto número de reservatórios e espécies vetoras (Reithinger et al. 2007).

#### 1.1.1. Agente etiológico e ciclo de vida

*Leishmania* spp. são protozoários digenéticos pertencentes à Ordem Kinetoplastida – caracterizada por apresentar uma organela única (cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o

kDNA (Simpson 2006) - e à Família Trypanosomatidae. Em seu ciclo de vida, apresentam duas formas evolutivas: as formas promastigota, extracelular, e amastigota, intracelular. A forma promastigota é fusiforme e possui flagelo livre; parasita hospedeiros invertebrados, tendo como hábitat o tubo digestivo do inseto vetor. Já a forma amastigota é imóvel, levemente ovoide e sem flagelo livre; parasita hospedeiros vertebrados, tendo como hábitat as células do sistema fagocitário mononuclear (Brasil 2010, Harhay et al. 2011, WHO 2014).

*Leishmania* spp. apresentam ciclo de vida heteroxênico (Figura 1). A reprodução se dá através de divisão binária simples, onde o núcleo se divide por endomitose e o cinetoplasto divide-se anteriormente aos demais processos, originando um novo flagelo (Coura 2005).

A transmissão se dá pela picada da fêmea do inseto flebotomíneo infectado. Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o flebotomíneo ingere a forma amastigota juntamente com o sangue. Em aproximadamente 12 horas, essas formas se diferenciam em promastigotas procíclicas. Cinco dias depois, originam-se as formas metacíclicas no intestino posterior (subgênero *Viannia*) e anterior (subgênero *Leishmania*) do inseto; estas são as formas infectantes em um novo repasto sanguíneo (Bates & Rogers 2004).

No ato da picada, o flebotomíneo dilacera a pele do hospedeiro vertebrado com suas mandíbulas e simultaneamente succiona o sangue e deposita as promastigotas metacíclicas, que serão fagocitadas pelo sistema mononuclear fagocitário. Dentro do macrófago, as promastigotas sofrem mudanças bioquímicas e metabólicas, originando a forma intracelular obrigatória amastigota (Handman & Bullen 2002). Essa forma inicia um processo de divisão binária nos fagossomos dos macrófagos, acumulando-se e provocando o rompimento da célula, com subsequente liberação dessas formas, que serão novamente fagocitadas, desencadeando uma resposta inflamatória e disseminando o parasita no organismo (Basano & Camargo 2004, Maia et al. 2007).

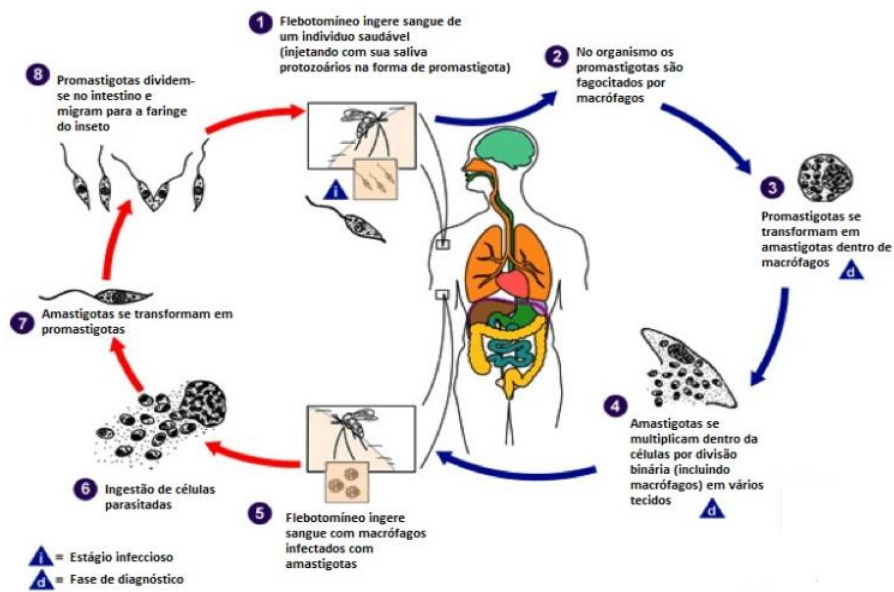


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

## 1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Estima-se que ocorram 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose anualmente, dos quais 300.000 são da forma visceral e um milhão da forma cutânea da doença (WHO 2010). Os países que apresentam predominantemente a forma cutânea (Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru) são caracterizados como em desenvolvimento ou emergentes, onde tal enfermidade assume aspecto de doença negligenciada (Figura 2) (WHO 2014).

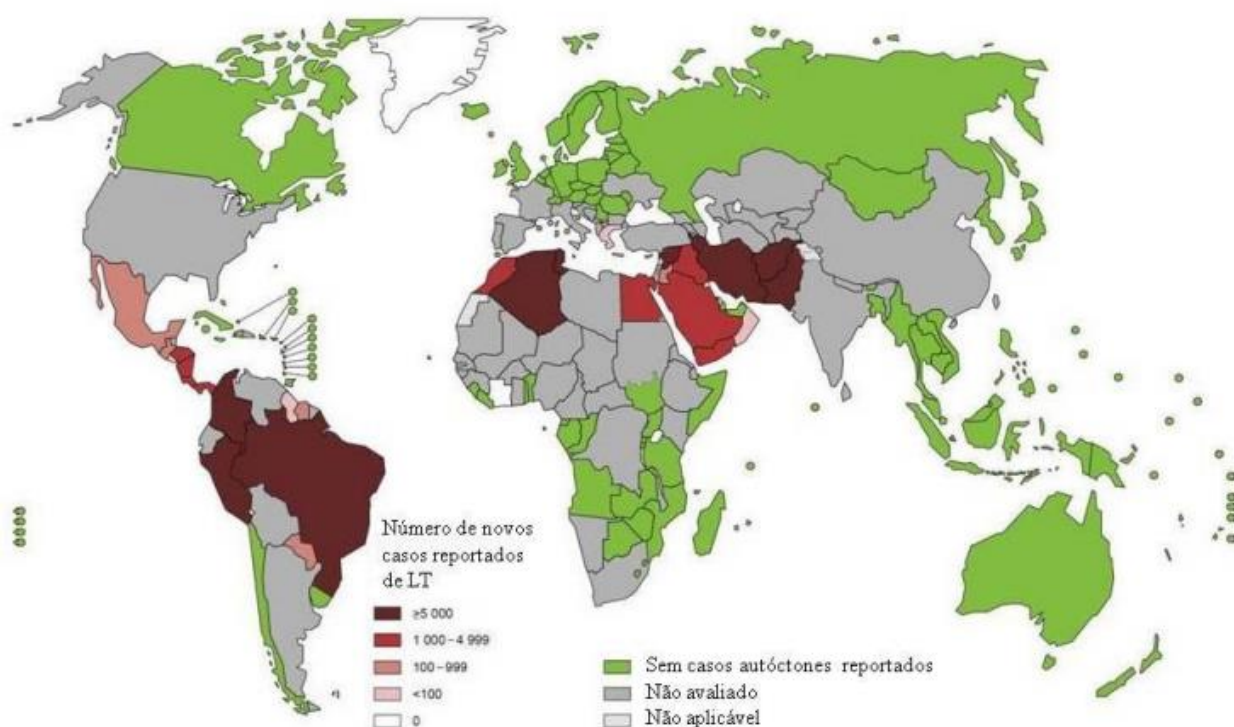


Figura 2. Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar em 2012.

Fonte: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_CL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png)

No continente americano, a forma cutânea é caracterizada como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), onde ocasiona uma média de 56 mil casos anualmente (WHO, 2017, Alvar et al. 2012). Estes estão amplamente distribuídos, não sendo detectados apenas no Uruguai e no Chile (Skraba et al. 2014). Os principais países onde há registro de casos na América Latina são o Brasil (26.008 casos/ano), a Colômbia (17.420 casos/ano) e o Peru (6.405 casos/ano) (Alvar et al. 2012).

No Brasil, a LTA é autóctone em todos os estados brasileiros (Brasil 2010). Entre o período de 2001 a 2015, foram registrados 351.693 casos de LTA, sendo 55.192 na região Centro-Oeste (Brasil 2016).

Em Mato Grosso do Sul (MS), um número crescente de casos de LTA vem sendo evidenciado. Anteriormente presente apenas no meio rural, hoje se observa um aumento de casos na área urbana e periurbana, principalmente junto às classes menos favorecidas. Isto pode ser um reflexo do aumento populacional dos vetores devido às mudanças climáticas, à falta de

saneamento básico e à migração de indivíduos não imunes para regiões endêmicas (Basano & Camargo 2004, Desjeux 2004, Lindoso & Lindoso 2009, Maia et al. 2007). Entre 2006 e 2015, foram confirmados 1.145 casos de LTA em MS, com maior prevalência nos municípios de Campo Grande e Pedro Gomes (Brasil 2016).

Apesar da menor letalidade comparada à forma visceral, a LTA também constitui um grave problema de saúde pública, com reflexos nos parâmetros sociais e econômicos, haja vista que os reflexos físicos da doença afetam diretamente o perfil psicológico dos pacientes, muitas vezes impossibilitando-os de se integrarem à sociedade e desempenharem suas funções trabalhistas (Gontijo & Carvalho 2003) e onerando, assim, o Estado (Brasil 2010).

### 1.2.1. Manifestações clínicas da LTA

O estado imunológico do indivíduo, assim como a espécie envolvida, são fatores relevantes para as manifestações clínicas da LTA. No Brasil, as espécies mais relevantes em termos de saúde pública são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Figura 3).

*L. (L.) amazonensis* ocorre em todas as regiões do país. O parasito é comum em roedores silvestres, como os gêneros *Proechymis* e *Oryzomys*, acometendo o homem e seus animais domésticos de maneira secundária. A transmissão ocorre por espécies de flebotomíneos como *Bichromomyia flaviscutellata*, *B. reducta* e *B. olmeca* (Galati 2016), pouco antropofílicas (Brasil 2010, Basano & Camargo 2004). Em MS, a primeira evidência da ocorrência de LTA associada à infecção por *L. amazonensis* foi relatada no município de Bela Vista (Dorval et al. 2006).

A LTA pode ser classificada de acordo com as manifestações clínicas em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose difusa (LCD) (Reithinger et al. 2007, Brasil 2010).

LC é caracterizada por lesões na pele, com formação de úlceras únicas ou múltiplas restritas à derme, iniciadas no ponto de inoculação das promastigotas infectantes. A lesão primária tem período de incubação variável, de 10 dias a três meses, e resulta em úlcera

leishmaniótica típica, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo; com a evolução, é frequente a ulceração com bordas elevadas e fundas com granulação grosseira, configurando borda em moldura (Gontijo & Carvalho 2003). Tem como agentes etiológicos *L. braziliensis*, responsável pela forma cutânea mais destrutiva entre as espécies, *L. guyanensis*, que provoca úlceras típicas conhecidas como “cratera de lua”, rapidamente disseminadas pelo corpo, e *L. amazonensis*, que causa em geral ulcerações simples e limitadas (Michalick 2005).

LM tem como agente etiológico principal *L. braziliensis*. Ocorre após lesão cutânea não tratada, capaz de originar metástase preferencialmente nas regiões do septo nasal e da orofaringe. Provoca muitas vezes a destruição do septo, resultando em mudanças anatômicas, o que caracteriza o quadro de “nariz de anta” desencadeado pela resposta inflamatória do sistema imunológico do indivíduo (Lessa et al. 2007).

LCD está diretamente ligada à condição imunológica do indivíduo, com resposta imune deprimida frente aos antígenos de *Leishmania* e pouca resposta terapêutica. Tem como agentes etiológicos *L. pifanoi*, principalmente na Venezuela, e *L. amazonensis*, no Brasil. A LCD não deve ser confundida com a LC disseminada, pois esta ocorre em indivíduos capazes de montar uma resposta imune celular contra *Leishmania* e apresenta boa resposta à terapêutica (Reithinger et al. 2007). Considerando que a LCD é uma forma clínica rara e grave, com difícil resposta terapêutica e cura clínica, o tratamento deve ser realizado nos Centros de Referência. O medicamento de primeira escolha para esses casos é o isetionato de pentamidina na dose de 4 mg/kg/dia, em dias alternados, por dez doses. Para o tratamento com antimoniato de meglumina, a dose recomendada é 20 mg Sb<sup>5+</sup>/ kg/dia, durante 30 dias seguidos. Inicialmente, pode haver uma resposta ao antimonial, porém são frequentes as recidivas (Brasil 2017).

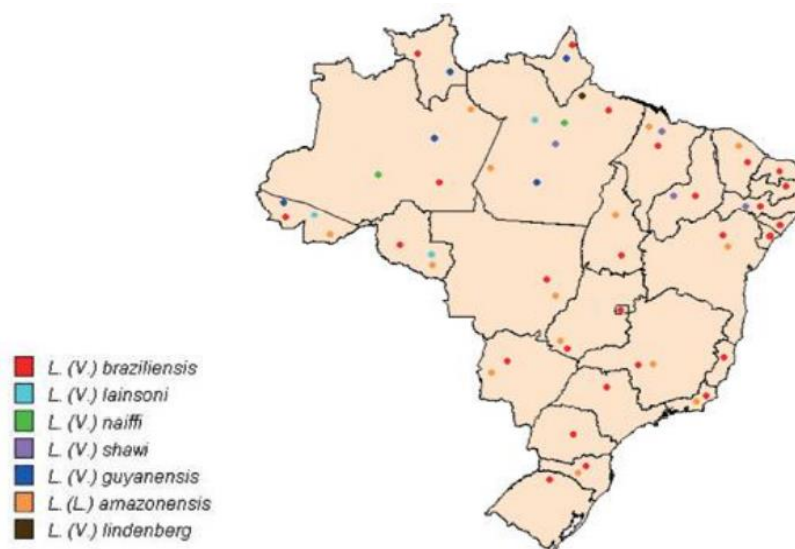


Figura 3. Distribuição das espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. Fonte: SVS/MS (2017).

### 1.2.2. Diagnóstico da LTA

O diagnóstico laboratorial é o mais indicado para a obtenção de resultados comprobatórios. Ele se dá através de exames diretos de esfregaços corados por Giemsa ou Leishman, obtidos de biopsia do tecido ou curetagem dos bordos da lesão para detecção do parasito em sua forma amastigota (Brasil 2006). A sensibilidade deste teste é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão (Cuba-Cuba et al. 1985); a especificidade é de 100% e sensibilidade varia entre 64- 80%, a depender da qualidade técnica (Masmoudí et al. 2013).

Para a pesquisa parasitológica indireta, pode ser realizado o cultivo do parasito *in vitro* ou *in vivo*. O meio mais empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle (NNN) e suas modificações. A sensibilidade do método é alta para *L. amazonensis* (Basano & Camargo 2004).

Outros métodos como exames histopatológicos (anticorpos marcados com imunoperoxidase e coloração pela hematoxilina-eosina), sorologia (imunofluorescência, ELISA e aglutinação direta) e PCR (reação da polimerase em cadeia) também podem ser aplicados. Dentre os imunológicos, destaca-se a Intradermorreação de Montenegro, cuja

sensibilidade varia de 82 a 100% e consiste na aplicação intradérmica do antígeno, esperando-se uma reação inflamatória. Entretanto, a falta de reagentes e a não qualificação profissional na rede pública de saúde dificulta a rotina desse método (Michalick 2005).

### 1.2.3. Tratamento

O Tártaro Emético foi o primeiro medicamento utilizado para o tratamento de LTA. Sua aplicação se deu no ano de 1912 por Gaspar Vianna, entretanto a alta toxicidade e seus efeitos colaterais fizeram com que esse medicamento fosse gradativamente substituído por formas mais efetivas (D'utra e Silva 1915, Rezende 2009). Em 1937, surgiu o Estibogluconato de Sódio (Pentostan®), utilizado atualmente em países de língua inglesa, apresentando vantagens como diminuição dos efeitos colaterais e diminuição da toxicidade (Soares-Bezerra et al. 2004). Em 1945, surgiu no mercado o antimônio pentavalente até hoje utilizado como medicamento de primeira escolha para o tratamento de LTA no Brasil, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (Croft & Coombs 2003, Rath 2003, Murray 2001, Wolday et al. 2001).

O esquema terapêutico do antimoniato de meglumina no Brasil para o tratamento de LTA segue os parâmetros estabelecidos pela OMS e pelo Ministério da Saúde quanto à dose, ao tempo de tratamento e à forma clínica (Tabela 1) (Brasil 2010).

Tabela 1. Esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA, segundo a OMS e o Ministério da Saúde.

<b>Forma clínica</b>	<b>Dose</b>	<b>Tempo de duração mínimo</b>
Leishmaniose Cutânea	10-20mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia (Recomenda-se 15mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia)	20 dias
Leishmaniose Difusa	20mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia	20 dias
Leishmaniose Mucosa	20mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia	30 dias

Fonte: BRASIL 2010.

A administração da droga é realizada pela via parenteral, podendo ser intramuscular, endovenosa ou intralesional. A escolha da via depende das condições do paciente, sem interferência da eficácia e segurança. A via intralesional se torna mais viável em lesões únicas, além de reduzir os efeitos adversos (Brasil 2010).

A anfotericina B de formulação clássica, a anfotericina B lipossomal e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) são fármacos de segunda escolha no Brasil, aplicados quando se tem a impossibilidade ou resistência ao tratamento com o antimoniato de meglumina (Brasil 2010).

### 1.3. Antimoniato de meglumina

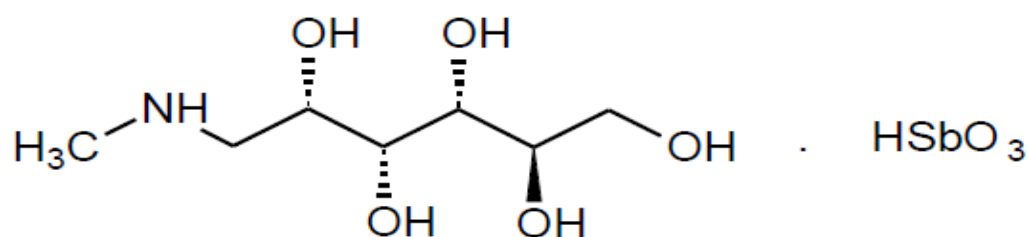


Figura 4. Fórmula estrutural do antimoniato de meglumina. Fórmula molecular:  $C_7H_{17}NO_5 \cdot HSbO_3$ . Massa molecular: 365,98. Fonte: Farmacopeia Brasileira 2010.

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), o antimoniato de meglumina se enquadra na categoria III: a dos fármacos com alta solubilidade em água, mas baixa permeabilidade entre as membranas (Frézard et al. 2008), propriedades que dificultam a disponibilidade do tratamento oral, além da capacidade de polimerização em elevadas concentrações (Fernandes et al. 2013, Frézard et al. 2008).

A administração endovenosa ou intramuscular tem excreção prioritariamente por via renal (cerca de 80%), de forma inalterada. A eliminação se dá de forma lenta, com uma meia-vida de 76 horas. Esta eliminação mais lenta resulta, ao longo dos dias de tratamento, em efeitos tóxicos, sobrecarregando principalmente o sistema cardiovascular (Tobias 2009).

O mecanismo de ação dessa droga não é totalmente esclarecido, porém acredita-se que o antimoniato de meglumina aja como pró-droga, necessitando de conversão intramacrofágica de  $\text{Sb}^{(V)}$  em  $\text{Sb}^{(III)}$ . O  $\text{Sb}^{(III)}$ , forma ativa e tóxica do antimônio, promove a perda de função de determinadas proteínas no meio biológico (Demicheli & Frézard 2005). Outra hipótese indica que o  $\text{Sb}^{(V)}$  poderia interagir com biomoléculas de adenina e guanina presentes nos fagolisossomas, locais onde o parasita reside e se multiplica (Kato 2008).

## 1.4. Drogas de segunda escolha

### 1.4.1 Anfotericina B

A anfotericina B pertence ao grupo dos polienos, classe macrolídeos e liga-se ao esterol das membranas celulares interferindo nas funções de permeabilidade e transporte. Formam-se poros na membrana (poro aquoso), onde o centro hidrofílico da molécula cria um canal iônico transmembrana. A interação hidrofóbica entre o esterol e a região insaturada do polieno, com possível formação de ponte de hidrogênio entre a hidroxila ( $3\beta$ ) do esterol e o grupo carbonila (C17) do anel poliênico é o mecanismo mais aceito para explicar a ação dos polienos (Croft & Coombs 2003, Sundar & Chatterjee 2006). Possui atividade antifúngica e alto potencial leishmanicida, atuando nas formas promastigotas *in vitro e in vivo* e nas amastigotas *in vivo* (Ouellette et al. 2004, Sundar et al. 1998).

Clinicamente é recomendada apenas para gestantes ou em casos graves, não responsivos ao tratamento convencional. Apesar de apresentar alta taxa de cura, a alta toxicidade desse fármaco é um limitador de sua utilização em larga escala (Soares-Bezerra et al. 2004).

A anfotericina incorporada em lipossomos é menos tóxica e o tratamento é feito em menor período de tempo, proporcionando elevados níveis plasmáticos, porém com meia-vida mais curta, pois a droga é rapidamente fagocitada por macrófagos. Sua baixa absorção renal favorece a diminuição da toxicidade e de seus efeitos colaterais. Contudo, o alto custo desse

fármaco é um entrave para utilização desse medicamento na rede pública de saúde (Soares-Bezerra et al. 2004, Brasil 2010).

#### 1.4.2. Pentamidina

Indicada para o tratamento de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, a pentamidina se apresenta como uma opção para o tratamento de leishmanioses quando não se demonstra resposta satisfatória no tratamento com antimoniais (Singh & Sivakumar 2004). Soto-Mansipe e colaboradores (1993) demonstraram que a pentamidina, quando administrada em sete doses alternadas de 2 mg/Kg/dia, apresentou uma taxa de cura de 96%.

Acredita-se que seu mecanismo de ação seja a interferência na síntese de DNA, alterando o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial, alterando o metabolismo da glicose, o que pode desencadear o aparecimento do diabetes *mellitus* (Bhattacharya e colaboradores 2006, Jha 2006).

#### 1.4.3. Outros fármacos

Em diferentes fases de testes clínicos, drogas como miltefosine, paromomicina, azitromicina, azóis, alopurinol e tamoxifeno vem sendo aplicadas para o tratamento de leishmanioses como opção de escolha para uma intervenção medicamentosa (Sundar & Chatterjee 2006, Croft et al. 2006).

Além da descoberta de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses, a modificação do sistema de liberação de fármacos parece ser um promissor mecanismo para a otimização terapêutica e redução de efeitos colaterais. Sistemas carreadores de fármacos como lipídios (lipossomas), surfactantes (emulsões e niossomas), polímeros (nanoesferas) e outros constituintes (complexos de inclusão com ciclodextrinas e nanosuspensão) já foram testados para o tratamento de leishmanioses (Pham et al. 2013).

Pham e colaboradores (2013) indicaram que um sistema de liberação de fármacos em escala submicrométrica, como as nanopartículas, é adequado para o tratamento das leishmanioses, uma vez que estas podem ser englobadas por células fagocitárias.

Demicheli e colaboradores (2004) verificaram o aumento da concentração plasmática do antimoniato de meglumina quando complexado a  $\beta$ -ciclodextrinas em relação à forma isolada do fármaco.

As nanoestruturas sílicas vêm sendo cada vez mais empregadas em diversos ramos da tecnologia farmacêutica como catálise, adsorção de metais, separação de reagentes, biomarcadores e liberação de fármacos (Ballem et al. 2010).

### 1.5. Sílicas Mesoporosas

Descobertos em 1992 por pesquisadores da *Mobil Research and Development Corporation*, sílicas mesoporosas vem apresentando diversas aplicações tecnológicas, despertando grande interesse dos pesquisadores (Ciesla & Schuth 2009, Martines et al. 2009). O diâmetro médio de poros desse material, maior que 2 nm, inaugurou a classificação de mesoporos na IUPAC (Sing 1985). Assim, um material é denominado mesoporoso quando apresenta poros com diâmetros entre 2 nm e 50 nm.

Para a obtenção das sílicas mesoporosas, é necessário a utilização de surfactantes, agentes direcionadores de estrutura, devido às suas diferentes características químicas. Quando em solução, essas organizam-se em micelas, cuja forma espacial geométrica está relacionada ao equilíbrio hidrófilo-lipófilo, pH, temperatura e carga da molécula (Martines et al. 2004). Após a formação dessas micelas, são adicionados reagentes que promovem a hidrólise e a condensação de precursores inorgânicos, produzindo assim a sílica mesoestruturada. Outra hipótese é que essa reação aconteça concomitantemente entre o surfactante e o precursor de silício para a formação da sílica. A extração do molde pode ser realizada por tratamento térmico (calcinação) ou lavagem em Soxhlet, resultando na sílica mesoporosa (Fotoohi & Mercier 2015, Grudzien et al. 2006, Hoffmann et al. 2006). Na Figura 5 está esquematizado o processo de obtenção da sílica MCM-41.



Trendafilova et al. (2016) avaliaram a liberação da mesalazina em sílica SBA-16 funcionalizada e revestida com Eudragit S 100 e Eudragit RL 100, onde o sistema revestimento mostrou-se aplicável para a modulação do fármaco em pH próximo à neutralidade.

Oliveira et al. (2016) demonstraram nanopartículas de sílica mesoporosa como potenciais adjuvantes da vacina contra *Schistosoma mansoni*. Quando carregados pela sílica mesoporosa, os antígenos solúveis de *Schistosoma* (SWAP) apresentaram maior desempenho de imunização em comparação com sistema de imunização por sal de alumínio associado a SWAP. Esse aumento no desempenho pode estar relacionado a características do sistema como alta área de superfície, morfologia esférica, volume dos poros, estabilidade, biocompatibilidade, indução de fagocitose, além de não apresentar efeitos tóxicos.

Não foram encontrados na literatura, até o momento, relatos da associação do antimoniato de meglumina à sílica mesoporosa. Tal sistema poderia vir a otimizar a liberação do fármaco, tornando-o mais efetivo e reduzindo seus efeitos colaterais, como demonstrado nas aplicações de outras drogas utilizando nanoestruturas de sílica mesoporosa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Investigar a atividade antileishmania do antimoniato de meglumina associado a diferentes matrizes de sílica mesoporosa.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* do antimoniato de meglumina impregnado nas diferentes matrizes de sílica sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar a atividade antileishmania *in vitro* do antimoniato de meglumina impregnado nas diferentes matrizes de sílica sobre formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos sistemas de impregnação sobre linhagem celular de fibroblastos murinos NIH/3T3;
- Avaliar a liberação de óxido nítrico de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e tratados *in vitro* com os sistemas de impregnação, como possível mecanismo de ação leishmanicida.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altamiro-Enciso AJ, Morzochi MCA, Moreiria JS, Schubach AO, Marzochi KBF. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós colombianas. **Hist. ciênc. Saúde-Manguinhos**. 2003, 10(3): 853-82.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Janiin J, Den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**. 2012, 7(5), e35671.

Ballem MA, Cordoba JM, Odén M. Influence of synthesis temperature on morphology of SBA-16 mesoporous materials with a three-dimensional pore system. **Microporous Mesoporous Mater**. 2010, 129: 106-111.

Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol**. 2004, 7, 328-337.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med**. 2004, 4: 601-609.

Bhattacharya SK, Sur D, Karbwang J. Childhood visceral leishmaniasis. **Indian. J. Med. Res**. 2006, 123(3): 353-356.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**.

Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

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

Charnay C, Begu S, Tourné-Péteilh L, Nicole L, Lerner DA, Devoisselle JM. Inclusion of Ibuprofen in Mesoporous Templated Silica: Drug Loading and Release Property. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 2004, 57(3): 533–540.

Ciesla U, schuth F. Ordered mesoporous materials. **Microporous Mesoporous Mater.** 2009, 27: 131–149.

Coura JR. Dinâmica das Doenças infecciosas e Parasitárias. ed. **Guanabara**, vol I, 2005.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**2003, 19(11): 502-508.

Cuba-Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, McMahon Pratt D, Butcher J, Barreto AC, Marsden PD. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1985, 79: 500-507.

D'utra e Silva O. Sobre a Leishmaniose Tegumentar e seu tratamento. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1915, 7: 213-248.

Demicheli C, Ochoa R, Silva JBB, Falcão CAB, Rossi-Bergmann B, Melo AL, Sinisterra RD, Frézard F. Oral delivery of meglumine antimoniate- $\beta$ -cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. **Antimicrob. Ag. Chemother.** 2004, 48: 100-103.

Demicheli C, Frézard FGG. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. **Cader. Temát. Quím. Nov. Esc.** 2005, 6: 24-30.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 2004, 27, 305–318.

Dorval MEMC, Oshiro ET, Cupollito E, Castro ACC, Alves TP. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2006, 39(1): 43-46.

Fagundes LB, Sousa TGF, Sousa A, Silva VV, Sousa EMB. SBA-15-collagen Hybrid Material for Drug Delivery Applications. **J. Non. Cryst. Solids.** 2006, 352(32-35): 3496–3501.

Farmacopeia brasileira. 5 ed., vol 2. Brasília: **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2010, 808 pp.

Feliczak-Guzik A, Jadach B, Piotrowska H, Murias M, Lulek J, Nowak I. Synthesis and characterization of SBA-16 type mesoporous materials containing amine groups. **Microporous Mesoporous Mater.** 2016, 220: 231- 238.

Fernandes FR, Ferreira FR, Campos MA, Ramos GS, Kato KC, Almeida GG, Corrêa Junior JDC, Melo MN, Demicheli C, Frézard F. Amphiphilic Antimony(V) Complexes for Oral

Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2013, 57(9): 4229-4236.

Fotoohi B, Mercier L. Some considerations regarding the mesopore structure and order in MSU-3 and MSU-F (organo) sílicas. **Microporous Mesoporous Mater.** 2015, 211: 38-48.

Frézard F. Enhanced oral delivery of antimony from meglumine antimoniate/ $\beta$ -cyclodextrin nanoassemblies. **Int. J. Pharm.** 2008, 347: 102-108.

Galati EAB. **Apostila Bioecologia e identificação de phlebotominae – Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos.** São Paulo, 2016.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** 2003, 36(1): 71-80.

Grudzien RM, Grabicka BE, Jaroniec M. Effective method for removal of polymeric template from SBA-16 silica combining extraction and temperaturecontrolled calcination. **J. Mater. Chem.** 2006, 16: 819-823.

Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.** 2002, 18(8): 332-342.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.** 2011, 27(9): 403-409.

Hoffmann F, Cornelius M, Morell J, Froba M. Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials. **Angew. Chem. Int.** 2006, 45: 3216-3251.

Hu Y, Zhi Z, Zhao Q, Wu C, Zhao P, Jiang H, Jiang T, Wang S. 3D cubic mesoporous sílica microsphere as a carrier for poorly soluble drug carvedilol. **Microporous Mesoporous Mater.** 2012, 147: 94-101.

Jha TK. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. **Indian J. Med. Res.** 2006, 123(3): 389-398.

Kato KC. Avaliação da toxicidade do antimoniato de meglumina. Ouro Preto: **Universidade Federal de Ouro Preto**, 2008, 101.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** 2007, 73(6): 843-7.

Lindoso JAL, Lindoso AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.** 2009, 51(5).

Lu J, Liong M, Zink JJ, Tamanoi F. Mesoporous Silica Nanoparticles as a Delivery System for Hydrophobic Anticancer Drugs. **Small.** 2007, 3(8): 1341–1346.

Maia C, Rolão N, Nunues M, Gonçalves L, Campino L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta Trop.** 2007, 103: 150-155.

Martines MAU, Mendes LS, Jorge J, Castro GR, Pastura NMR, Scofield CF, Gonzales WA. Effect of fat chain length of sorbitan surfactant on the porosity of mesoporous silica. **Orbital.** 2009, 1(2): 193-202.

Martines MAU Yeong E, Larbot A, Prouzet E. Temperature dependence in the synthesis of hexagonal MSU-3 type mesoporous sílica synthesized with Pluronic P123 block copolymer. **Microporous Mesoporous Mater.** 2004, 74: 213-220.

Masmoudí A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **J. Dermatol. Case Rep.** 2013, 2: 31-41.

Michalick MSM. O Gênero Leishmania. In: Neves DP, Melo AL, Linard PM, Vitor RWA. Parasitologia humana. 11º ed. São Paulo: **Atheneu**; 2005, 41-46.

Moritz M, Geszke-Moritz M. Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: principles and applications. **Mater. Sci. Eng.** 2015, 49: 114–151.

Murray HW. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2001, 45(8): 2185-2197.

Oliveira DCP, Barros ALB, Belardi RM, Goes AM, Souza BKO, Soares DCF. Mesoporous silica nanoparticles as a potential vaccine adjuvant against *Schistosoma mansoni*. **J. Drug. Deliv. Sci. Tec.** 2016, 35: 234-240.

Ouellette, M.; Drummel-Smith, J.; Papadopoulou, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist. Updat.** 2004, 7(4-5): 257-66.

Pham TT, Loiseau PM, Barrati G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. **Int. J. Pharm.** 2013, 454: 539–552.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC, Andrade Junior HF, Tempone AG. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova.** 2003, 26(4): 550-5.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 2007, 7: 581–967.

Rezende JM. Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. In: Rezende JM. À sombra do plátano: crônicas de história da medicina. São Paulo: **Editora Unifesp**; 2009, 359-62.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2004, 99(3): 239-251.

Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** 2006, 22(4):168-174.

Sing KSW. Reporting Physisorption Data for Gas-Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface-Area and Porosity (Recommendations 1984). **Pure Appl. Chem.** 1985, 57(4): 603-619.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect. Chemother.** 2004, 10:307-315.

Skraba CM, Pedroso RB, Fiorini A, Rosado FR, Aristides SM, Lonardon MV, Teixeira JJ, Silveira TG. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using

membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2014, 78(4): 411-417.

Slowing I, Trewyn BG, Giri S, Lin VSY. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. **Adv. Funct. Mater.** 2007, 17(8): 1225–1236.

Soares-Bezerra RJ, Leon R, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.** 2004, 40: 139-149.

Soto-Mancipe J, Grogl M, Berman JD. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Clin. Infect. Dis.** 1993, 16(3): 417-425.

Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J. Med. Res.** 2006, 123: 345-52.

Sundar S, Goyal AK, More DK, Singh MK, Murray HW . Treatment of antimony-unresponsive Indian visceral leishmaniasis with ultrashort courses of amphotericin-B-lipid complex. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. [s.l.] **Carfax Publ Co**, 1998, 755-764.

Tobias CAS. Alterações laboratoriais e efeitos adversos no tratamento da Leishmaniose Visceral: hospital - Araguaína-TO. Goiânia: **Universidade Católica de Goiás**; 2009, 74.

Trendafilova I, Szegedi À, Yoncheva K, Shestakova P, Mihaly J, Ristic A, Konstantinov S, Popova M. A pH dependente delivery of mesalazine from polymer coated and drug-loaded SBA-16 systems. **Eur. J. Pharm. Sci.** 2016, 81: 75–81.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Fact sheet n° 375. Atualizado em janeiro de 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 26 outubro 2014.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**: Access to essential antileishmanial medicines and treatment. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 15 março 2017.

WHO. World Health Organization. WHO technical report series. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 22-26, 2010.

Wolday D et al. Emerging Leishmania/HIV co-infection in Africa. **Med. Microbiol. Immun.** 2001; 150: 65–67.

Artigo

# Atividade Antileishmania *In Vitro* do Antimoniato de Meglumina Impregnado em Diferentes Tipos de Sílicas Mesoporosas

Antonio Marcos Honorato<sup>1</sup>, Teófilo Mazon Cardoso<sup>2</sup>, Maria de Fatima Cepa Matos<sup>3</sup>, Mônica Cristina Toffoli Kadri<sup>4</sup>, Renata Trentin Perdomo<sup>3</sup>, Iluska Senna Moslaves<sup>4</sup>, Camilla Izabela Nantes<sup>3</sup>, Natália Valério Barbosa<sup>5</sup>, Amarith Rodrigues das Neves<sup>5</sup>, Marco Antonio Utrera Martines<sup>6</sup>, Carla Cardozo Pinto de Arruda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Parasitologia Humana, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79090-900 Campo Grande-MS, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79090-900 Campo Grande-MS, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79090-900 Campo Grande-MS, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Farmacologia e Inflamação, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79090-900 Campo Grande-MS, Brasil.

<sup>5</sup> Laboratório de Síntese e Química Medicinal - LASQUIM, Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79090-900 Campo Grande-MS, Brasil.

\* Correspondence: carla.arruda@ufms.br; Tel.: +55-67-3345-7369

**Resumo:** Quatro sílicas mesoporosas foram sintetizadas e impregnadas com antimoniato de meglumina para otimização da liberação do fármaco e avaliação da atividade antileishmania. MCM-41, SBA-16, MSU-3 e MSU-4 foram caracterizadas por isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77K, difração de Raio-X e microscopia eletrônica de varredura, e avaliadas quanto ao perfil de dissolução do antimoniato de meglumina em meio RPMI 1640, observando-se diferenças quanto ao tamanho, volume e espessura da parede dos poros, com estruturas internas distintas e tamanhos morfológicos variáveis. A atividade foi avaliada sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a citotoxicidade sobre fibroblastos NIH/3T3, para avaliação da seletividade. As matrizes mesoporosas impregnadas com antimoniato de meglumina não apresentaram atividade sobre as formas promastigotas ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). Entretanto, todas foram ativas contra as formas amastigotas intracelulares ( $CI_{50}$  variando entre 2,05 e 11,00  $\mu\text{g/mL}$ ), chegando a uma atividade até dez vezes maior do que a droga livre, que se mostrou moderadamente ativa ( $CI_{50} = 21,54 \mu\text{g/mL}$ ). O sistema MSU-3 Sb foi o que apresentou a melhor atividade antileishmania, provavelmente devido às características estruturais e morfológicas ( $SA = 749,61 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $D_p = 8,54 \text{ nm}$ ,  $V_p = 0,95 \text{ cm}^3/\text{g}$ , Bastão – 2D hexagonal). As sílicas não impregnadas foram, em sua maioria, moderadamente ativas ( $CI_{50} = 22,14-46,69 \mu\text{g/mL}$ ). As sílicas mesoporosas não tiveram efeito citotóxico sobre as células de mamífero testadas, com índices de seletividade expressivos. Todas as sílicas impregnadas induziram aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelas células peritoneais infectadas e tratadas na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , exceto MSU-4 Sb. As sílicas não impregnadas também induziram aumento na produção de NO nas massas equivalentes à liberação de 50  $\mu\text{g/mL}$ , o que sugere a participação do NO como mecanismo leishmanicida. Os resultados demonstram a otimização do efeito do antimoniato de meglumina quando impregnado às matrizes mesoporosas testadas, sugerindo a progressão para avaliação de resposta terapêutica *in vivo*, bem como o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos para o tratamento das leishmanioses, em especial a LTA.

**Palavras-chave:** nanomateriais; *Leishmania amazonensis*; leishmanioses; sistemas de liberação; citotoxicidade

---

**Abstract:** Four mesoporous silicas were synthesized and impregnated with *N*-methyl glucamine antimoniate (Sb) for optimization of drug release and evaluation of the antileishmanial activity. MCM-41, SBA-16, MSU-3, and MSU-4 were characterized by isotherms of Nitrogen adsorption and desorption at 77K, X-ray diffraction and scanning electron microscopy. Structural differences were observed concerning size, volume and pore wall thickness, as well as to the internal structures of the silica particles. After Sb impregnation, the dissolution profile of Sb in RPMI 1640 medium was determined. Antileishmanial activity was evaluated on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes. Cytotoxicity was evaluated on NIH/3T3 murine fibroblasts to determine the selectivity index (SI). Mesoporous matrices impregnated with Sb were not active on promastigote forms ( $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ ). However, all of them were active against intracellular amastigotes ( $IC_{50}$  values ranging from 2.05 to 11.00  $\mu\text{g/mL}$ ), up to 10 times more active than the free drug, which was moderately active ( $IC_{50} = 21.54 \mu\text{g/mL}$ ). MSU-3 Sb system showed the best antileishmanial activity, probably due to their structural and morphological characteristics ( $SA = 749.61 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $Pd = 8.54 \text{ nm}$ ,  $Pv = 0.95 \text{ cm}^3/\text{g}$ , stick – 2D hexagonal). Non-impregnated silicas were moderately active ( $IC_{50} = 22,14-46,69 \mu\text{g/mL}$ ). None of the systems had cytotoxic effect on the mammalian cells tested, showing expressive SI. Impregnated silicas induced an increase of nitric oxide production by infected cells at the concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$  (excepting MSU-4 Sb), which was also observed for non-impregnated silicas. Results demonstrate the optimization of the effect of meglumine antimoniate when associated to the mesoporous matrices, suggesting the progression for *in vivo* tests in order to evaluate the therapeutic response.

**Keywords:** nanomateriais; *Leishmania amazonensis*; leishmanioses; delivery systems; cytotoxicity

---

## 1. Introdução

As leishmanioses são um conjunto de doenças infectoparasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas pela picada da fêmea do hospedeiro invertebrado, o inseto flebotômico [1]. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é a forma cutânea da doença nas Américas, com manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas localizadas a formas mucosas, incluindo a forma difusa [2,3]. A leishmaniose cutânea difusa é uma forma de difícil manejo clínico, diretamente ligada à condição imunológica do indivíduo, que apresenta resposta imune deprimida frente aos antígenos de *Leishmania*. No Brasil, seu agente etiológico é *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [2,4].

Antimoniais pentavalentes ( $\text{Sb}^{+5}$ ) são as drogas de primeira escolha utilizadas no tratamento das leishmanioses. Outras opções terapêuticas são a anfotericina B e pentamidina, administradas quando se tem a impossibilidade ou a resistência ao tratamento com o antimoniató de meglumina (Glucantime®). No entanto, todos estes fármacos apresentam importante limitação quanto à segurança terapêutica por apresentar elevada toxicidade e alta frequência de efeitos adversos [5-7]. Os antimoniais ainda exigem administração parenteral e longo período de tratamento, levando a possíveis falhas e resistência do parasito [8].

Na busca por novos antileishmaniais, a modificação do sistema de liberação de fármacos parece ser um promissor mecanismo para a otimização terapêutica e redução dos efeitos colaterais [9]. Nanoestruturas de sílicas mesoporosas vêm sendo cada vez mais empregadas em diversos ramos da tecnologia farmacêutica como catálise, adsorção de metais, separação de reagentes e biomarcadores [10]. Devido a características como alta biocompatibilidade, estabilidade química, biodegradabilidade e alta capacidade carreadora de moléculas, estudos têm utilizado os materiais mesoporosos ordenados em sistemas de *drug delivery*. Esta aplicação varia desde a administração de ibuprofeno [11], um medicamento anti-inflamatório amplamente conhecido, até a incorporação de drogas anticâncer hidrofóbicas [12], proteínas impermeáveis à membrana celular [13] e complexos híbridos de sílica e colágeno [14].

O objetivo deste trabalho foi a investigação da atividade antileishmania do antimoniato de meglumina associado a diferentes matrizes de sílica mesoporosa. Tal sistema, ainda não descrito na literatura, poderia otimizar a liberação do fármaco, tornando-o mais efetivo e reduzindo seus efeitos colaterais, como demonstrado para outras drogas utilizando nanoestruturas de sílica mesoporosa.

## 2. Resultados e Discussão

### Atividade biológica *in vitro*

As atividades das sílicas mesoporosas impregnadas ou não com antimoniato de meglumina sobre as formas promastigotas e amastigotas e o efeito citotóxico sobre fibroblastos murinos estão descritos na Tabela 1. As amostras foram classificadas em ativas (<20 µg/mL), moderadamente ativas (20 – 50 µg/mL) e inativas (>50 µg/mL), com base na literatura [15,16]

Apesar de não constituírem as formas-alvo dos tratamentos, os ensaios sobre promastigotas fornecem dados sobre a ação direta dos fármacos sobre o parasito. No presente trabalho, o antimoniato teve sua atividade antipromastigota reduzida quando impregnado às diferentes matrizes de sílica testadas (Tabela 1), passando de moderadamente ativo na sua forma livre (36,29 µg/mL) para inativo quando impregnado. Acreditamos que essa redução de atividade possa estar relacionada à temperatura em que o teste é realizado (25°C), onde a estrutura das sílicas pode prejudicar em algum grau sua liberação. Todas as matrizes de sílica, quando testadas não impregnadas, foram inativas (Tabela 1).

O antimoniato de meglumina tem como alvo as formas amastigotas intracelulares presentes nas lesões, tanto na leishmaniose tegumentar quanto na visceral [17], uma vez que o Sb<sup>v</sup> pode atuar como pró-droga, sendo metabolizado pelo organismo em Sb<sup>iii</sup>, forma leishmanicida e tóxica [18-20]. Em relação à atividade sobre amastigotas intracelulares, todas as sílicas impregnadas foram ativas e superiores ao antimoniato de meglumina livre, moderadamente ativo (MSU-3 Sb: 2,05 µg/mL > SBA-16 Sb: 4,34 µg/mL > MSU-4 Sb: 5,45 µg/mL > MCM-41 Sb: 11,00 µg/mL > antimoniato de meglumina: 21,54 µg/mL) (Tabela 1). Esta diferença de atividade pode estar relacionada ao perfil de liberação, às características morfoestruturais dos materiais e à interação do sistema com as células-alvo. A Figura 1 ilustra a ação das sílicas impregnadas com antimoniato de meglumina sobre macrófagos peritoneais infectados.

O sistema MSU-3 Sb foi o que apresentou maior atividade sobre amastigotas intracelulares, sendo 10,5 vezes mais ativo do que a droga livre (Tabela 1). Isto pode ter ocorrido devido à morfologia em bastão da sílica, com estrutura interna hexagonal. Também podemos destacar o maior diâmetro (8,54 nm) e volume do poro (0,95 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>) e, ainda, a pequena espessura da parede do poro (1,37 nm) e o tamanho da partícula (0,74 µm). Segundo Martines *et al.* [21], a morfologia desta sílica é altamente dependente da temperatura: entre 35 a 45 °C, a morfologia é na forma de bastão e, acima de 45 °C, ocorre perda da estrutura, formando agregados de partículas amorfas. Desta forma, uma vantagem de aplicação desta sílica é que seu uso, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, se daria na mesma temperatura de síntese, o que manteria sua forma de bastão, otimizando a atividade pela manutenção de liberação de antimoniato de meglumina.

MSU-3 foi a sílica com menor liberação de antimônio em 24h no ensaio de liberação (Figura 3a). Como os ensaios foram realizados com concentrações equivalentes de Sb de acordo com a liberação (as

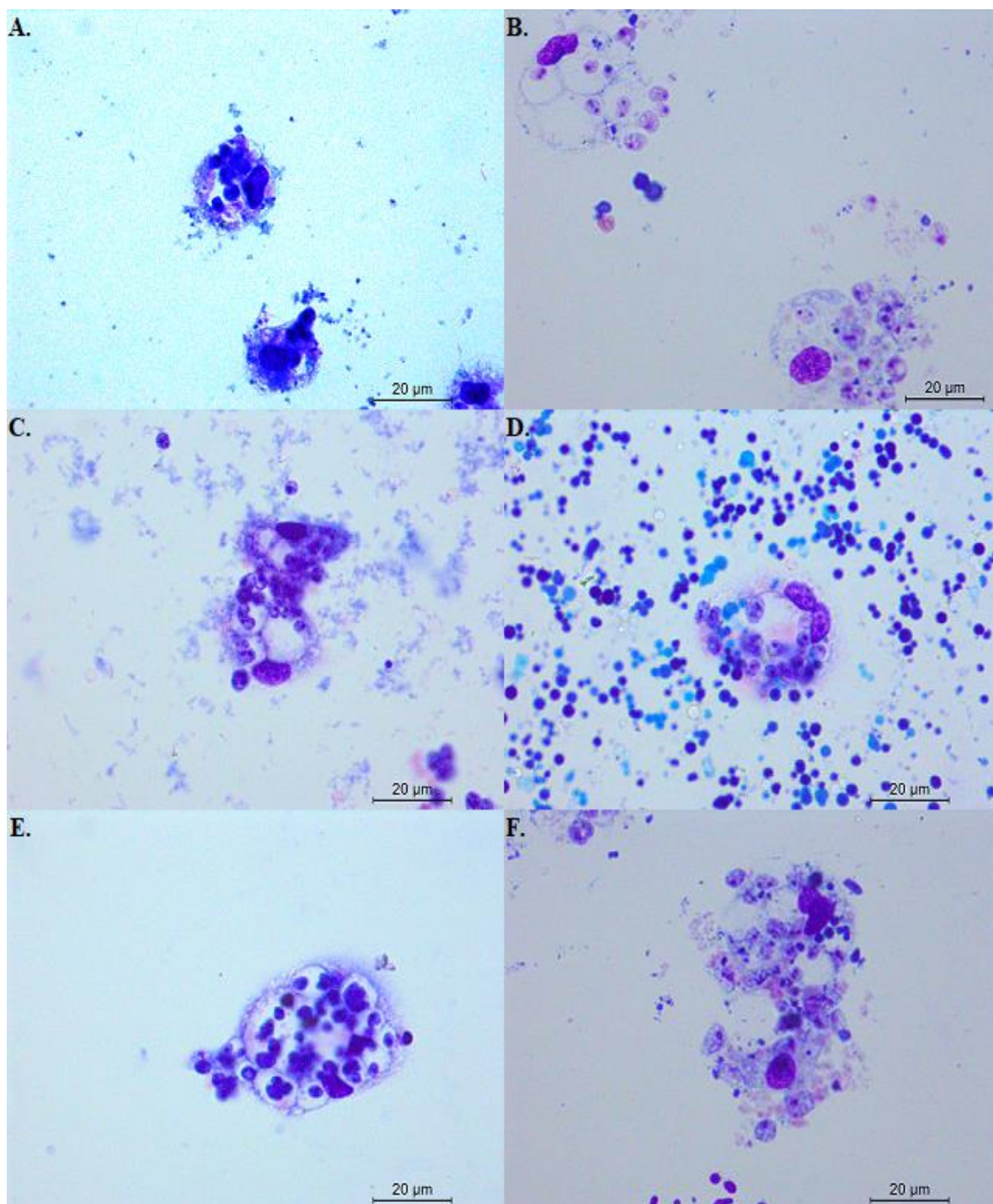
concentrações de antimônio no meio eram iguais em 24h), outro fator pode ter influenciado a atividade. Se em 24 h MSU-3 foi a que liberou menos antimoniato, em 120h esta sílica foi a que apresentou a maior liberação (Figura 3b); provavelmente ela sustenta melhor a liberação, devido às suas características morfológicas. Com 24h de infecção, as concentrações de antimoniato de meglumina solúvel estavam normalizadas pelo cálculo, mas a quantidade ainda impregnada do fármaco provavelmente contribuiu na atividade, pois o sistema estaria sendo direcionado para o meio intracelular pela provável fagocitose.

É interessante que sistemas de liberação sejam retidos nos locais de administração por mais tempo do que as drogas livres, sendo então capazes de modificar a distribuição das substâncias associadas [22]. O que se espera é que estes sistemas sejam fagocitados pelos macrófagos hospedeiros de *Leishmania* e liberem as drogas aprisionadas no vacúolo parasitóforo, onde os parasitos estão se multiplicando. Desta forma, sugere-se que as sílicas mesoporosas estejam atuando como carreadoras do antimoniato de meglumina para o interior dos macrófagos.

**Tabela 1.** Atividade antileishmania *in vitro* do antimoniato de meglumina impregnado em diferentes tipos de sílica mesoporosa, citotoxicidade em células de mamífero e índice de seletividade.

A-T	<i>L. amazonensis</i> Promastigota (Pro.)	<i>L. amazonensis</i> Amastigota intracelular (Ama.)	Fibroblastos NIH/3T3	IS <sup>2</sup> (Pro.)	IS <sup>2</sup> (Ama.)
	CI <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/mL)		
<b>MSU-3</b>	>50	22,14	>250	>5,00	>11,29
<b>MSU-3Sb</b>	>50	2,05	>250	>5,00	>121,95
<b>MSU-4</b>	>50	46,69	>250	>5,00	>5,35
<b>MSU-4Sb</b>	>50	5,45	>250	>5,00	>45,87
<b>MCM-41</b>	>50	>50,00	>250	>5,00	>5,00
<b>MCM-41Sb</b>	>50	11,00	>250	>5,00	>22,72
<b>SBA-16</b>	>50	32,43	>250	>5,00	>07,71
<b>SBA-16Sb</b>	>50	4,34	240	>5,00	55,30
<b>AM</b>	36,29	21,54	>250	>6,89	>11,62
<b>Anfo. B</b>	0,09	0,05	5,26	58,44	105,20
<b>Penta.</b>	3,03	1,13	26,80	8,84	23,71

<sup>1</sup> CI<sub>50</sub>: concentração que inibe 50% dos parasitos/crescimento celular; <sup>2</sup> IS: índice de seletividade: CI<sub>50</sub> sobre células de mamífero/CI<sub>50</sub> sobre parasitos; Controles positivos, antimoniato de meglumina solúvel (AM), anfotericina B (Anfo.B) e pentamidina (Penta.). Os dados são representativos de três experimentos independentes.



**Figura 1.** Fotomicrografias de macrófagos peritoneais infectados e tratados *in vitro* com 12,5 µg/mL de antimoniate de meglumina associado às sílicas mesoporosas (A) MCM-41 Sb, (B) SBA-16 Sb, (C) MSU-3 Sb, (D) MSU-4 Sb. Células infectadas não tratadas foram utilizadas como controle negativo (E) e o antimoniate de meglumina solúvel (12,5 µg/mL) como controle positivo (F). Aumento: 1000x. Coloração GIEMSA.

Já foi demonstrada a relação da fagocitose de nanopartículas mesoporosas com o tamanho, a forma e as propriedades de superfície do material. Essa interação das nanopartículas se dá através das principais vias de internalização, como receptores de complemento, Fcγ, manose e *scavenger receptors* [23,24]. Witasp *et al.* [25] mostraram a internalização da sílica mesoporosa AMS-6 por macrófagos através de microscopia eletrônica de transmissão. Gallud *et al.* [26] demonstraram a internalização das sílicas AMS-6 e AMS-8 por macrófagos através de microscopia confocal. Carvalho *et al.* [27] observaram que SBA-15 foi fagocitada e não induziu alterações morfológicas em macrófagos de medula óssea oriundos de camundongos das linhagens *Lm*, *Liv* e *Swiss*. Assim, a presença das nanopartículas mesoporosas testadas, de diâmetro entre 2-50 nm, poderia favorecer a internalização do fármaco através da expressão de receptores específicos no macrófago, e ainda promover sua ativação, com produção de espécies reativas leishmanicidas como o NO [26].

SBA-16 Sb foi o segundo melhor sistema sobre amastigotas intracelulares, 5,6 vezes mais ativo que o antimoniato de meglumina livre (Tabela 1). De estrutura interna 3D cúbica, apresenta uma melhor capacidade de liberação pelo ponto de vista organizacional; segundo Meynen *et al.* [28], a estrutura em 3D dos sistemas de canais da sílica SBA-16 favorece a transferência de massa. De morfologia predominantemente rombododecaédrica, algumas partículas, porém, apresentavam-se sob forma esférica. Esta falta de uniformidade pode ter contribuído para a relativa redução de atividade pois, analisando-se as demais matrizes, observa-se que a forma esférica parece não ser a melhor morfologia para a atividade antileishmania. Da mesma forma, o maior tamanho da sua partícula (3,75 μm) poderia prejudicar sua internalização por fagocitose.

As sílicas impregnadas MSU-4 e MCM-41 foram as que apresentaram menor atividade biológica (Tabela 1). Ainda assim, mostraram-se respectivamente cerca de quatro e duas vezes mais ativas que o antimoniato de meglumina livre (MSU-4: 5,45 μg/mL; MCM-41: 11,00 μg/mL). Suas morfologias esféricas e seus tamanhos de poro (MSU-4: 2,74 nm; MCM-41: 3,03 nm), os menores entre as sílicas testadas, podem ter contribuído para essa menor atividade, assim como suas estruturas internas, em 2D.

A maioria das sílicas não impregnadas, quando testadas frente às amastigotas intracelulares, foram moderadamente ativas (Tabela 1). Isto nos leva a concluir que tais sílicas induzem algum grau de ativação celular, provavelmente após sua fagocitose, o que pode ter levado à destruição intracelular dos parasitos. A sílica MCM-41 não impregnada foi considerada inativa.

É importante salientar que nenhuma sílica foi citotóxica para as células de mamífero testadas (fibroblastos) (Tabela 1). A seletividade das sílicas impregnadas para as formas amastigotas foi expressiva, com IS variando de 121,95 (MSU-3) a 22,72 (MCM-41).

A atividade das drogas de referência foi comprovada nos ensaios antileishmania (Tabela 1). Anfotericina B foi, como já esperado, a droga mais ativa, tanto nas formas promastigotas (CI<sub>50</sub> = 0,09 μg/mL) quanto nas amastigotas (CI<sub>50</sub> = 0,05 μg/mL). Sua atividade antileishmania foi comprovada em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* [29,30]. Sua alta atividade sobre formas promastigotas sugere seu uso como controle positivo em ensaios de atividade antileishmania. Valadares *et al.* [31] utilizaram a anfotericina B como controle positivo em ensaios de atividade antipromastigota e antiamastigota axênica, testando-a a 10 μg/mL. Em nosso estudo, apesar da altamente citotóxica para os fibroblastos (Tabela 1), o fármaco foi altamente seletivo para *L. amazonensis* (IS = 58,44 e 105,20 respectivamente para promastigotas e amastigotas intracelulares).

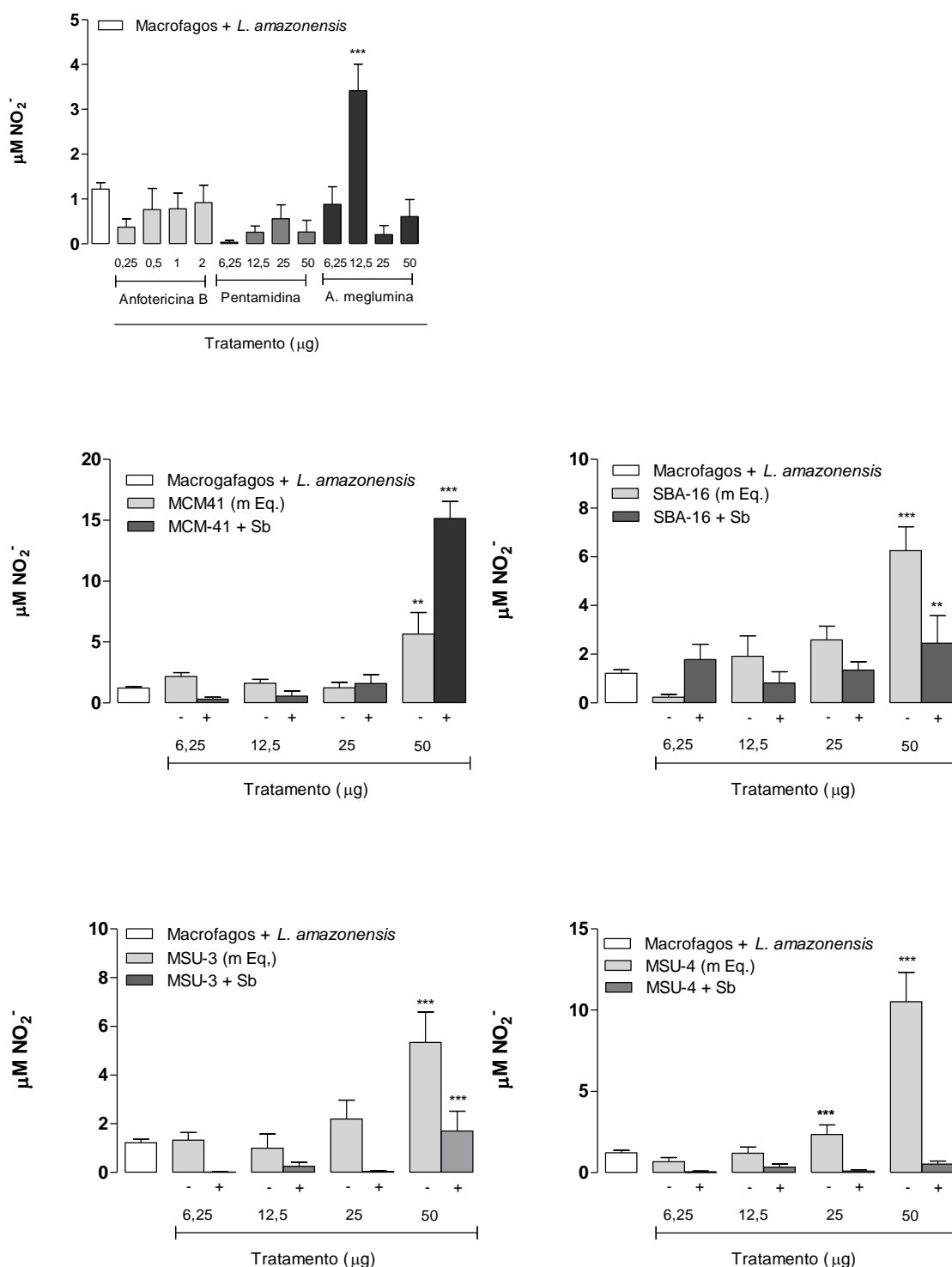
Pentamidina constitui um dos fármacos mais utilizados como controle positivo em ensaios de *screening* de compostos sobre formas promastigotas [32], devido à faixa de atividade (50 a 0,125 μg/mL), que permite melhor comparação com as amostras. No presente estudo, foi ativa e seletiva para promastigotas (CI<sub>50</sub> = 3,03 μg/mL; IS = 8,84) e amastigotas (CI<sub>50</sub> = 1,13 μg/mL; IS = 23,71) (Tabela 1). Nguewa *et al.* [33] mostraram que a droga age diretamente no parasita, sem necessidade de intermediários celulares, através de estudo *in vitro* utilizando tecidos de mamíferos e o protozoário *Crithidia oncopelti*.

O tratamento com as sílicas impregnadas induziu aumento significativo da produção de NO pelas células infectadas e tratadas com 50 μg/mL de antimoniato de meglumina, com exceção de MSU-4 Sb

(Figura 2). A produção aumentada de NO em relação às células infectadas não tratadas sugere que este mecanismo de ação pode estar contribuindo para a atividade antileishmania. Houve, ainda, diferença significativa entre o tratamento com as sílicas não impregnadas em relação às células infectadas não tratadas nas massas de sílica equivalente (m Eq.) à liberação de 50 µg/mL (Figura 2), sugerindo e confirmando que as sílicas *per se* podem estar estimulando e ativando os macrófagos peritoneais. Heikkilä *et al.* [34] demonstraram a produção de espécies reativas de oxigênio por sílicas mesoporosas do tipo MCM-41 e SBA-15 em linhagem celular de carcinoma de cólon humano indiferenciado.

MCM-41 impregnada foi a que induziu maior produção de NO pelas células peritoneais infectadas, cerca de 15 vezes maior que as células infectadas não tratadas (na maior concentração). Apesar de ter sido a sílica com menor atividade sobre amastigotas intracelulares, provavelmente devido à relação morfologia/liberação de antimoniato, esta produção aumentada de NO pode ter contribuído para o efeito leishmanicida. Entre as drogas de referência, apenas o antimoniato de meglumina, na concentração de 12 µg/mL, apresentou diferença significativa na produção de NO em relação às células infectadas não tratadas (Figura 2), cerca de três vezes maior, sugerindo a participação deste mecanismo leishmanicida na destruição intracelular dos parasitos.

Juntos, os resultados demonstram a otimização do efeito do antimoniato de meglumina quando impregnado às matrizes mesoporosas testadas, com provável ativação de mecanismos de destruição intracelular dos parasitos. Ainda, os resultados sugerem a possibilidade de redução da dose hoje recomendada do fármaco e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais a ele associados.



**Figura 2.** Liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais infectados por *L. amazonensis* após o tratamento com os sistemas de sílicas mesoporosas impregnadas ou não com antimoniato de meglumina (MCM-41, SBA-16, MSU-3 e MSU-4) e com as drogas de referência (anfotericina B, pentamidina e antimoniato de meglumina). As barras representam a média ± EPM de seis replicatas. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , para as diferentes concentrações em comparação com células não tratadas (controle) (ANOVA Fator Unico, pós teste de Bonferroni).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Sílica mesoporosa

Quatro sílicas com morfologias e estruturas internas distintas foram sintetizadas, caracterizadas, impregnadas com antimoniato de meglumina e cedidas pelo Prof. Dr. Teófilo Mazon Cardoso: SBA-16, MCM-41, MSU-3 e MSU-4 [35].

##### 3.1.1. Síntese e caracterização do material

Para a síntese da sílica mesoporosa SBA-16 seguiu-se a metodologia, com adaptações, descrita por Mesa *et al.* [36]. Para MCM-41, adotou-se a proposta de Chen e He [37]. A sílica mesoporosa MSU-3 foi sintetizada conforme Martines *et al.* [21] e, MSU-4, conforme Saliba [38].

A caracterização dos materiais deu-se por isotermas de adsorção-dessorção de Nitrogênio a 77K, sendo o método de Brunauer-Emmett-Teller (BET) para análise de superfície, Barret, Joyner e Halenda (BJH) para análise de volume do poro e Broekhoff e Boer (BdB) para análise do diâmetro de poro. A difração de Raio-X foi utilizada para análise da estrutura interna e a microscopia eletrônica de varredura para averiguação do tamanho e morfologia das partículas. A Tabela 2 mostra as características morfológicas das sílicas mesoporosas.

**Tabela 2.** Características morfológicas das matrizes mesoporosas.

Tipo de sílica	AS <sup>1</sup> (m <sup>2</sup> /g)	Dp <sup>2</sup> (nm)	Vp <sup>3</sup> (cm <sup>3</sup> /g)	<sup>4</sup> Tamanho (µm)	Estrutura interna	Morfologia da partícula
MCM-41	782,10	3,03	0,64	0,13 ± 0,03	2D - hexagonal	esférica
SBA-16	855,09	6,42	0,64	3,75 ± 1,67	3D – cúbica	rombododecaédrica
MSU-3	749,61	8,54	0,95	0,74 ± 0,18	2D – hexagonal	bastão
MSU-4	706,83	2,74	0,45	2,61 ± 0,72	Espaguete	esférica

<sup>1</sup> AS – área superficial obtida pelo método BET; <sup>2</sup> DP – diâmetro de poro pelo método BdB; <sup>3</sup> VP – volume de poro através do método BJH; <sup>4</sup> Tamanho – valor referente a média ± desvio padrão. Fonte: Adaptado de Cardoso, 2016.

##### 3.1.2. Perfil de dissolução do antimoniato de meglumina impregnado em diferentes matrizes de sílica mesoporosa

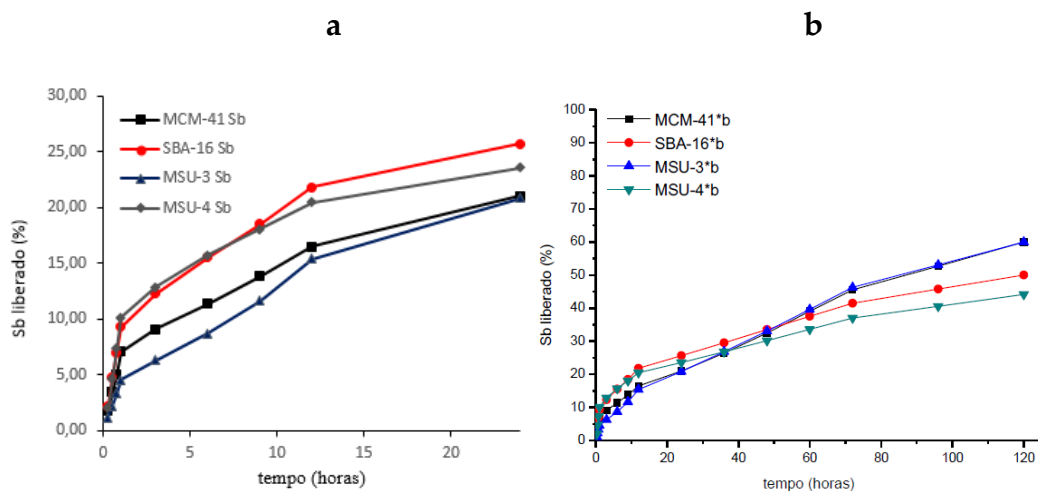
As amostras de sílica mesoporosa foram impregnadas com antimoniato de meglumina [35], gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Frédéric Jean George Frezard, do Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados/ICB/UFMG. A Tabela 3 descreve os teores de impregnação dos materiais.

**Tabela 3.** Quantidade de antimoniato de meglumina impregnado nas matrizes de sílica mesoporosa (massa equivalente a 1mg).

Tipos de sílica	Quantidade de Sb <sup>(v)</sup> (mg) impregnado por miligrama de sílica	Teor de impregnação de Sb <sup>(v)</sup> (p/p) (%)
MCM-41	0,1235	12,35
SBA-16	0,1302	13,02
MSU-3	0,1273	12,73
MSU-4	0,1288	12,88

Fonte: Cardoso [35].

As sílicas impregnadas foram avaliadas quanto ao perfil de dissolução em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) [39-42]. A determinação do antimônio (Sb) no meio de dissolução, em cada tempo de coleta, ocorreu por ICP-OES com gerador de hidretos. A Figura 3 mostra os perfis de dissolução do antimoniato de meglumina a partir das sílicas mesoporosas até 24 e 120 horas [35].



**Figura 3.** Perfil de dissolução em meio RPMI 1640 das matrizes de sílica mesoporosa contendo antimoniato de meglumina com tempo de ensaio até 24 horas (a) e 120 horas (b) [35].

### 3.2. Atividade antileishmania

#### 3.2.1. Parasitos

A cepa padrão IFLA/BR/1967/PH8 de *L. amazonensis* foi utilizada para os ensaios *in vitro*. Amastigotas foram rotineiramente isoladas de lesões de camundongos BALB/c e mantidas como formas promastigotas, até a 10ª passagem, a 26°C em *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich®) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich®), 10.000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®).

#### 3.2.2. Animais

Camundongos BALB/c fêmeas de seis semanas de idade foram utilizados para obtenção dos macrófagos peritoneais residentes usados nos ensaios de infecção *in vitro*. Os animais foram obtidos no Biotério Central (CCBS/UFMS) em boas condições de saúde. Foram mantidos em mini-isoladores acoplados a rack ventilado (Alesco®), em boas condições de higiene, sendo alimentados com ração balanceada comercial e hidratados com água *ad libitum*. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS, sob Parecer 675/2015.

#### 3.2.3. Atividade *in vitro* sobre formas promastigotas

Formas promastigotas em fase log de crescimento, cultivadas em *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich®) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab®), 10.000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®), foram incubadas com os diferentes sistemas de associação Sb-sílica. As placas de 96 poços, em quintuplicata, foram adicionados  $10^6$  parasitas/mL e concentrações variadas das amostras-teste: as sílicas mesoporosas impregnadas com antimoniato de meglumina MCM-41Sb, SBA-16Sb, MSU-3Sb e MSU-4Sb (1,563-100 µg/mL de antimônio calculados conforme o perfil de liberação em 72 horas) e as mesmas matrizes de sílica não impregnadas MCM-41, SBA-16, MSU-3, MSU-4 (massa equivalente à massa impregnada com antimoniato de meglumina

utilizada na diluição seriada 1,563-100 µg/mL). Antimoniato de meglumina solúvel (Glucantime®, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.; 12,5-100 µg/mL), anfotericina B (Sigma-Aldrich®; 0,094-0,750 µg/mL) e pentamidina (Sigma-Aldrich®; 12,5-100 µg/mL) foram utilizados como drogas de referência, e o meio de cultura sozinho como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 26°C em 5% CO<sub>2</sub> por 72 h [32]. A viabilidade celular foi determinada por meio da adição de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrasodium] (Sigma-Aldrich®; 5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 h e, em seguida, a absorbância estimada em espectrofotômetro, com comprimento de onda a 540 nm. A atividade das amostras foi expressa através da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI<sub>50</sub>), calculada pelo Programa *GraphPad Prism* 5.0 por meio de curva de regressão não linear.

#### 3.2.4. Atividade *in vitro* sobre formas amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c eutanasiados através de deslocamento cervical. Para isso, após assepsia do abdômen, foram injetados, na cavidade peritoneal, 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) contendo 10.000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®). Após massagem da área, o líquido foi aspirado e transferido para tubos mantidos em gelo. As células peritoneais foram quantificadas em câmara de Neubauer após exclusão em Azul de Trypan (Sigma-Aldrich®) e distribuídas (1x10<sup>6</sup> células/poço) em placas de 24 poços contendo lamínulas, em sextuplicata. Após uma hora de incubação a 37°C/5% CO<sub>2</sub>, as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária (4x10<sup>6</sup> células/poço) e incubadas a 35°C/5% CO<sub>2</sub>. Após 4 h, as células infectadas foram tratadas com as seguintes amostras-teste, por 24 h a 35°C/5% CO<sub>2</sub>: sílicas mesoporosas impregnadas com antimoniato de meglumina: MCM-41Sb, SBA-16Sb, MSU-3Sb e MSU-4Sb (6,25-50 µg/mL de antimônio, calculados conforme perfil de liberação em 24 horas); e as mesmas matrizes de sílica não impregnada MCM-41, SBA-16, MSU-3, MSU-4 (massa equivalente à massa de sílica impregnada com antimoniato de meglumina utilizada na diluição seriada 6,25-50 µg/mL). Antimoniato de meglumina solúvel (Glucantime®, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.; 6,25-50 µg/mL), anfotericina B (Sigma-Aldrich®; 0,25-2 µg/mL) e pentamidina (Sigma-Aldrich®; 6,25-50 µg/mL) foram utilizadas como drogas de referência. Células infectadas cultivadas em meio sem tratamento foram utilizadas como controle negativo. Após o tratamento, as lamínulas foram retiradas, fixadas e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich®) diluído a 1:10 em água destilada [43]. O número médio de amastigotas por célula foi calculado pela contagem de 200 células por lamínula e a concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foi determinada através de curva dose-resposta de regressão não-linear.

#### 3.3. Efeito citotóxico em células de mamífero

Cem microlitros de suspensão de fibroblastos murinos NIH/3T3 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil) foram semeados em placas de 96 poços (1x10<sup>5</sup>/mL em meio RPMI 1640, Sigma-Aldrich®). 24 h depois, as sílicas impregnadas (MCM-41Sb, SBA-16Sb, MSU-3Sb e MSU-4Sb) foram adicionadas nas concentrações 0,25-250 µg/mL de antimônio de meglumina (calculados conforme perfil de liberação em 24 horas). As mesmas sílicas, não impregnadas, foram adicionadas em massa equivalente (mEq.) à massa das respectivas sílicas impregnadas com antimoniato utilizadas na diluição seriada 0,25-250 µg/mL. Anfotericina B (Sigma-Aldrich®, 0,025-25 µg/mL), antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda., 0,25-250 µg/mL) e pentamidina (Sigma-Aldrich®, 0,25-250 µg/mL) foram utilizadas como drogas de referência e as células foram incubadas a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> por 48 h, a fim de estimar a CI<sub>50</sub>. O crescimento celular foi avaliado por meio do método colorimétrico da sulforodamina B [44], sendo obtidas as absorbâncias: amostras-teste (T), controle negativo (CN), branco das amostras-teste (B) e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras-teste (AT). Em todos os experimentos foi incluído um controle negativo (DMSO, na maior concentração utilizada para as amostras). A porcentagem de crescimento de cada amostra foi calculada em programa Softmaxmex Pro 6.3 segundo Monks *et al.* [45]. A concentração inibitória em 50% (CI<sub>50</sub>) foi determinada

por curva de regressão não linear (Microcal Origin Versão 6.0). O índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com Medeiros *et al.* [46].

### 3.4. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO pelas células peritoneais infectadas e tratadas com as diferentes amostras foi avaliada pela reação de Griess [47]. 50 µL dos sobrenadantes das culturas foram incubados com 50 µL de reagente de Griess à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram expressos como média e erro-padrão. Os dados foram analisados por ANOVA de fator único com pós-teste de Bonferroni e considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4. Conclusão

As sílicas mesoporosas MCM-41, MSU-3, MSU-4 e SBA-16 Sb impregnadas com antimoniato de meglumina foram até 10,5 vezes mais ativas do que o fármaco livre sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. MSU-3 impregnada foi o sistema de liberação com maior atividade, provavelmente devido à morfologia em bastão da partícula, com estrutura interna hexagonal, maior diâmetro e volume do poro e pequena espessura da parede do poro. Nenhum sistema de liberação foi ativo sobre as formas promastigotas, indicando que o sistema parece não agir diretamente sobre o parasita. Não houve efeito citotóxico das sílicas impregnadas ou não impregnadas sobre células imortalizadas de mamíferos, mostrando a seletividade das amostras para os parasitos.

A produção de NO por macrófagos peritoneais infectados foi significativamente maior no tratamento com a maior concentração de todas os sistemas de liberação de antimoniato de meglumina, exceto para MSU-4 Sb. As sílicas não impregnadas também parecem ativar os macrófagos para produção de NO. Estes resultados sugerem a participação deste mecanismo leishmanicida na destruição intracelular dos parasitos.

Os resultados demonstram a otimização do efeito do antimoniato de meglumina quando impregnado às matrizes mesoporosas testadas, sugerindo a progressão para avaliação de resposta terapêutica *in vivo*, com possibilidade de redução da dose hoje recomendada e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais associados ao fármaco. O estudo aparenta-se promissor para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação para o tratamento das leishmanioses, em especial a LTA.

**Agradecimentos:** Agradecemos o suporte financeiro recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Protocolo 563977/2010-8), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT, Protocolo 23/200.137/2010), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Contribuição de autor:** C.C.P.A., T.F.M.C., M.F.C.M., R.T.P e M.C.T.K. elaboraram e conduziram os experimentos; A.M.H., N.V.B., A.R.N., C.I.N., e I. S. B. M. realizaram os experimentos; A.M.H. analisou os dados; N.V.B. e A.R.N. contribuíram com as análises; A.M.H. e C.C.P.A. escreveram o manuscrito.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os patrocinadores fundadores não tiveram papel no desenho do estudo; Na coleta, análise ou interpretação de dados; Na redação do manuscrito e na decisão de publicar os resultados.

## Abreviações

As seguintes abreviações foram usadas no manuscrito:

ANOVA  
BdB

Análise de Variância  
Broekhoff e Boer

BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barret, Joyner e Halenda
CI	Concentração Inibitória
Dp	Diametro de poro
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	Food and Drug Administration
ICP-OES	Espectrômetro de Emissão Ótica com Fonte de Plasma Acoplado Indutivamente
IS	Índice de Seletividade
MCM-41	Mobil Composition of Matter 41
MSU-3	Michigan State University 3
MSU-4	Michigan State University 4
NO	Óxido Nítrico
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
AS	Área Superficial
Sb	Antimônio
SBA-16	Santa Barbara Amorphous 16
Vp	Volume de poro

## Referências

1. Basano, S.A.; Camargo, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.* **2004**, *7*, 328-337.
2. Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*: 581-967.
3. Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* **2003**, *36*(1): 71-80.
4. Coelho, A.C.; Trinconi, C.T.; Costa, C.H.N.; Uliana, S.R.B. In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: Follow-Up. *PLoS Negl Trop Dis.* **2016**, *10*(7): e0004720
5. Duque, M.C.O.; Vasconcellos, E.C.F.; Pimentel, M.I.F.; Lyra, M.R.; Pacheco, S.J.B.; Marzochi, M.C.A.; Rosalino C.M.V.; Schubach, A.O. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2016**, *49*(6): 774-776.
6. Téllez, J.; Romero, I.; Soares, M.J.; Steindel, M.; Romanha, A.J. Knockdown of Host Antioxidant Defense Genes Enhances the Effect of Glucantime on Intracellular *Leishmania braziliensis* in Human Macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*: 2099-2116.
7. Oliveira, L.F.; Schubach, A.O.; Martins, M.M.; Passos, S.L.; Oliveira, R.V.; Marzochi, M.C.; Andrade, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica.* **2011**, *118*: 87-96.
8. Sundar, S.; More, D.K.; Singh, M.K.; Singh, V.P.; Sharma, S.; Makharia, A.; Kumar, P.C.; Murray, H.W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Indian J. Med. Res.* **2000**, *31*(4): 1104-1107.
9. Pham, T.T.; Loiseau, P.M.; Barrati, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*: 539-552.
10. Ballem, M.A.; Cordoba, J.M.; Odén, M. Influence of synthesis temperature on morphology of SBA-16 mesoporous materials with a three-dimensional pore system. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *129*: 106-111.
11. Charnay, C.; Begu, S.; Tourné-Péteilh, L.; Nicole, L.; Lerner, D.A.; Devoisselle, J.M. Inclusion of Ibuprofen in Mesoporous Templated Silica: Drug Loading and Release Property. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*(3): 533-540.
12. Lu, J.; Liong, M.; Zink, J.I. Tamanoi F. Mesoporous Silica Nanoparticles as a Delivery System for Hydrophobic Anticancer Drugs. *Small.* **2007**, *3*(8): 1341-1346.

13. Slowing, I.; Trewyn, B.G.; Giri, S.; Lin, V.S.Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*(8): 1225–1236.
14. Fagundes, L.B.; Sousa, T.G.F.; Sousa, A.; Silva, V.V.; Sousa, E.M.B. SBA-15-collagen Hybrid Material for Drug Delivery Applications. *J. Non. Cryst. Solids.* **2006**, *352*(32-35): 3496–3501.
15. Upegui, Y.; Gil, J.F.; Quiñones, W.; Torres, F.; Escobar, G.; Robledo, S.M.; Echeverri, F. Preparation of rotenone derivatives and in vitro analysis of their antimalarial, antileishmanial and selective cytotoxic activities. *Molecules.* **2014**, *19*: 18911-18922.
16. Morais-Teixeira, E.; Carvalho, A.S.; Costa, J.C.S.; Duarte, S.L.; Mendonça, J.S.; Boechat, N.; Rabello, A. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2008**, *103*(4): 358-362.
17. Alviano, D.S.; Barreto, A.L.S.; Dias, F.A.; Rodrigues, I.A.; Rosa, M.S.S.; Alviano, C.S.; Soares, R.M.A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*: 1–10.
18. Frézard, F.; Demicheli, C.; Ferreira, C.S.; Costa, M.A.P. Glutathione-Induced Conversion of Pentavalent Antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**, 913-916.
19. Miekeley, N.; Mortari, S.R.; Schubach, A.O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*: 495-502.
20. Demicheli, C.; Frézard, F.G.G. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.* **2005**, *6*: 24-30.
21. Martines, M.A.U.; Yeong, E.; Larbot, A. Prouzet E. Temperature dependence in the synthesis of hexagonal MSU-3 type mesoporous sílica synthesized with Pluronic P123 block copolymer. *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, *74*: 213-220.
22. Li, X.; Jasti, B.R. *Design of Controlled Release Drug Delivery Systems*. New York: MacGraw-Hill. **2006**, 435.
23. De Jong, W.H.; Borm, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* **2008**, *3*(2): 133-149.
24. Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D.E. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*(4): 249-255.
25. Witasp, E.; Kupferschmidt, N.; Bengtsson, L.; Hultenby, K.; Smedman, C.; Paulie, S.; Garcia-Bennett, A.E.; Fadeel, B. Efficient internalization of mesoporous silica particles of different sizes by primary human macrophages without impairment of macrophage clearance of apoptotic or antibody-opsonized target cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **2009**, *239*:306-319.
26. Gallud, A.; Bondarenko, O.; Feliu, N.; Kupferschmidt, N.; Atluri, R.; Garcia-Bennett, F. B. Macrophage activation status determines the internalization of mesoporous sílica particles of different sizes: Exploring the role of different pattern recognition receptors. *Biomater.* **2017**, *121*:28-40.
27. Carvalho, L.V.; Ruiz, Rde.C; Scaramuzzi K; Marengo, E.B; Matos, J.R; Tambourgi, D.V; Fantini, M.C; Sant'Anna, O.A. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine.* **2010**, *28*(50):7829-7836
28. Meynen, V.; Cool, P.; Vansant, E.F. Verified syntheses of mesoporous materials. *Microporous Mesoporous Mater.* **2009**, *125*: 170-223.
29. Vermeersch, M.; Luz, R.I.; Tote', K.; Timmermans, J-P.; Cos, P.; Maes, L. In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*(9): 3855–3859.
30. Duarte, M.C.; Lage, D. P.; Mesquita, J.T.; Salles, B.C.S.; Lavorato, S.N.; Souza, D.M.; Roatt, B.M;Alves, R.J.; Tavares, C.A.P.; Tempone, A.G.; Coelho, E.A.F. An effective *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* **2016**, *217* :81–88.
31. Valadares, D.G.; Duarte, M.C.; Oliveira, J.S.; Chavez-Fumagalli, M.A.; Martins, V.T.; Costa, L.E.; Leite, J.P.; Santoro, M.M.; Régis, W.C.; Tavares, C.A.; Coelho, E.A. Leishmanicidal activity of the *Agarius blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol. Int.* **2011**, *60*: 357-363.
32. Braga, F.G.; Bouzada, M.L.; Fabri, R.L.; de O Matos, M.; Moreira, F.O.; Scio, E.; Coimbra, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*: 396-402.

33. Nguewa, P.A.; Fuertes, M.A.; Cepeda, V.; Iborra, S.; Carrión, J.; Valladares, B.; Alonso, C.; Pérez, J.M. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. *Chem. Biodivers.* **2005**, 210: 1387-1400.
34. Heikkilä, T.; Santos, H.A.; Kumar, N.; Murzin, D.Y.; Salonen, J.; Laaksonen, T.; Peltonen, L.; Hirvonen, J.; Lehto, V-P. Cytotoxicity study of ordered mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 microparticles on Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, 74(3): 483-494.
35. Cardoso, T.F.M. *Impregnação do antimoniato de meglumina em partículas de sílica mesoporosa visando a liberação modificada do fármaco*. 2016, 1-150. (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, **2016**.
36. Mesa, M.; Sierra, L.; Patarin, J.; Guth, J.L. Morphology and porosity characteristics control of SBA-16 mesoporous silica. Effect of the triblock surfactante Pluronic F127 degradation during the synthesis. *Solid State Sciences.* **2005**, 7: 990-997.
37. Chen, H.; He, J. Fine control over the morphology and structure of mesoporous silica nanomaterials by a dual-templating approach. *Chemical Communications.* **2008**, 37: 4422-4424.
38. Saliba, L.F. *Interação do complexo luminescente [Eu(tta)<sub>3</sub>] com sílica mesoporosa*. **2009**, 47. (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Faculdade de Engenharia- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, SP, 2009.
39. Farmacopeia brasileira. 5 ed., vol 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **2010**, 808.
40. Jia, L.; Shena, J.; Li, Z.; Zhanga, D.; Zhang, Q.; Liua, G.; Zhenga, D.; Tiana, X. *In vitro* and *in vivo* evaluation of paclitaxel-loaded mesoporous sílica nanoparticles with three pore sizes. *Int. J. Pharm.* **2013**, 445, 12-19.
41. Thomas, M. J. K.; Slipper, I.; Walunj, A.; Favretto, M. E.; Kallinteri, P.; Douroumis, D. Inclusion of poorly soluble drugs in highly ordered mesoporous sílica nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2010**, 387, 272-277.
42. Yu, H.; Zhai, Q. Mesoporous sba-15 molecular sieve as a carrier for controlled release of nimodipine. *Microporous and mesoporous mater.* **2009**, 123, 298-305.
43. Rizk, Y.S.; Fischer, A.; Cunha, M.C.; Rodrigues, P.O.; Marques, M.C.S.; Matos, M.F.C.; Kadri, M.C.T.; Carollo, C.A.; Arruda, C.C.P. In vitro activity of the hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from *Selaginella sellowii* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2014**, 109, 1050-1056.
44. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* **1990**, 82(13): 1107-1112.
45. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Pau, K.; Vistica, D.; Curtis, H.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83(11): 757-766.
46. Medeiros, M.G.F.; Silva, A.C.; Citó, A.M.; Borges, A.R.; Lima, S.G.; Lopes, J.A.; Figueiredo, R.C. Atividade antileishmanial *in vitro* e citotoxicidade do óleo essencial de *Lippiasidoides Cham.* *Parasitol Int.* **2011**, 60: 237-241.
47. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, 126(1): 131-138.