

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO

**MICRO/NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E
BIODEGRADÁVEIS DE MESOCARPO DE
BABAÇU:
AÇÃO IMUNOMODULADORA NA
POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS E EFEITO
ANTI-*LEISHMANIA***

MAYARA CRISTINA PINTO DA SILVA

São Luís, MA
2017

MAYARA CRISTINA PINTO DA SILVA

**MICRO/NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E
BIODEGRADÁVEIS DE MESOCARPO DE
BABAÇU:
AÇÃO IMUNOMODULADORA NA
POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS E EFEITO
ANTI-*LEISHMANIA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís, MA
2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva, Mayara Cristina Pinto da.

MICRO/NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E BIODEGRADÁVEIS DE MESOCARPO DE BABAÇU : AÇÃO IMUNOMODULADORA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS E EFEITO ANTI-LEISHMANIA / Mayara Cristina Pinto da Silva. - 2017.

89 f.

Orientador(a): Rosane Nassar Meireles Guerra.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2017.

1. Attalea speciosa. 2. Leishmania amazonensis. 3. Macrófagos M1. 4. Mesocarpo de Babaçu. 5. Micro/Nanopartículas de PLGA. I. Guerra, Rosane Nassar Meireles. II. Título.

MAYARA CRISTINA PINTO DA SILVA

**MICRO/NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E BIODEGRADÁVEIS DE
MESOCARPO DE BABAÇU:
AÇÃO IMUNOMODULADORA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS E EFEITO
ANTI-*LEISHMANIA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rosane Nassar Meireles Guerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador
Instituição do Examinador

2º Examinador
Instituição do Examinador

3º Examinador
Universidade Federal do Maranhão

4º Examinador
Universidade Federal do Maranhão

“Com o tempo a gente aprende que amadurecer é uma delícia; aguça os gostos, valoriza os abraços, seleciona as pessoas, inverte as prioridades e percebe que, apesar do tempo que se fez, a vida só está começando.”

Frederico Elboni

*Dedico este trabalho aos meus pais
Mary e Samoel e ao meu esposo Diego,
pessoas muito queridas e especiais, são
amigos verdadeiros, amores da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho:

A Deus esse ser que rege nossas vidas e é luz para iluminar nosso caminho, agradeço imensamente todo discernimento, paciência e bênçãos a mim concedidas.

À Profa. Rosane Guerra, minha querida orientadora, me acompanha desde a iniciação científica, alguém que tenho muita gratidão por todos esses anos de orientação, paciência, dedicação e carinho, além de confiar em meu potencial e estimular para melhorar cada vez mais...por sempre sonhar sonhos maiores, muito obrigada por tudo.

Aos meus pais, Mary Jane e Samoel pela excelente formação que me deram, pela paciência e compreensão nos momentos em que estive ausente, e ou ocupada com o desenvolvimento deste trabalho, além do amor e carinho que sempre dedicaram a mim.

Ao meu marido, Jeyffhyshon Diego, sempre presente, companheiro de todas as horas, amoroso, paciente e compreensivo nos momentos em que estive ausente, sempre me apoiando e orgulhoso por minhas conquistas.

Aos meus irmãos, Ulisses Diego, Samoel Jr. e Walber, por seu companheirismo e torcida para que tudo desse certo.

A toda minha família em especial minha avó Luzia, e tias, Jane Mary, Emília, Cristiane, Lisiane e Nelma que sempre me apóiam e me estimulam a buscar mais e mais...

À família LIF, por todo apoio e carinho, tenho muito orgulho de fazer parte desta família.

À galera do rolezinho (Douglas, André, Lillian, Liana, Jefferson, Patrícia e Kelly), à Aluízio e Elisângela pessoas muito queridas, que me ensinaram muito e sempre estavam dispostos a ajudar e a aprender também.

À Profa. Flávia Raquel, agradeço suas orientações e sugestões em todos os trabalhos desenvolvidos por mim, além da companhia, carinho e confiança.

À todos da “Diretoria” (Lucilene, Ana Paula, Thiare, Márcia, Paulo Vítor, Wanderson, Bruno, Aramys e Eder) pelo apoio, carinho e paciência, muito obrigada por tudo.

À Thiare Fortes pela sua amizade e companheirismo, muito obrigada pelas palavras de conforto e de estímulo.

À D. Joana, a mãezona do LIF, e a Carlene (pequena grande mulher) sempre presentes com jeitinho carinhoso, sempre solícitas, sempre atenciosas, obrigada por tudo.

À Luecy Alves de Carvalho que mesmo morando em outra cidade sempre estava presente e sempre disposta a ajudar.

Aos membros da banca de qualificação aos doutores Marcos Augusto Grisotto, Lucilene Amorim Silva, Paulo Vítor Soeiro e Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, pelas críticas e sugestões a este trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) pelos ensinamentos.

A todos os colegas doutorandos do PPGCS pelo companheirismo e agradável convívio durante este curso.

Às funcionárias Ana Lúcia e Fátima pela atenção, disponibilidade e carinho, sempre atendendo as minhas solicitações, muito obrigada.

Ao laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, Fiocruz – Rondônia, em especial ao Professor Nicolete e suas alunas Amália Melo, Sharon Aragão e Neuza que sempre que necessário prestaram apoio e auxílio para o desenvolvimento deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq, FAPEMA e CAPES, pelo apoio financeiro na realização do presente trabalho.

Os resultados aqui apresentados foram obtidos, na sua maioria, no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, contando com o apoio de outras instituições como o laboratório de Biotecnologia aplicada a Saúde da Fiocruz – Rondônia e na Fundação Oswaldo Cruz do Ceará

SUMÁRIO

	Pág
Lista de tabelas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xiii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
 1 INTRODUÇÃO.....	 16
 2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	 17
2.1 Leishmanioses.....	17
2.1.1 Sistema imune nas leishmanioses.....	18
2.1.2 Tratamento das leishmanioses	21
2.2 O Babaçu.....	25
2.2.1 Propriedades biológicas do mesocarpo de babaçu.....	27
2.3 Sistemas de liberação de fármacos.....	28
 3 OBJETIVOS.....	 35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
 4 MATERIAL E MÉTODOS.....	 36
4.1 Animais.....	36
4.2 Obtenção do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu.....	36
4.3 Preparo das micropartículas de PLGA contendo mesocarpo (MMP) de babaçu e micropartículas controle (CMP).....	36
4.4 Caracterização das micropartículas.....	37
4.4.1 Ensaio de espectrofotometria UV-Vis.....	38
4.4.2 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE%) do mesocarpo de babaçu.....	38
4.5 Fagocitose das micropartículas investigadas por macrófagos peritoneais	38

murinos.....	
4.5.1 <i>Obtenção de macrófagos peritoneais murinos.....</i>	38
4.5.2 <i>Ensaio de fagocitose.....</i>	39
4.5.3 <i>Avaliação da produção de Peróxido de Hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com CMP, MMP ou mesocarpo de babaçu.....</i>	40
4.5.4 <i>Viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com MMP ou CMP.....</i>	40
4.6 Atividade leishmanicida das micropartículas de babaçu sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>.....	41
4.6.1 <i>Parasitas.....</i>	41
4.6.2 <i>Análise de interação molecular via ressonância plasmônica de superfície – SPR.....</i>	41
4.6.3 <i>Avaliação da atividade das micropartículas de babaçu, ou partículas controle e do extrato bruto de babaçu sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>.....</i>	42
4.6.4 <i>Efeitos das micropartículas de babaçu (MMP) ou micropartículas controle (CMP), ou extrato de mesocarpo de babaçu livre sobre macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>Leishmaniose amazonensis</i>.....</i>	42
4.7 Produção de NO.....	43
4.8 Produção de citocinas no sobrenadante das cultura de macrófagos	43
4.9 Análise estatística dos dados.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Caracterização físico-química das micropartículas.....	44
5.1.1 <i>Aspecto microscópico das micropartículas.....</i>	45
5.1.2 <i>O mesocarpo de babaçu apresenta Interação Plasmônica (IP) com antígenos de <i>Leishmania amazonensis</i> e foi encapsulado nas micropartículas.....</i>	46
5.1.3 <i>As micropartículas de babaçu são melhor fagocitadas por macrófagos in vitro após 24 h de incubação e apresentam menor toxicidade do que o extrato</i>	48

<i>livre.....</i>	
5.1.4 <i>Micropartículas de babaçu apresentam ação imunomoduladora na polarização de macrófagos peritoneais normais.....</i>	50
5.2 Micropartículas de babaçu tem ação anti-<i>Leishmania amazonensis</i> <i>in vitro</i>.....	51
1 <i>Ação das micropartículas de babaçu sobre as formas promastigotas..</i>	51
5.2.2 <i>Atividade anti-Leishmania das micropartículas de babaçu sobre as formas amastigotas.....</i>	52
5.2.3 <i>Efeito imunomodulador das micropartículas de babaçu sobre a polarização de macrófagos infectados in vitro com L. amazonensis.....</i>	54
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	73
Anexo A- Artigo publicado.....	73
Anexo B- Normas da revista.....	84

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1 Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistemas de liberação de fármacos.....	30
Tabela 2 Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de sistemas de liberação de fármacos.....	31
Tabela 3 Diâmetro e potencial Zeta das micropartículas de PLGA contendo óleo, ou mesocarpo de babaçu associado ou não a cumarina.....	44
Tabela 4 Concentração inibitória mínima de micropartículas contendo mesocarpo de babaçu em comparação ao extrato em solução e as micropartículas vazias sobre as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Distribuição mundial dos números de casos de Leishmaniose cutânea.....	18
Figura 2 Transporte, biossíntese, interconversão e utilização de poliaminas na <i>Leishmania</i> sp.....	24
Figura 3 Área de ocorrência de babaquais no Maranhão. Extração Vegetal e Silvicultura. A Palmeira de babaçu- <i>Attalea speciosa</i> Mart ex. Spreng, Cacho com os frutos , corte transversal e longitudinal dos frutos, com detalhe para amêndoa, epicarpo, mesocarpo e endocarpo	26
Figura 4 Estruturas moleculares de L-PLA (ácido láctico levógeno); D-PLA (ácido láctico dextrógeno); PGA (ácido glicólico) e PLGA (x= número de unidades de ácido láctico	32
Figura 5 Representação esquemática de micropartículas.....	33
Figura 6 Escape endolisossomal de micropartículas.....	34
Figura 7 Avaliação microscópica das micropartículas.....	45
Figura 8 Interação Plasmônica do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu e da Pentamidina com antígenos de <i>Leishmania amazonensis</i> . Espectros no Ultravioleta e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier de micropartículas de babaçu	47
Figura 9 Fagocitose de micropartículas de babaçu por macrófagos peritoneais e citotoxicidade das micropartículas	49
Figura 10 Produção de H ₂ O ₂ , TNF- α , IL-6 e IL-10 (D) por macrófagos peritoneais incubados ou não com micropartículas.....	50
Figura 11 Ação de micropartículas de mesocarpo de babaçu em macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	53
Figura 12 Produção de citocinas e liberação de óxido nítrico (NO) em culturas de macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdoMetDC-	S-adenosilmetionina descarboxilase
ARG -	Arginase
C3b -	Fração 3b do sistema complemento
C5 -	Fração 5 do sistema complemento
C9 -	Fração 9 do sistema complemento
CL -	Leishmaniose cutânea
CMP -	Micropartículas controle
dAdoMet -	S-adenosilmetionina descarboxilada
EDX-	Espectrômetro de energia dispersiva de raios X
EGCG -	Epigallocatequina
EMBRAPA -	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
FTIR-	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier
GP63 -	Glicoproteína de superfície da <i>Leishmania</i> sp.
GR -	Glutathione redutase
GSH -	Glutathione
IBGE -	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IgG2a -	Imunoglobulina G2a
IL -	Interleucina
IFN- γ -	Interferon gama
LPG -	Lipofosfoglicano
LTA -	Leishmaniose tegumentar americana
MCL -	Leishmaniose mucocutânea
MEV-	Microscopia eletrônica de varredura
MHC II -	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP -	Micropartículas contendo mesocarpo de babaçu
NO -	Óxido nítrico
ODC -	Ornitina descarboxilase
PA -	Poliamina
PAO -	Poliamina oxidase
PLGA -	Poli (lático-co-ácido glicólico)
POT1 -	Transportador de poliaminas
SB ⁵⁺ -	Antimônio pentavalente
SLF	Sistemas de liberação de fármacos
SpdS -	Espermidina sintase
TGF- β -	Fator de transformação do crescimento beta
Th1 -	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
TNF- α -	Fator de necrose tumoral alfa
TryR -	Tripanotona redutase
TryS -	Tripanotona sintetase
UV-	Ultravioleta
Vis-	Visível
VL -	Leishmaniose visceral

RESUMO

MICROPARTÍCULAS DE BABAÇU: AÇÃO IMUNOMODULADORA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS E SEU EFEITO ANTI-*LEISHMANIA*

A bioprospecção de produtos com potencial terapêutico no tratamento da leishmaniose tem despertado crescente interesse, pois as drogas atualmente utilizadas apresentam elevada toxicidade e, muitas vezes, os protozoários são resistentes, sobretudo nos tratamentos prolongados. Na perspectiva de desenvolver uma nova formulação com ação anti-*Leishmania* avaliou-se a atividade do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (*Attalea speciosa* Mart) encapsulado em micropartículas biodegradáveis de PLGA [poly(lactic-co-glycolic acid)]. Inicialmente, foi realizado o estudo morfométrico e funcional das micropartículas. Em seguida foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* por ação sobre as formas promastigotas, comparando os efeitos das micropartículas de PLGA carregadas com extrato do mesocarpo de babaçu (MMP) com o extrato livre (Meso) e com micropartículas sem o mesocarpo, utilizadas como controle negativo (CMP). Também avaliamos os efeitos de MMP em culturas de macrófagos peritoneais, de camundongos Balb/c, infectados ou não com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os seguintes parâmetros foram investigados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos: quantificação das citocinas IL-10, IL-6 e TNF- α por ELISA, detecção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e atividade da arginase. Foi determinada a taxa de infecção e o percentual de células infectadas. O mesocarpo de babaçu apresentou forte interação com antígenos de *L. amazonensis*. A caracterização das micropartículas mostrou que as MMP apresentaram diâmetro e potencial zeta compatíveis com as micropartículas controle (CMP) e a eficiência de encapsulamento do extrato foi de 45%. As MMPs foram mais ativamente fagocitadas do que o extrato de babaçu livre, ocasionando aumento de 25% no índice fagocítico, após 24 horas de incubação. Além de baixa toxicidade para macrófagos peritoneais, o encapsulamento do mesocarpo de babaçu potencializou em quase 10 vezes a ação anti-*Leishmania* para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, quando comparado ao extrato livre. O tratamento com MMP reduziu o número de amastigotas e a taxa de infecção de macrófagos peritoneais, possivelmente por seu efeito imunomodulador na polarização de macrófagos para o fenótipo M1, resultando no aumento de TNF- α e óxido nítrico e na inibição da produção de IL-10. Concluímos que o microencapsulamento do mesocarpo de babaçu melhorou a ação anti-*Leishmania* do extrato, mas manteve o seu efeito imunomodulador o que contribuiu para o melhor efeito tanto sobre os protozoários como para as células infectadas, evitando a morte das células por necrose ou apoptose. Os dados em conjunto indicam que as micropartículas MMP podem ser fortes candidatas ao desenvolvimento de novos produtos, devido aos seus efeitos imunomoduladores na polarização de macrófagos infectados com *L. amazonensis* para um perfil M1 e, adicionalmente, estimulam novos estudos quanto aos seus efeitos sobre células humanas *in vitro* e em modelo animal da leishmaniose *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Mesocarpo de babaçu, *Attalea speciosa*, Micro/Nanopartículas de PLGA, *Leishmania amazonensis*, TNF- α , macrófagos M1.

ABSTRACT

THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF BABASSU - LOADED MICROPARTICLES PROMOTES MACROPHAGE POLARIZATION AND ANTI-*LEISHMANIA* ACTIVITY

There is an increasing interest to find new products with therapeutic potential to the treatment of leishmaniasis, due the high toxicity and resistance of the majority of available treatments. Our aim was to formulate, characterise and evaluate the anti-*Leishmania amazonensis* activity of babassu loaded *poly(lactic-co-glycolic acid)* – PLGA microparticles. The PLGA microparticles were loaded with the aqueous extract of babassu mesocarp (MMP) and evaluated for size, zeta potential, drug content, encapsulation efficiency in comparison to unloaded microparticles (CMP). The anti-*Leishmania* effect was evaluated to promastigotes forms or to amastigotes in Balb/c macrophage cells infected with *Leishmania amazonensis*. Following macrophage treatment with MMP the percent of infected cells was determined by Giemsa staining and compared with cells treated with CMP or with free babassu extract (MESO). To find the potential mechanisms of the activity of MMPs, TNF- α , IL-6, IL-10, hydrogen peroxide, arginase and accumulated nitrite in the culture supernatants of the treated and untreated cells were also measured by ELISA, and by colorimetric assays, respectively. The size range of the microparticles was between 3 and 6,4 μm with an average zeta potential of -25 mV and encapsulation efficiency of 45%. The anti-*Leishmania* activity of babassu-loaded microparticles was 10-fold higher than MESO. MMP showed an overall bioavailability and hence were more effective in eliminating intracellular parasites than the other formulations. Babassu microparticles also reduced the *ex vivo* parasite infectivity and this effect seems to be directly related to a polarization of macrophages to the M1 phenotype with an increased production of nitric oxide, hydrogen peroxide and TNF- α . Interestingly, this overexpression of TNF- α didn't impair cell viability, suggesting the anti-apoptotic effects of the MMP in infected macrophages. These findings indicate that babassu load microparticles may be useful for targeting for new drugs, due to the immunomodulatory effects of polarization to M1 macrophages, infected with *L. amazonensis*, and further provide motivations for future studies on human cells *in vitro* and in animal models of leishmaniasis *in vivo*.

Key words: Babassu Mesocarp, *Attalea speciosa*, PLGA microparticles, *Leishmania amazonensis*; TNF- α ; M1 macrophages.

1 INTRODUÇÃO

No Laboratório de Imunofisiologia-UFMA desenvolvemos várias linhas de pesquisa pré-clínica e clínica, sendo a principal linha na área de produtos naturais. Uma das espécies vegetais mais estudada é *Attalea speciosa*, conhecida popularmente como babaçu, resultando em um grande número de publicações.

Durante a iniciação científica avaliamos a atividade adjuvante do óleo de babaçu no sistema imune, e quando ingressei no mestrado demos continuidade ao estudo da avaliação da atividade adjuvante comparando o óleo de babaçu com o mesocarpo e com outros adjuvantes vacinais já padronizados. Ao longo desses anos vimos a necessidade do aprimoramento profissional, associado à inovação tecnológica, para obter dados experimentais que pudessem mais rapidamente chegar a aplicação clínica. Devido as diversas propriedades dos produtos obtidos do babaçu (mesocarpo e o óleo), investigamos uma formulação que possibilitaria maximizar as vantagens inerentes aos seus bioprodutos desta espécie vegetal.

Dessa forma, pensamos nos sistemas de liberação controlada com o objetivo de melhorar a segurança e eficácia das formulações contendo babaçu. Tendo em vista a necessidade pela busca de novos compostos que apresentem baixa toxicidade e melhor eficiência no tratamento da leishmaniose tegumentar americana, tanto na composição da medicação quanto na formulação farmacêutica como são apresentados e utilizados.

As micropartículas constituídas de PLGA [*poly(lactic-co-glycolic acid)*], Sistema de liberação sustentada e lenta carregadas com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu mostram-se promissoras para serem utilizadas no tratamento da leishmaniose tegumentar americana, pois além da ação imunomoduladora, apresentaram também ação anti-*Leishmania* conforme resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho foram submetidos à revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC) qualis A1, medicina I.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmanioses

As leishmanioses estão incluídas no grupo de doenças consideradas como negligenciadas. São doenças endêmicas que afetam principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, incluindo o Brasil. A leishmaniose visceral está associada à desnutrição, ao deslocamento das populações, às condições inadequadas e insalubres de moradia, à falta de recursos e à deficiências do sistema imunológico do hospedeiro. As leishmanioses são doença tropicais e juntas, contituem a segunda doença parasitária mais prevalente, por isso faz parte da lista das doenças mais importantes, segundo a Organização Mundial de Saúde - Pesquisa de Doenças Tropicais (WHO 2015).

As leishmanioses foram classificadas em três formas principais, com base nos sintomas clínicos: leishmaniose visceral (VL), que é a mais letal, quando não tratada; a leishmaniose cutânea (CL) e a mucocutânea (MCL). As duas últimas, embora não sejam fatais, resultam em graves problemas de saúde, devido as diversas comorbidades associadas (PETERS et al., 1983; PEARSON ; SOUSA, 1996).

No Brasil a forma mais comum é a leishmaniose cutânea, também conhecida como tegumentar americana (LTA), que se caracteriza pela presença de lesões de pele, cartilagem e mucosas do trato respiratório superior. Essa infecção é causada por várias espécies de *Leishmania*, tais como: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. peruviana* (PETERS et al., 1983; LAINSON 1997; ALEXANDER et al 1999).

Nos últimos anos, ocorreu aumento do número de casos e ampliação da ocorrência geográfica da LTA no país, pois já foram diagnosticados casos em todos os estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos (NEGRÃO; FERREIRA, 2013). No Brasil, esta infecção tem sido diagnosticada em todos os estados, com a rápida expansão e adaptação do protozoário e seus vetores aos ambientes antropologicamente modificados (SINAN/SVS/MS 2014); talvez por isso o Brasil está entre os cinco países mais afetados por esta forma clínica, como pode ser observado na Figura 1.

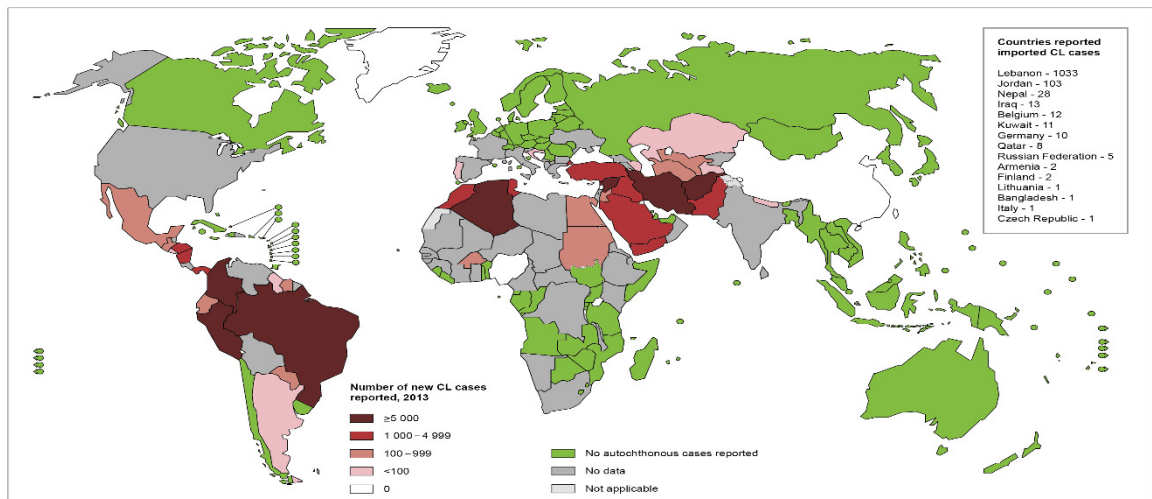


Figura 1: Distribuição mundial dos números de casos de leishmaniose cutânea (WHO, 2015).

Os protozoários do gênero *Leishmania* têm ciclo de vida digenético, pois vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, especialmente flebotomíneos (família Psychodidae, subfamília Phlebotominae) (KAYE; SCOTT, 2011, READY, 2013). Por isso, a leishmaniose foi caracterizada primariamente como doença zoonótica e o homem só foi envolvido secundariamente e de modo acidental (FUNASA, 2001; REY, 2011).

2.1.1 Sistema imune nas leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas principais: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas do parasito) são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do inseto. A resposta eficaz durante a infecção engloba diversos fatores que incluem desde a espécie de *Leishmania* até o estado imunológico do hospedeiro, no momento em que ocorre a infecção. As diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas ao homem através da picada das fêmeas de insetos vetores, hematófagos, flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (BASANO; CAMARGO, 2004).

Os protozoários do gênero *Leishmania* tem tropismo principalmente por macrófagos, células que são cruciais na defesa do organismo, durante o curso da

infecção. É dentro dos macrófagos que as várias espécies de *Leishmania* mudam da forma promastigota para amastigota e se reproduzem para manter seu ciclo de vida no hospedeiro definitivo (ALEXANDER, RUSSEL, 1992; BRASIL, 2014).

Os macrófagos infectados são ingeridos por fêmeas dos feblotomíneos, durante o seu repasto sanguíneo, e no intestino desses vetores as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas, não infectivas e, posteriormente, em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a porção anterior do intestino do vetor, para serem inoculadas na derme do hospedeiro mamífero pela picada do inseto, para fechar o ciclo. (HANDMAN, 2002). As formas promastigotas se ligam a diversos receptores dos macrófagos, sendo fagocitadas e encapsuladas no vacúolo parasitóforo que se funde com os lisossomos formando o fagolisossoma, e inibindo as enzimas lisossomais e a capacidade microbicida desta organela. No fagolisossoma as formas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, formas intracelulares obrigatórias e adaptadas à temperatura corporal dos mamíferos e ao meio ácido dos fagolisossomos (BRODSKYN et al., 2003). As amastigotas se multiplicam de forma assexuada, por fissão binária (MCCONVILLE; HANDMAN, 2007) e são liberadas dos macrófagos por um mecanismo ainda não totalmente caracterizado, que pode incluir necrose ou apoptose. Os protozoários livres podem invadir células dendríticas, fibroblastos e novos macrófagos (HANDMAN E BULLEN, 2002; HORIKAWA; PEÑA, 2011).

Após a inoculação de algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas (geralmente de 100 a 1000 parasitos, por picada) na derme do hospedeiro vertebrado, (ROBERTS, 2005), a maioria dos protozoários é eliminada por mecanismos inatos de reatividade, decorrente da ativação do sistema complemento, e/ou liberação de produtos citotóxicos por células NK, eosinófilos e neutrófilos. No entanto, o controle da infecção depende, basicamente, da montagem de uma resposta celular do tipo Th1 e ativação de macrófagos M1, que se inicia logo após a infecção dos macrófagos presentes no sítio da infecção (REY, 2011). Nas horas subsequentes à infecção, ocorre acúmulo de células linfocitárias no local da picada do vetor, visando eliminar o dano tecidual resultante da infecção (SOLBACH; LASKAY, 1996).

Como em todo processo de reparação, as células chegam ao local da infecção por quimiotaxia, decorrente do aumento da produção de quimiocinas pelos macrófagos infectados. Em seguida, ocorre a infiltração de monócitos, eosinófilos e,

posteriormente, de linfócitos T ativados com o objetivo de conter a infecção e eliminar o parasito (ROSSI; ZLOTNIK, 2000).

Nos macrófagos a fagocitose dos protozoários ativa os mecanismos microbicidas para eliminar os parasitos (HANDMAN; BULLEN, 2002). A atividade microbicida dos macrófagos é resultante de vários processos celulares, incluindo aumento na produção de enzimas fagolisossomais (ex. proteases, nucleases, lipases entre outras) e geração de estresse oxidativo, com aumento da produção de óxido nítrico (NO) (ASSCHE et al., 2011). Adicionalmente, a diferenciação dos macrófagos em células M1 ou M2, pode afetar a resposta do hospedeiro, com consequente efeito na resposta de linfócitos T e na evolução da doença (MUKHOPADHYAY et al., 2015).

Os macrófagos são classificados como células M1, quando secretam citocinas Th1 (TNF- α , IL-12 e IFN- γ) ou M2 quando produzem citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) e são denominados macrófagos ativados alternativamente (VERRECK et al., 2004; MUKHOPADHYAY et al 2015). A ativação de macrófagos M1 está mais frequentemente associada a resistência, pois essas células são boas efectoras na eliminação de patógenos intracelulares (GORDON 2003; MANTOVANI et al, 2005). Por outro lado, macrófagos M2 têm sido relacionados ao agravamento da infecção por *Leishmania*, pois permitem a propagação em seu interior dos protozoários intracelulares (FARROW et al 2011).

No interior dos macrófagos as formas promastigotas da *Leishmania* podem criar um ambiente propício para a sua sobrevivência, silenciando os macrófagos ao retardar a maturação do fagossomo e a fusão com o endossomo (DESCOTEAUX, TURCO, 1999). Podem também inibir a produção de enzimas hidrolíticas em fagolisossomos (EL-ON; BRADLEY; FREEMAN, 1980), ou evitar a formação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, suprimindo a apresentação de antígenos e suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (KAYE; SCOTT, 2011).

Os macrófagos infectados podem sofrer apoptose ou necrose, liberando formas amastigotas que podem infectar novas células (BARCINSKI; DOS REIS, 1999; COSTA et al 2009), pois protozoários do gênero *Leishmania* exploram a apoptose como forma de reduzir a resposta inflamatória dos macrófagos, para permitir uma maior proliferação do parasito no seu hospedeiro (SHAHA, 2006). As formas promastigotas induzem apoptose ao aumentar a síntese de TGF- β e suprimir a síntese

de NO, inibindo a atividade inflamatória dos macrófagos M1 o que culmina na sobrevivência dos parasitos não apoptóticos (WANDERLEY; BARCINSKY, 2010; MUKHOPADHYAY et al 2015).

Outros mecanismos de escape já foram descritos durante a infecção por *Leishmania* sp. Por exemplo:

- O lipofosfoglicano (LPG) é o glicoconjugado mais abundante presente na superfície dos promastigotas procíclicos e metacíclicos de *Leishmania* spp. Nas formas metacíclicas a estrutura da LPG impede o acesso e a inserção do complexo C5b-9 na membrana, protegendo-as da lise pelo sistema complemento (McCONVILLE et al., 1992; BRITTINGHAM; MOSSER, 1996).

- A gp63, outra molécula de superfície do parasito, é capaz de inativar C3b (RUSSEL, WILHELM 1986; NUNES *et al*, 1997).

- A fusão de vesículas lisossomais com o fagossomo tornam o pH do vacúolo parasitóforo ácido, o que é necessário para a ação das enzimas lisossomais. No entanto, a presença de gp63 e LPG nas formas amastigotas protegem os protozoários dessa ação.

- As amastigotas impedem ainda a ativação dos macrófagos M1, pelo estímulo a síntese de citocinas regulatórias (Treg), como IL-10 e TGF- β (SOLBACH; LASKAY 1996, MUKHOPADHYAY et al 2015).

Um outro mecanismo de escape inclui a inibição da produção de óxido nítrico (NO), o que evita a morte do parasito e o controle da infecção pelos macrófagos (LINARES et al., 2000). Segundo Romão et al, 1999, a glutathione presente na membrana de *Leishmania*, confere, a esses protozoários, proteção da ação do óxido nítrico. Além disso, amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de internalizar e degradar moléculas de MHC II que seriam expressas na superfície da célula hospedeira (DE SOUZA et al, 1995).

2.1.2 Tratamento das Leishmanioses

Os medicamentos de escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose têm sido, há mais de 60 anos, os antimonialis pentavalentes. O primeiro derivado de antimônio foi um sal de antimônio trivalente, conhecido como tártaro

emético. Alguns anos depois, na Itália, este composto foi utilizado no tratamento da forma visceral da doença, conhecida como calazar. Devido à toxicidade elevada e os graves efeitos colaterais associados ao seu uso, os antimonias trivalentes foram logo substituídos por formulações contendo antimônio pentavalente (Sb^{5+}), que passaram a ser considerados a primeira grande inovação no tratamento das leishmanioses.

Alguns países utilizam o estibogluconato de sódio (Pentostam®), enquanto em outros o composto comercializado é antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). (WOLDAY et al., 2001; MURRAY, 2001).

Com relação ao mecanismo de ação, foi proposto que esses quimioterápicos tem ação direta sobre o protozoário, pois induzem o efluxo de glutathione (GSH) e tripanotiona (T[SH]_2) e a inibição da atividade da enzima tripanotiona redutase (TryR) (WYLLIE et al., 2004). Embora os antimonias pentavalentes, como o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, continuem sendo as principais drogas utilizadas, tem sido descrita, com frequência cada vez maior, a existência de cepas de *Leishmania* resistentes a esses tratamentos, bem como casos de pacientes refratários ao tratamento (RODRIGUES et al., 2006; ROJAS et al., 2006).

A pentamidina é uma diamina aromática que tem exibido alta eficácia como fármaco de segunda linha em pacientes não responsivos à terapia com os antimonias. (CORREIA, et al., 1996; BRYNCESON, 2001;). Como esse medicamento é administrado por via intravenosa ou por via intramuscular profunda, apresenta vários efeitos indesejáveis, sendo os mais comuns dor e abscessos estéreis no local de aplicação, náuseas, vômitos, dores musculoesqueléticas, cefaleia, hipotensão, lipotimia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Há relatos também de cardiotoxicidade grave, porém o efeito tóxico mais importante associado à pentamidina é o desenvolvimento de diabetes insulino dependente, que pode se manifestar a partir da administração total de 1g. Devido aos graves efeitos colaterais muitos pacientes acabam por suspender ou abandonar o tratamento, ocasionando a possibilidade de recidivas e a manutenção do elevado número de casos (BRASIL, 2014; SUNDAR, 2011).

O uso de miltefosina oral, anfotericina B lipossomal e paromomicina ocorreu nos últimos anos, visando reduzir a elevada toxicidade dos fármacos utilizados anteriormente, porém muitos dos efeitos colaterais persistem, ainda que em menor proporção. Adicionalmente, há o alto custo e a necessidade de uso prolongado que

dificultam sua utilização e adesão ao tratamento (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). A esses medicamentos, da mesma forma que os demais, estão associados inúmeros casos de resistência, tornando a terapia leishmanicida ainda mais complexa (VAN GRIENSVEN *et al.*, 2010). Dessa forma, a alta toxicidade das drogas existentes e a resistência desenvolvida por algumas cepas de parasitos a esses produtos, serve de estímulo a busca de novos agentes terapêuticos.

Um potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas é a via de transporte e biossíntese de poliaminas-PAs (putrescina, espermidina e espermina), enzimas que participam dessas vias são consideradas importantes alvos terapêuticos contra a leishmaniose (HEBY *et al.*, 2007). Uma vez que, diferenças entre as vias metabólicas do parasito e do hospedeiro podem ser consideradas alvos potenciais na interferência do processo proliferativo do parasito (REGUERA, *et al.* 2005).

As PAs têm um papel central na proliferação, diferenciação, e mecanismos antioxidantes do protozoário, pois são metabólitos essenciais em células eucariotas, que participam dos mecanismos de proliferação celular. Nas leishmanias, desempenham um papel adicional, participando da síntese da tiol-tripantonina (BIRKHOLTZ *et al.*, 2011).

Além disso, os Trypanosomatídeos têm um metabolismo único baseado em tiol, no qual a tripanotona (N1-N8-bis (glutathionil) espermidina, T (SH)²) e a tripanotona redutase (TR) substituem muitas das funções antioxidantes e metabólicas da glutatona / Glutathione redutase (GR) e sistemas de tioredoxina / tioredoxina redutase (TrxR) presentes no hospedeiro. A tripanotona sintetase (TryS) e TR são necessárias para a sobrevivência dos protozoários (Figura 2). Consequentemente, as enzimas envolvidas na síntese de espermidina e a sua utilização, isto é, ARG, ODC, AdoMetDC, SpdS e, em particular, TryS e TR, são alvos promissores para o desenvolvimento de fármacos. (BOCEDI *et al.*, 2010)

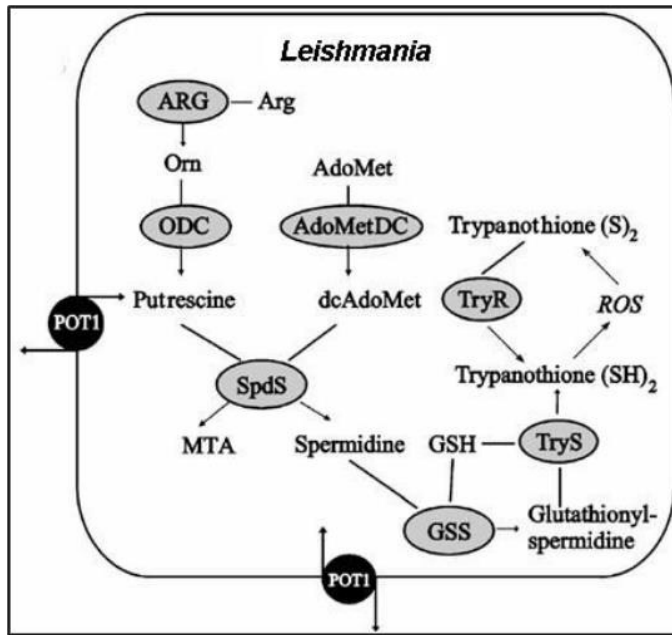


Figura 2. Transporte, biossíntese, interconversão e utilização de poliaminas na *Leishmania* spp. (HEBY et al., 2007).

A arginase é a primeira enzima da via das PAs e foi considerada um alvo no controle de infecção por *Leishmania* spp. A arginase de *Leishmania* (ARG-L) está localizada nos glicossomos e parece ser essencial para o ritmo biológico do parasito por estar envolvida no complexo balanço que define o destino da L-arginina (DA SILVA et al, 2012).

Em mamíferos existem dois tipos de arginase: ARG-1 e ARG-2, estão localizadas no citosol e mitocôndria, respectivamente. Um aumento nas concentrações séricas de arginase está correlacionado com um decréscimo nas concentrações de óxido nítrico (NO) porque a arginase e a óxido nítrico sintetase utilizam como substrato a L-arginina. A arginase em humanos está aumentada em pacientes com HIV co-infectados com *Leishmania* spp (TAKELE et al, 2013) e em lesões de leishmaniose cutânea (ABEBE et al., 2012)

A enzima arginase presente em *Leishmania* spp e em células humanas são usadas como alvos no controle da infecção por *Leishmania*, pelo mecanismo de bloqueio de ambas arginases do parasito e hospedeiro (INIELTA et al., 2005; RILEY et al., 2011), dessa forma se consegue inibir a proliferação e diferenciação do protozoário *Leishmania* por inibição da síntese de poliaminas e deixar a L-arginina das células humanas livre para a síntese de NO, espécie reativa de nitrogênio produzida por macrófagos com importante função leishmanicida.

Dos Reis et al., 2013, demonstraram que polifenóis como a epigallocatequina-3-galato (EGCG), catequina e epicatequina têm a capacidade de inibir a ARG-L e

ARG-1, sugerindo que os flavonóis podem ser usados como tratamento complementar da leishmaniose. Em adição a atividade antioxidante atribuída aos flavonóis, presentes em várias espécies vegetais, essas substâncias em especial a EGCG também contribuem para danos letais nas mitocôndrias de *L. amazonensis* (INACIO et al., 2012). Assim, a bioprospecção de espécies vegetais ricas em polifenóis, pode se constituir em uma importante aliada na descoberta de novas drogas anti-*Leishmania*.

A palmeira de babaçu, espécie nativa do Brasil, apresenta produtos ricos em polifenóis como é o caso do mesocarpo de babaçu, produto com várias atividades terapêuticas já comprovadas e por isso selecionada no desenvolvimento do presente estudo.

2.2 O Babaçu

Attalea speciosa Mart. ex Spreng é conhecida popularmente como “babaçu, aguassu, bagassu, buassu, guaguassu, oauassu, uanassu, uauassu e coco de macaco” (CORRÊA, 1984). O babaçu é considerado o maior recurso oleífero nativo do mundo. É um dos principais produtos extrativos do Brasil, contribuindo significativamente para a formação da renda interna de alguns estados, como por exemplo o Maranhão (EMBRAPA, 1984, IBGE 2015). De acordo com o IBGE (2015) a produção de amêndoas de babaçu no Brasil correspondeu a 77 955 toneladas anuais, sendo que o Estado do Maranhão foi o principal produtor, concentrando 94,5% da produção total.

O gênero *Attalea* inclui espécies predominantemente nativas da região meio-Norte brasileira (Maranhão, Piauí, Pará e Tocantins), e possui como sinônimos taxonômicos: *Orbignya phalerata* Mart. (babaçu verdadeiro), *Orbignya eicheri* Drude (piaçava), *Orbignya teixeirana* Bondar (perinão) e *Orbignya microcarpa* Mart (EMBRAPA, 1984;TROPICOS 2015). *Attalea speciosa* é a de maior distribuição, variação morfológica e importância econômica, ocupando regiões extensivas no Brasil e no Maranhão (EMBRAPA, 1984; IBGE 2009) (Figura 3A).

As palmeiras do babaçu apresentam monocaule, com até 20 m de altura e estipe liso, medindo até 41 cm de diâmetro. Folhas grande e pinadas, medindo entre 5,6 e 12 m de comprimento, dispostas em número variável de 7 a 22, sempre

localizadas no ápice do caule, com bainha de até 79 cm de comprimento; pecíolo com 0,4 a 1,5 m de comprimento e número de pinas variando entre 170 e 224 por lado, agrupadas e dispostas no mesmo plano (Figura 3B). Apresenta inflorescência solitária interfoliar ereta ou pendular, predominantemente pistiladas e estaminadas, ou flores de ambos os sexos. Os frutos são oblongo-elipsóides lisos, com 11,3 x 6,3 cm de diâmetro, coloração marrom na maturidade, com polpa fibrosa e tegumento com 3 a 6 amêndoas; endosperma branco, oleoso, homogêneo e embrião branco-creme (ANDERSON ; BALICK, 1988) (Figura 3C e 3D).

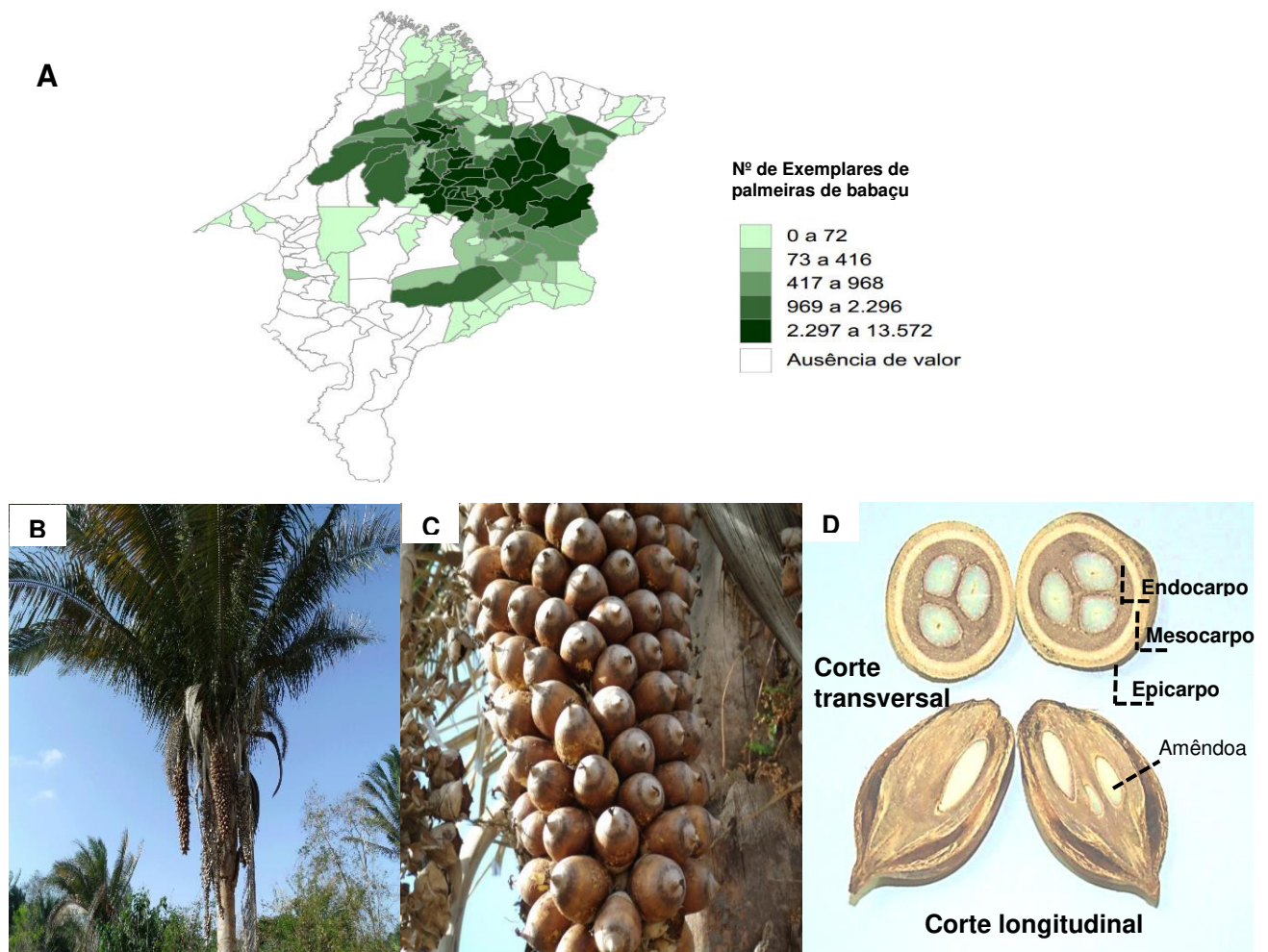


Figura 3: Área de ocorrência de babaçuais no Maranhão. Extração Vegetal e Silvicultura (IBGE, 2009) (A). Palmeira de babaçu-*Attalea speciosa* Mart ex. Spreng (B), Cacho com os frutos (C), corte transversal e longitudinal dos frutos (D), com detalhe para amêndoa, epicarpo, mesocarpo e endocarpo.

Os principais produtos obtidos do babaçu incluem: o óleo que é extraído das amêndoas, a massa residual depois da extração do óleo, chamada de borra, e a

farinha do mesocarpo (ROSENTHAL et al, 1975). O coco de babaçu possui em média 7% de amêndoas, das quais são extraídos cerca de 65% de óleo, com composição predominantemente láurica, os 35% remanescentes correspondem a massa residual depois da extração (LIMA et al., 2007).

Segundo dados etnobotânicos o babaçu é utilizado regionalmente como alimento e também como medicamento popular, para tratamento de inflamações, feridas crônicas, úlceras, cólicas e ulcerações de pele, assaduras e vulvovaginites (SOUZA et al, 2011).

2.2.1 Propriedades biológicas do mesocarpo de babaçu

O estudo da atividade anti-inflamatória foi realizado com um polissacarídeo extraído do mesocarpo de *Orbignya phalerata*, que causou redução na permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e aumento da fagocitose em macrófagos, sugerindo ação imunomoduladora (SILVA; PARENTE, 2001). Mais tarde, a ação imunomoduladora do extrato foi também observada por Nascimento e colaboradores (2006), ao demonstrarem que o tratamento de macrófagos peritoneais com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu ocasionava ativação dessas células, com o consequente aumento na expressão de moléculas do MHC de classe II e da produção de TNF- α e óxido nítrico.

Outros estudos avaliando a resposta imune induzida em animais tratados com extrato aquoso do mesocarpo de babaçu mostraram significativo aumento na produção de anticorpos auto-reativos anti-DNA, anti-miosina murina, anti-hemácias (GUERRA et al., 1998), anti-insulina (BARROQUEIRO, 2001; BARROQUEIRO et al., 2001; GUERRA et al., 2001) e anti-L-tiroxina (BARROQUEIRO et al., 2001), possivelmente devido ao efeito do mesocarpo sobre a produção de IFN- γ e sobre a inflamação (CHAGAS, 2001; BRITO, 2001, AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2006).

Segundo Guerra et al., 2011, o mesocarpo de babaçu apresenta ação imunomoduladora estimulando a produção de citocinas Th1 em animais imunizados com antígenos de *Leishmania amazonensis*, pois o uso do extrato aquoso como adjuvante, aumenta a produção de TNF- α , INF- γ e IgG2a, mesmo em camundongos Balb/c, que normalmente produzem mais IL-10, em resposta ao mesmo antígeno. Os

resultados mostraram a possibilidade de utilizar este produto como alternativa, para o tratamento das leishmanioses.

Diversos estudos farmacológicos comprovam a eficácia biológica dos bioprodutos obtidos do Babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng), uma espécie medicinal amplamente utilizada no Estado do Maranhão (SOUZA et al., 2011) e em alguns outros estados do Nordeste. Os resultados elencados embasam informações acerca do potencial do mesocarpo de babaçu como produto biotecnológico com ação sobre o sistema imunológico. No entanto, nenhum desses trabalhos propõem o uso de formulações com o objetivo de melhorar a segurança e eficácia do potencial terapêutico do mesocarpo de babaçu.

2.3 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

As limitações relacionadas ao uso de substâncias ativas, como o alcance de concentrações plasmáticas insuficientes, elevado metabolismo, rápida eliminação pelos fluidos corporais, distribuição inadequada, elevada toxicidade, baixa solubilidade aquosa, reduzindo a absorção intestinal ou dificultando a preparação de formas farmacêuticas líquidas, entre outras, têm restringido a introdução de novos medicamentos no mercado farmacêutico mundial (MEHNERT; MADER, 2001).

Entre as novas estratégias está o uso de sistemas de liberação de fármacos - SLF em micropartículas, pois esse tipo de tratamento torna os fármacos mais disponíveis para sítios específicos, promovendo liberação controlada e aumentando o efeito terapêutico num determinado sítio, por isso, essas formulações têm sido amplamente estudadas (HINES ; KAPLAN, 2013).

Nos sistemas de liberação, o fármaco está ligado a um transportador ou carreador, que é o responsável por aprimorar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando, desta forma, a farmacodinâmica, farmacocinética e redução da toxicidade local e sistêmica (UHRICH et al, 1999).

O uso de carreadores foi inicialmente motivado pela sua capacidade em liberar, de forma contínua e prolongada, as substâncias nelas encapsuladas ou retidas, sendo que o tempo de liberação poderia variar de dias até meses. Além disso, o confinamento de substâncias bioativas dentro destes sistemas as protege da degradação enzimática, tornando sua utilização uma forma particularmente eficaz de

disponibilizar os produtos, como fármacos e antígenos no organismo, de forma gradual, segura e/ou garantindo efeitos com maior duração (SHENOY et al., 2003; CAPUTO et al., 2004).

Materiais de natureza lipídica (MÜLLER; MÄDER and GOHLA, 2000;), inorgânica (GHOSH et al., 2008; GULTEPE et al., 2010) e polimérica (UCHEGBU, 2006; BAJPAI et al., 2008; KIM et al., 2009; FREIBERG and ZHU, 2004; LEE and YUK, 2007) têm sido utilizados como carreadores de SLF. Destes, os materiais poliméricos são, sem dúvida, os mais investigados. Os SLF são classificados de acordo com os mais variados critérios, incluindo a classe de materiais utilizados (poliméricos ou não poliméricos), tipo de agente terapêutico incorporado no SLF (moléculas de baixo peso molecular, proteínas, material genético), estado físico (líquidos, semi-sólidos ou sólidos), via de administração, forma como o fármaco se encontra imobilizado no sistema e a natureza do mecanismo que controla a liberação deste, etc.

Os materiais poliméricos, pela sua variedade, versatilidade e propriedades, são a classe de materiais mais investigada no desenvolvimento de SLF. De fato, o desenvolvimento atual de novos SLF mais sofisticados e eficientes anda a par com o desenvolvimento de novos polímeros, desenhados para ter propriedades cada vez mais específicas (KIM et al., 2009). Uma grande variedade de polímeros, sintéticos, naturais ou semi-sintéticos, pode encontrar aplicações no desenvolvimento de SLF. Na Tabela 1, encontram-se listados alguns dos polímeros sintéticos mais utilizados e investigados nesta área. Um requisito fundamental para que os materiais poliméricos possam ser utilizados na preparação de um SLF é que estes e os seus produtos de degradação não sejam tóxicos, e que apresentem uma boa biocompatibilidade, pelo menos nos tecidos com que vão ter contato direto.

Como os sistemas vivos são compostos majoritariamente por água, as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas dos polímeros são também um aspecto fundamental a ter em conta no momento de selecionar um polímero para uma aplicação específica. Outra propriedade determinante na viabilidade de um polímero para uma determinada aplicação é a forma como este se degrada (ou não) in vivo, ou seja, se este é biodegradável ou não biodegradável. Um polímero biodegradável pode ser definido como um polímero que sofre degradação química in vivo, por hidrólise ou ação enzimática, originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de ser

metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais (SALTZMAN et al., 2001). Os poliésteres, polifosfazenos, poliortoésteres, poliaminoácidos, polianidridos e as poliuretanas são exemplos de classes de polímeros sintéticos biodegradáveis utilizados na construção de SLF.

Tabela 1 Exemplos de polímeros sintéticos utilizados na fabricação de sistemas de liberação de fármacos (UCHEGBU, 2006; SALTZMAN et al., 2001)

<i>Polímeros não biodegradáveis</i>
- Acrilatos: poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(ácido acrílico) (PA), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA), ...
- Acrilamidas: poli(acrilamida), poli(N-isopropilacrilamida)
- Polidimetilsiloxano (PDMS)
- Polietilenoglicol (PEG)
- Copolímeros de acetato de etilenovinil (EVA)
- Polivinilpirrolidona (PVP)
<i>Polímeros biodegradáveis</i>
- Poliésteres: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-coglicólico) (PLGA), poli- ϵ -caprolactona (PLC), poli(di- α -claxanona) (PDS)
- Poliortoésteres
- Polifosfazenos
- Polianidridos
- Poliuretanas
-Poliaminoácidos sintéticos

Os polímeros naturais são polímeros produzidos por organismos vivos. Estes incluem as proteínas, os ácidos ribonucleicos (ARN) e ácidos desoxirribonucleicos (ADN), os polissacarídeos, e outros polímeros como a borracha natural e alguns poliésteres. Os derivados de polímeros naturais, também designados por semisintéticos, são polímeros naturais modificados quimicamente. Tal como os polímeros sintéticos, os polímeros naturais e seus derivados são também bastante utilizados na produção de SLF. Na Tabela 2 encontram-se listados alguns dos polímeros naturais e derivados com mais interesse na área da liberação controlada de fármacos. Estes podem ser divididos em três grandes classes: polímeros de base proteica(LEE and YUK, 2007), polissacarídeos(DANG and LEONG, 2006) e polihidroxialcanoatos (WILLIANS and MARTIN, 2002).

Tabela 2 Exemplos de polímeros naturais e seus derivados utilizados na preparação de sistemas de liberação de fármacos (LEE and YUK, 2007).

Polímeros de base proteica:

- Gelatina, albumina, colagénio, fibrina, proteína de soja;

Polissacarídeos:

- Quitosano, dextrano, alginato, agarose, carragenina, sulfato de condroitina, ácido hialurónico, pectina, amido, derivados de cellulose;

Polihidroxialcanoatos:

Poli(3-hidroxibutirato), poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato);

Entre os sistemas carreadores destaca-se o uso de polímeros biodegradáveis sintéticos, como o Poli (láctico-co-ácido glicólico) – PLGA, um copolímero, largamente utilizado na indústria farmacêutica e médica. Como o nome sugere, sua síntese ocorre pela copolimerização randômica de anéis abertos de dois diferentes monômeros, os dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) do ácido glicólico e do ácido láctico. Durante o processo de copolimerização os monômeros destes dois ácidos são ligados por ligações de éster, formando uma cadeia linear de poliéster alifático como produto final (ASTETE ; SABLIOV, 2006), como mostra a Figura 4.

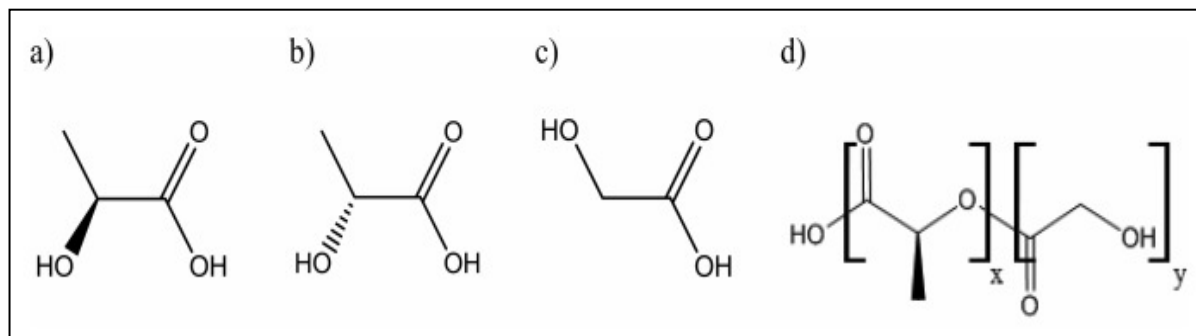


Figura 4. Estruturas moleculares de (a) L-PLA - ácido láctico levógeno; (b) D-PLA - ácido láctico dextrógeno; (c) PGA - ácido glicólico e (d) PLGA - Poli (láctico-co-ácido glicólico), sendo que x= número de unidades de ácido láctico e y= número de unidades de ácido glicólico (HINES; KAPLAN, 2013).

A partir da modificação das proporções de ácido láctico e glicólico utilizados para a formação das microesferas de PLGA, os produtos finais obtidos podem variar, e sua identificação é determinada pela proporção de monômeros utilizados. Todas as microesferas de PLGA são amorfas e apresentam temperatura de transição vítrea de aproximadamente 40-60°C. Diferentemente dos homopolímeros, formados por apenas um tipo de monômero de ácido láctico poli(ácido láctico) e ácido glicólico poli(ácido glicólico) e que possuem baixa solubilidade, as moléculas de PLGA possuem grande solubilidade em diferentes tipos de solvente como, por exemplo, solventes clorados, acetona e acetato de etila (CROLL et al., 2004).

As moléculas de PLGA, além de solúveis, são biodegradadas pela hidrólise das ligações de éster na presença de água. O tempo de degradação e, por consequência, de liberação das moléculas nelas aprisionadas, depende fortemente da proporção dos monômeros utilizados. Em geral, uma maior proporção de unidades de ácido glicólico gera menor tempo de degradação, sendo que a proporção de 50:50 possui o menor tempo de degradação, que é de aproximadamente dois meses (WALTER et al., 2001).

A hidrólise destas partículas no organismo, tem como subprodutos a liberação de ácido láctico e glicólico, que são substâncias presentes em várias vias metabólicas, podendo ser prontamente desviadas e metabolizadas no ciclo do ácido cítrico, gerando assim uma toxicidade mínima (YING; GROETTRUP, 2005). Além disso, a possibilidade de alterar o tempo de degradação das partículas e/ou material, pela razão entre as duas substâncias utilizadas na síntese, permite sua utilização em uma

vasta gama de produtos, tais como: enxertos, suturas, implantes, dispositivos protéticos, selantes cirúrgicos e microesferas (SALEM et al., 2013).

As micropartículas de PGLA são partículas sólidas, geralmente esféricas, com dimensões da ordem de 1 a 100 μm . Podem ser constituídas por matrizes poliméricas (microesferas), onde o fármaco pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à rede tridimensional, formada pelo polímero, ou por sistemas reservatórios (microcápsulas) onde o fármaco encontra-se encapsulado na forma sólida, líquida ou gasosa, separado do meio externo por uma membrana polimérica (FINCH, 1990; OLIVEIRA et al. 1992; ANDREO-FILHO; OLIVEIRA, 1999) (Figura 5).

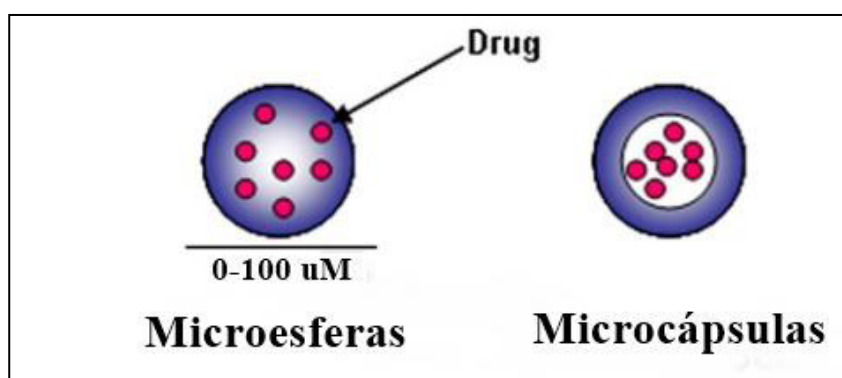


Figura 5. Representação esquemática de micropartículas (DANHIER et al., 2012).

Vários polímeros podem ser utilizados na produção de micropartículas, sendo o ácido poli-lático co-glicólico (PLGA) uma das possibilidades de uso. Existem aspectos importantes das micropartículas que as tornam aplicáveis no tratamento de infecções intracelulares, como nas leishmanioses. Dados pré-clínicos mostram que as micropartículas de PLGA têm eficácia comprovada no tratamento de infecções, pois como são normalmente absorvidas por endocitose nas células, as micropartículas contendo princípio ativo, podem liberar a droga lentamente, no citoplasma. Nas micropartículas poliméricas o pequeno tamanho da formulação confere uma passagem eficiente através de barreiras biológicas, com consequente captação e administração terapêutica em tecidos infectados (YASINZAI, et al., 2013). Por isso tem sido consideradas como uma alternativa promissora no tratamento das infecções intracelulares (DANHIER, et al., 2012).

A captação de materiais estranhos por fagócitos é um dos mecanismos pelo qual as micropartículas são absorvidas no nosso organismo. Este processo envolve tipicamente a endocitose da partícula por macrófagos. Após a endocitose da partícula, os macrófagos começarão a secretar enzimas e outros fatores químicos, tais como: superóxidos, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, visando digerir o material fagocitado (MITCHELL, 2004) (Figura 6).

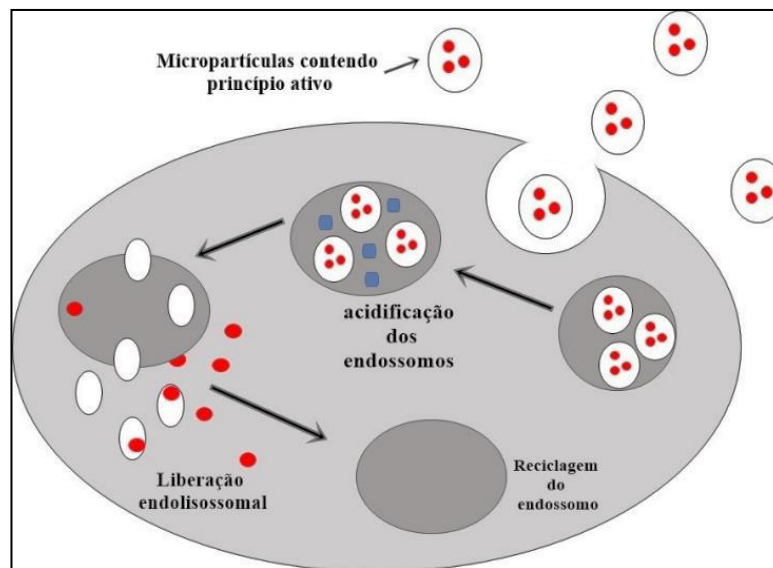


Figura 6. Escape endolisossomal de micropartículas. As micropartículas entram na célula por endocitose e localizam-se no compartimento endolisossomal. A inversão de carga de micropartículas de PLGA ocorre em endossomas acidificados, levando a desestabilização da membrana endolisossomal resultando no efluxo de micropartículas e liberação de fármaco (ACHARYA et al 2011).

Vimos que as formas amastigotas de *Leishmania sp* residem no interior de células do sistema imune, preferencialmente em macrófagos e que a sua localização pode prejudicar a eficácia de drogas terapêuticas, por conta dos mecanismos de escape. Os sistemas de entrega de drogas permitem que os efeitos adversos, causados por rotas problemáticas da administração, sejam evitados de forma que a atividade leishmanicida seja aumentada e a toxicidade do medicamento seja reduzida. O único medicamento utilizado no tratamento da leishmaniose é produzido a partir de sistemas de entrega de drogas é o AmBisome® (anfotericina B lipossomal). Esse fármaco é bastante eficaz, contudo, a via de administração é parenteral e a sua utilização se restringe ao tratamento da leishmaniose visceral pela dificuldade de administração (ROMERO;MORILLA, 2008).

A bioprospecção envolvendo produtos naturais, pode originar protótipos promissores com atividade anti-*Leishmania*, os quais podem ter seus efeitos potencializados pelo encapsulamento em micropartículas compostas de PLGA. Essa é uma alternativa interessante para o tratamento da leishmaniose cutânea, pois o carregamento de drogas, além de potencializar o efeito anti-*Leishmania*, pode direcionar as partículas à células alvo, reverter a citotoxicidade, proteger a biomolécula da atividade catalítica de enzimas e modular a resposta imunológica celular do hospedeiro.

Tendo em vista a inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis*, *in vitro*, e do efeito imunomodulador do mesocarpo de babaçu sobre macrófagos murinos, considerando ainda a necessidade da descoberta de novas formulações anti-*Leishmania* – acreditamos que macrófagos tratados com micropartículas de babaçu reduzem à infecção por *Leishmania amazonensis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito anti-*Leishmania* de micropartículas biodegradáveis poliméricas contendo o mesocarpo de babaçu, visando o desenvolvimento de protótipos para terapias inovadoras no tratamento alternativo ou complementar da leishmaniose tegumentar americana.

3.2 Específicos

- Caracterizar as micropartículas de PLGA quanto ao tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulamento;
- Determinar a citotoxicidade das micropartículas de PLGA contendo o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu sobre macrófagos peritoneais murinos e compará-las ao efeito das micropartículas de PLGA vazias;
- Avaliar o efeito terapêutico das micropartículas de PLGA contendo mesocarpo de babaçu sobre a produção de citocinas e de peróxido de hidrogênio em macrófagos não infectados e em macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*;
- Investigar a atividade anti-*Leishmania* de micropartículas de PLGA contendo mesocarpo de babaçu sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos Balb/c, fêmeas com 8-10 semanas de idade, pesando 20-24g, foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas na área da Universidade Estadual de Campinas. Durante o estudo, os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas no Biotério Setorial do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Tanto a água como a ração foram oferecidas *ad libitum* durante todo o período de experimentação. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, conforme aprovação do Comitê de Ética protocolo nº 23115011476.

4.2 Obtenção do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu

A farinha do mesocarpo de babaçu foi obtida da Cooperativa União Cultural de Arari, MA (Brasil). Este produto foi previamente submetido à análise de autenticidade, integridade e pureza, por meio de ensaios físico-químicos, e por técnicas cromatográficas utilizando como padrão amostras de mesocarpo de babaçu previamente obtidas em nosso laboratório e armazenadas numa extratoteca. (NASCIMENTO et al., 2006, FORTES et al., 2009)

4.3 Preparo das micropartículas de PLGA contendo mesocarpo (MMP) de babaçu e micropartículas controle (CMP)

As micropartículas foram preparadas pelo método de emulsão e evaporação do solvente óleo em água (O/A) e/ou água em óleo em água (A/O/A) (NIWA et al., 1993; NICOLETE et al., 2007). Foram feitos dois lotes diferentes de micropartículas, de acordo com o conteúdo:

- CMP: micropartículas controle;
- MMP: micropartículas contendo o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (300µL-10mg/mL).

A inclusão dos produtos nas micropartículas foi feita conforme descrito, resumidamente, a seguir: A fase orgânica utilizada para produção dos lotes, foi composta pelo polímero *poly (lactic-co-glycolic acid)* - PLGA (Purasorb® PDLG 5002, Purac Biomaterials, Holanda) (100 mg), com proporções iguais de ácido láctico e glicólico (50:50), dissolvidos em diclorometano (10 mL) (Dinâmica, Química Contemporânea, Brasil). Para produção do lote MMP, a fase aquosa contendo 300µL do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (10 mg/mL) foi vertida à fase orgânica e homogeneizada a 15.500 rpm, por 2 min. A bi-fase (água/óleo) foi vertida numa fase aquosa contendo PVA como tensoativo (Álcool polivinílico - 3% m/v, 10 mL) (Mowiol 40-88, Sigma-Aldrich). O tensoativo (água/óleo/água) ficou sob agitação branda e constante durante quatro horas, para a evaporação do solvente. Todas as micropartículas foram lavadas com água bi-destilada estéril por 3 vezes e centrifugadas (4.233 x g, 5 min). Em seguida, as micropartículas foram congeladas (-80°C) e depois, liofilizadas.

As micropartículas fluorescentes foram preparadas por adição de 6-cumarina (green fluorescence - Sigma Aldrich, USA) na fase orgânica. A quantidade de 6-cumarina/mg de polímero foi 0,15µg (TROMBONE et al., 2007; NICOLETE et al., 2011).

4.4 Caracterização das micropartículas

As micropartículas foram reconstituídas em água bi-destilada para a determinação dos diâmetros médios por espalhamento de luz. A análise do potencial zeta das micropartículas foi realizada com auxílio de um Nano Zeta Sizer (Malvern Instruments, Inglaterra). Para análise elementar as micropartículas foram visualizadas e as imagens adquiridas, após análise por microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em microscópio Phenon Pro X equipado com um espectrômetro de energia dispersiva de raios X (EDX). Para analisar a interação do mesocarpo com o copolímero PLGA, foi feita análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Uma quantidade de CMP, MMP e Meso foi misturada às pastilhas de KBr e os espectros foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FTIR (Shimadzu, IR-Prestige), com ondas entre 400-4000 cm⁻¹. As amostras foram analisadas na Central Analítica do Ceará Cis-Nano.

4.4.1 Ensaio de espectrofotometria UV-Vis

A concentração de mesocarpo de babaçu na micropartícula MMP foi determinada por ensaio espectrofotômetro de UV-Vis. A partir da curva de calibração obtida com o extrato de mesocarpo de babaçu, na solução de metanol:phosphate-buffered saline (PBS) (40:60% v/v), pH7,4, com linearidade variando de 78,125-10.000 µg/mL. A análise do espectro do mesocarpo de babaçu foi realizada a partir da varredura na faixa entre 199 - 900nm, usando a solução de metanol:PBS (40:60% v/v) como branco (RIBEIRO et al., 2014). A partir da curva analítica do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu foi avaliada a eficiência de encapsulamento do mesocarpo, à λ 280 nm, e expressa em percentagem, com dados obtidos na equação de regressão de $y = 0,0002x + 0,0431$ e linearidade (r^2) de 0,9924.

4.4.2 Determinação da eficiência do encapsulamento (EE%) do mesocarpo de babaçu

A taxa de encapsulamento do extrato de mesocarpo de babaçu nas micropartículas foi determinada por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis). Resumidamente, 20 mg de cada lote de micropartículas (CMP e MMP) foram pesadas e dissolvidas em 500 µL de acetonitrila. O solvente solubilizou as partículas e o extrato de mesocarpo de babaçu foi liberado da matriz polimérica. Os tubos contendo o solvente permaneceram abertos por 12h, para a evaporação e o precipitado resultante foi ressuspenso em solução de metanol: PBS (phosphate-buffered saline) (40:60% v/v). Em seguida, a preparação foi filtrada (0,22µm) e a leitura realizada em à 280 nm (UV-Vis Spectrophotometer, Biotek). A EE% do mesocarpo foi calculada pela seguinte equação:

$$EE\% = \frac{\text{Quantidade real de mesocarpo nas micropartículas}}{\text{Quantidade teórica de mesocarpo na micropartícula}} \times 100$$

4.5 Fagocitose das micropartículas investigadas por macrófagos peritoneais murinos

4.5.1 Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, dez camundongos Balb/c foram inoculados com 2 mL de solução de Tioglicolato 3% (p/v) (Merck nº 1081900500), por via intraperitoneal (GORDON et al., 1974). Após quatro dias, os animais foram mortos e em seguida foram inoculados 5 mL de PBS no peritônio. Após massagem o líquido peritoneal contendo as células foi coletado e lavado duas vezes por centrifugação ($187 \times g$, 10 minutos, $4^{\circ}C$) para obtenção das células. Estas foram ressuspensas em meio RPMI suplementado (10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) e 50 μg de gentamicina (Sigma ALdrich, G1397). A contagem do número total de células e o número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão com azul de Trypan (0,01%) em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico, de campo claro e aumento de 400X.

4.5.2 Ensaio de fagocitose

Macrófagos peritoneais (item 4.5.1) ressuspensos em meio RPMI suplementado (5×10^5 células/100 μL), foram colocados sobre lamínulas de vidro circulares, nos poços de uma placa com 24 poços contendo 500 μL /poço (Costar 3596, Corning, USA) e incubados durante 2 horas, a $37^{\circ}C$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . As células não aderentes foram removidas e as células aderentes, constituídas em 98% de macrófagos, foram incubadas por 1 h ou por 24h, com 100 $\mu g/mL$ de cada um dos lotes de micropartículas: CMP (Micropartículas vazias); MMP (Micropartículas contendo mesocarpo de babaçu) CMP6-cum (Micropartículas vazias fluorescentes); MMP6-cum (Micropartículas contendo mesocarpo de babaçu fluorescentes).

Ao final dos períodos de incubação, os sobrenadantes e/ou células das culturas foram aspirados e utilizados para determinar a produção de citocinas, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e arginase. As partículas não internalizadas foram removidas por lavagem tripla com PBS e a presença de micropartículas nas células foi avaliada pela contagem de 100 macrófagos, corados por May Grünwald-Giemsa (GIAIMIS et al., 1992), com o auxílio de microscópio óptico, de campo claro, em aumento de 1000X. As lâminas tratadas com micropartículas fluorescentes (CMP6-cum ou MMP6-cum) foram montadas com mowiol (Sigma-Aldric, 81381) e avaliadas por microscopia de fluorescência (Microscópio ótico invertido, NIKON-eclipse Ti-U) em aumento de X1000.

4.5.3 Avaliação da produção de Peróxido de Hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos tratados com CMP, MMP ou mesocarpio de babaçu

Macrófagos peritoneais ressuspensos em meio RPMI suplementado (1×10^6 /mL- 200 μ L), foram incubados durante 2 horas, a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Ao final, os poços foram lavados duas vezes com meio RPMI para remoção de células não aderentes. As células aderentes foram incubadas por 24h, com 100 μ g/mL de CMP, MMP ou Mesocarpio. O sobrenadante foi retirado e em seguida, foi adicionado as culturas 375ng/mL de DHR (Dihydrorhodamine 123, Sigma/Aldrick, MA, EUA) em PBS. As células foram então estimuladas pela adição de 10nM de Phorbol-miristato-acetado (PMA, Sigma), durante 1 h, a 37 °C. A reação foi bloqueada pela incubação a 4°C, 10 minutos, após a incubação as células foram utilizados para avaliar a produção de H₂O₂ em citômetro de fluxo (Guava® easyCyte 8HT Benchtop) .

A leitura foi feita no canal FL-1, com os parâmetros de complexidade (SSC) e tamanho celular (FSC) definindo o *gate* de aquisição das amostras. Para a análise, 5000 eventos foram adquiridos. Os dados foram analisados com software FlowJo (Tree Star Inc, USA).

4.5.4 Viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos incubados com MMP ou CMP

Macrófagos peritoneais (2×10^5 /100 μ L) foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços e incubados a 37°C , 1h, em presença de 0,5% CO₂, para adesão das células à placa. Ao final os sobrenadantes foram retirados e as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado e incubadas com concentrações decrescentes (100- 3,125 μ g/mL) de MMP ou CMP, por 48 horas, 37°C, 0,5% CO₂. A viabilidade foi também avaliada em presença do extrato aquoso do mesocarpio de babaçu, nas mesmas concentrações (100-3,25 μ g/mL) e pelo mesmo período. Como controle negativo utilizamos células incubadas somente com meio e como controle positivo de morte celular utilizamos Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%.

A avaliação da viabilidade celular foi feita por ensaio com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide – Sigma/Aldrick, MA, EUA) Após

48 horas de incubação foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) aos poços e a placa foi incubada por mais 3 horas, 37 °C em 0,5% de CO₂. Em seguida, foi adicionado a todos os poços 100 µL da solução de SDS/HCl 1% e as placas foram incubadas por 18 h, em local protegido da luz. A leitura foi realizada a 540 nm (SpectraMax Plus 384 Molecular Devices LLC), a densidade óptica dos poços correspondentes aos macrófagos não tratados foi considerado como 100% de viabilidade.

4.6 Atividade leishmanicida das micropartículas de babaçu sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

4.6.1 Parasitos

As formas promastigotas (5×10^5 /mL) de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), foram obtidas na fase estacionária, em culturas de 5 dias. Os protozoários foram cultivados em meio Schneider (Sigma-aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 50 µg de gentamicina. As formas promastigotas foram centrifugadas (200 x g por 15 min) e ressuspensas em meio RPMI (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 50 µg de gentamicina).

4.6.2 Análise de interação molecular via ressonância plasmônica de superfície - SPR.

A análise de interação molecular via SPR foi desenvolvida em sistema Biacore (modelo T200 -GE Life Science,), utilizando “*sensorchips*” tipo CM-5 como suporte para a molécula ligante. O método de acoplamento do ligante a superfície do *chip* foi feito com amina, para ativação da matriz de dextrana (1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida – HCl e N-Hidroxisuccinamida) A quantidade de ligante imobilizado na superfície do sensorchip foi pré-determinada com base na razão entre as massas moleculares do ligante e analitos conforme a equação:

$$\text{Analyte binding capacity (RU)} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times \text{immobilized ligand level (RU)}$$

O ensaio de interação molecular foi feito utilizando extrato bruto de promastigotas de *Leishmania amazonensis* na fase estacionária (150 µg/mL - pH 5,5)

como ligante, (acetato 5,5) e o extrato de mesocarpo de babaçu ou a pentamidina, como analitos, nas concentrações de 100, 50 e 25 µg/mL.

4.6.3 Avaliação da atividade das micropartículas de babaçu, ou partículas controle e do extrato bruto de babaçu sobre as formas promastigotas de Leishmania amazonensis

Para avaliar o efeito anti-*Leishmania* do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (Meso) e das formulações (MMP e CMP), formas promastigotas (5×10^6 /mL - 10 µL) foram adicionados aos poços de placa de fundo chato (96 poços) e incubadas por 48h (37°C – 0,5% CO_2), em presença de diferentes diluições do extrato de mesocarpo de babaçu (500-62,5 µg/mL) e das micropartículas CMP e MMP (100 - 3,125 µg/mL). A Pentamidina (10 - 0,625 µg/mL) foi utilizada como controle positivo e poços contendo somente o meio de cultura foram utilizados como controle negativo. Ao final foi determinado o número de promastigotas vivos, em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico, de campo claro e aumento de 400X. A concentração inibitória de 50% (IC_{50}), foi obtida por regressão não linear, com o auxílio do GraphPad Prism 7.0.

4.6.4 Efeitos das micropartículas de babaçu (MMP) ou micropartículas controle (CMP), ou extrato de mesocarpo de babaçu livre sobre macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de Leishmaniose amazonensis

Macrófagos peritoneais (5×10^6 células/mL) foram cultivados sobre lamínulas de vidro estéreis, em placas de 24 poços (Corning, USA), durante 2 h, a 37°C , em atmosfera úmida com 0,5% de CO_2 . Ao final, as células não aderidas foram removidas e contadas. As células remanescentes foram incubadas em presença de formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos/macrófago. As culturas foram novamente incubadas (4h, 33°C , 0,5% de CO_2). Após a remoção dos parasitos livres, as células infectadas foram tratadas, durante 48 horas (37°C , 0,5% de CO_2) com 100µg/mL micropartículas de babaçu (MMP) ou micropartículas controle (CMP), ou extrato de mesocarpo de babaçu livre (Meso) ou com 5µg/mL de pentamidina.

As preparações celulares foram coradas com Giemsa para avaliação do número de parasitos intracelulares. Foi quantificado o número de parasitos em 100

macrófagos, com auxílio de microscópio óptico de luz comum, campo claro e aumento de 1000X, (GIAIMIS et al., 1992). A taxa de infecção dos diferentes grupos, foi calculada utilizando-se a fórmula descrita por Lima Junior et al (2014):

$$\text{Taxa de infecção} = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de amastigotas}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de macrófagos}}$$

4.7 Produção de NO

Determinou-se a produção de nitrito (um produto final estável de NO) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos (secção 4.6.4) com o reagente Griess (DING, et al., 1988). Resumidamente, incubou-se 50 µl dos sobrenadantes com um volume igual de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% / dihidrocloreto de naftalenodiamina a 0,1% / H₃PO₄ a 2,5%) à temperatura ambiente, durante 10 min e determinou-se a absorbância a 550 nm. A conversão da absorbância em µM de NO foi calculada a partir de uma curva padrão, utilizando a concentrações conhecidas de nitrito de sódio (5-60 µM) em meio RPMI.

4.8 Produção de citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos

Os sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos infectados foram utilizados para dosagem de citocinas (TNF-α, IL-6, e IL-10) por ensaio imunoenzimático – ELISA, conforme as instruções do fabricante (eBiosciences, EUA). Os limites de detecção do teste ELISA foram 8 pg/mL para TNF-α e 4 pg/mL para a IL-10 e IL-6. A concentração das citocinas foi determinada por regressão linear a partir dos valores obtidos com concentrações conhecidas de citocinas recombinantes (eBiosciences, EUA).

4.9 Análise estatística dos dados

Os dados, expressos em média ± desvio padrão, foram analisados por análise de variância (ANOVA one-way) seguido do teste de Tukey – Kramer (para três ou mais grupos) ou por teste t de Student (dois grupos). Foram considerados significativos os valores de p<0,05. Todos os dados foram analisados com auxílio do Programa Graph Pad Prism versão 7.0.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização físico-química das micropartículas

A incorporação do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu nas micropartículas de PLGA apresentou eficiência do encapsulamento de 45 ± 5 %. Essa incorporação aumentou o diâmetro médio das micropartículas, mas não interferiu no seu potencial Zeta, como mostra a Tabela 3.

Nas formulações contendo o corante 6-cumarina observamos que as micropartículas ficaram sempre menores do que nas sem o corante, tanto naquelas com mesocarpo de babaçu, como no controle.

Tabela 3. Diâmetro, potencial Zeta e eficiência de encapsulamento das micropartículas de PLGA contendo ou não mesocarpo de babaçu associado ou não a cumarina

Micropartículas	Diâmetro ^a (μm)	Potencial Zeta ^a (mV)	EE ^b %
CMP	$5,4 \pm 0,8$	$-22,8 \pm 0,8$	NA ^c
CMP6 - Cum	$4,5 \pm 0,6$	$-16,9 \pm 0,6$	NA
MMP	$6,4 \pm 0,9$	$-26,4 \pm 0,3$	$45 \pm 5,0$
MMP6 - Cum	$3,0 \pm 0,2$	$-34,1 \pm 1,8$	NA

(a) Os valores representam a média +/- desvio padrão de amostras testadas em quintuplicatas.

(b) Eficiência de encapsulamento, determinada por espectroscopia ultravioleta-visível.

(c) NA=não se aplica.

5.1.1 Aspecto microscópico das micropartículas

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram que as micropartículas controle (Figura 7A- 7C) e as contendo mesocarpo de babaçu (Figura 7B- 7D) apresentam formato esférico, quase sempre homogêneo, independente da adição de 6-cumarina (Figura 7C e 7D) e ainda, que as micropartículas contendo 6-cumarina apresentam tamanho menor do que as homólogas sem o corante

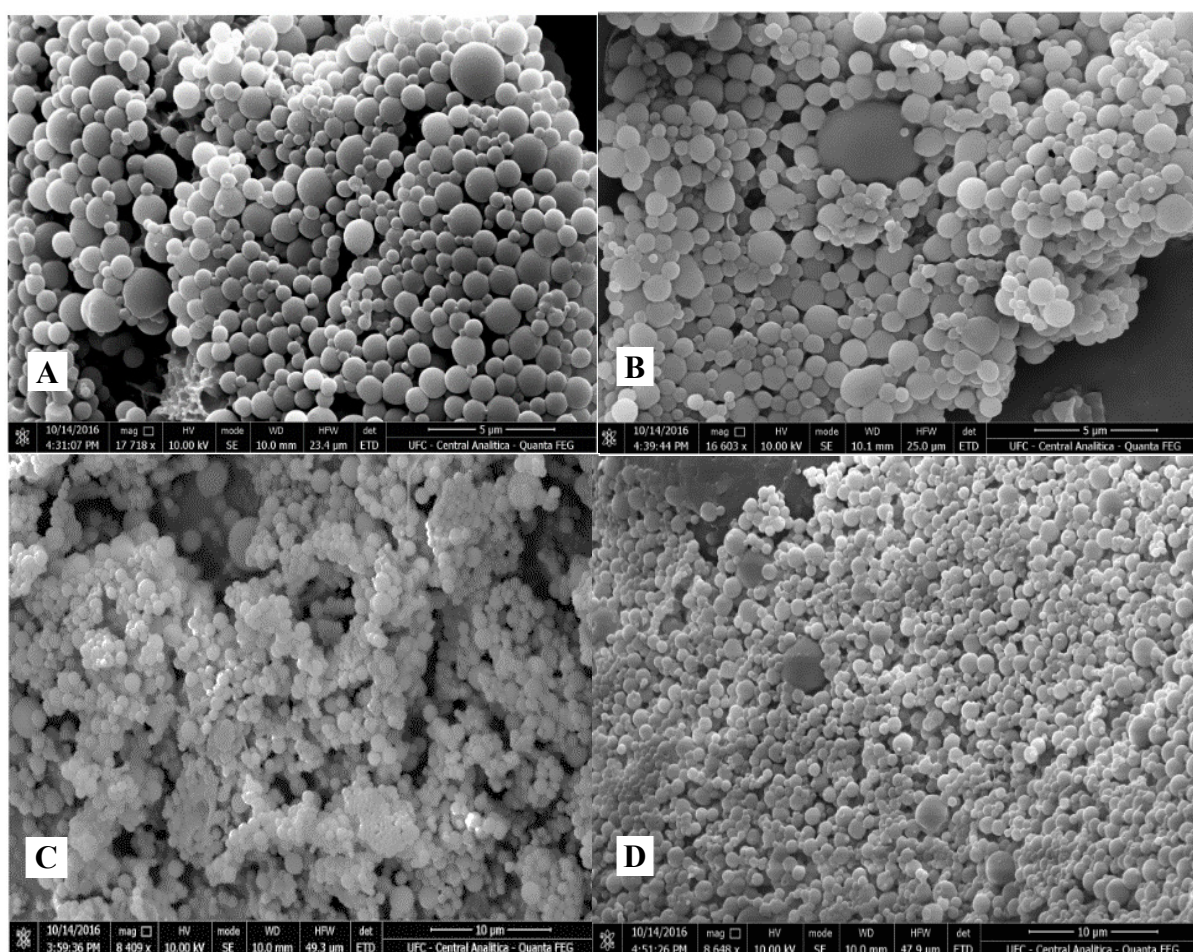


Figura 7. Avaliação microscópica das micropartículas: (A-C) controle; (B-D) micropartículas de mesocarpo de babaçu. As micropartículas foram dispersas numa fita adesiva de grafite, colada a um suporte de metal e revestidas com ouro. As observações foram realizadas a 10 kV em microscópio eletrônico de varredura, equipado com espectrômetro de energia dispersiva de raios X. Foram também avaliadas as micropartículas controle contendo 6-cumarina – CMP6-cum (C) e as micropartículas contendo mesocarpo + 6-cumarina - MMP 6-cum (D).

5.1.2 O mesocarpo de babaçu apresenta Interação Plasmônica (IP) com antígenos de *Leishmania amazonensis* e foi encapsulado nas micropartículas

A análise da interação molecular entre o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu e os antígenos de *Leishmania amazonensis* mostrou que o extrato tem melhor interação do que a Pentamidina, usada aqui como padrão, nas menores concentrações (50 µg/mL e 25 µg/mL) embora resultados semelhantes a Pentamidina tenham sido observados na sua maior concentração (100 µg/mL) (Figura 8A)

Na avaliação por espectrometria FTIR é possível observar que as MMP apresentaram distribuição semelhante as CMP, em quase toda a extensão avaliada, com exceção da região de 280nm, quando o espectro das MMPs apresentou o mesmo pico de absorbância encontrado no extrato livre (Figura 8B).

Os espectros de FTIR confirmaram a eficiência da incorporação do extrato de babaçu às micropartículas, considerando que as MMP apresentaram comportamento semelhante as CMP, segundo os espectros e as bandas de absorção. Espectros bem diferenciados dos obtidos com o extrato livre (Meso), que apresentou vários picos em regiões distintas e uma banda larga e forte na região 3.401cm^{-1} (Figura 8C).

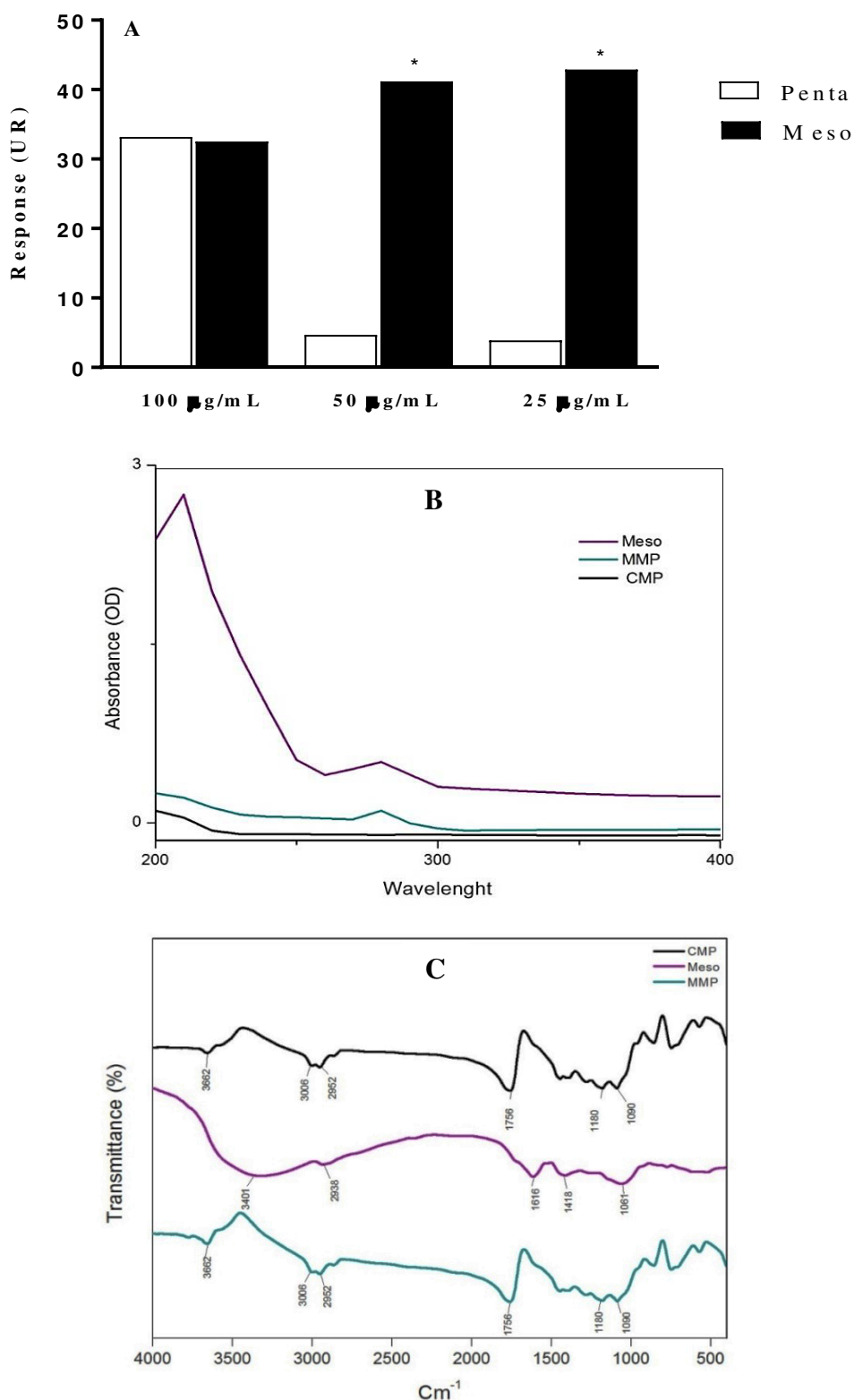


Figura 8. Interação Plasmônica do extrato aquoso de mesocarpio de babaçu e da Pentamidina com antígenos de *L. amazonensis* (A); Espectros no Ultravioleta (B) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (C) de micropartículas de babaçu (MMP) comparadas ao extrato de mesocarpio de babaçu (Meso) e as micropartículas - controle (CMP). As análises de interação molecular via – SPR, avaliaram a afinidade do ligante *Leishmania amazonensis* (150 $\mu\text{g/mL}$ - pH5,5), ao Meso ou a Pentamidina (100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$). Os espectros de ultravioleta (B) mostram absorção das amostras em comprimentos de onda entre 200 e 400nm. Amostras individuais foram testadas em triplicatas e os dados se referem a uma das amostras. (*) $p < 0,05$ na comparação com a Pentamidina. RU= unidades de ressonância.

5.1.3 As micropartículas de babaçu são melhor fagocitadas por macrófagos in vitro após 24 h de incubação e apresentam menor toxicidade do que o extrato livre

A Figura 9A mostra que a fagocitose das MMPs por macrófagos *in vitro* foi semelhante a das CMPs, após 1 hora de incubação. Entretanto, após 24 horas de incubação, a fagocitose de MMP apresentaram uma menor perda de potencial fagocítico.

A Figura 9B mostra que as micropartículas de mesocarpo de babaçu (MMP) apresentaram menor citotoxicidade do que extrato livre (MESO), nas maiores concentrações. Os resultados de MMP foram semelhantes aos obtidos nas culturas tratadas com micropartículas vazias (CMP), com valores de viabilidade celular variando entre 77 e 83%. Na mesma Figura 9B é possível notar que as maiores doses do extrato foram menos citotóxicas quando microencapsuladas.

A fagocitose das micropartículas pode ser também visualizada nas fotomicrografias de microscopia óptica de luz comum (Figura 9C; 9D) ou por microscopia de fluorescência (Figura 9E; 9F), quando foi possível observar várias micropartículas nos citoplasmas de macrófagos peritoneais murinos, como mostram as setas.

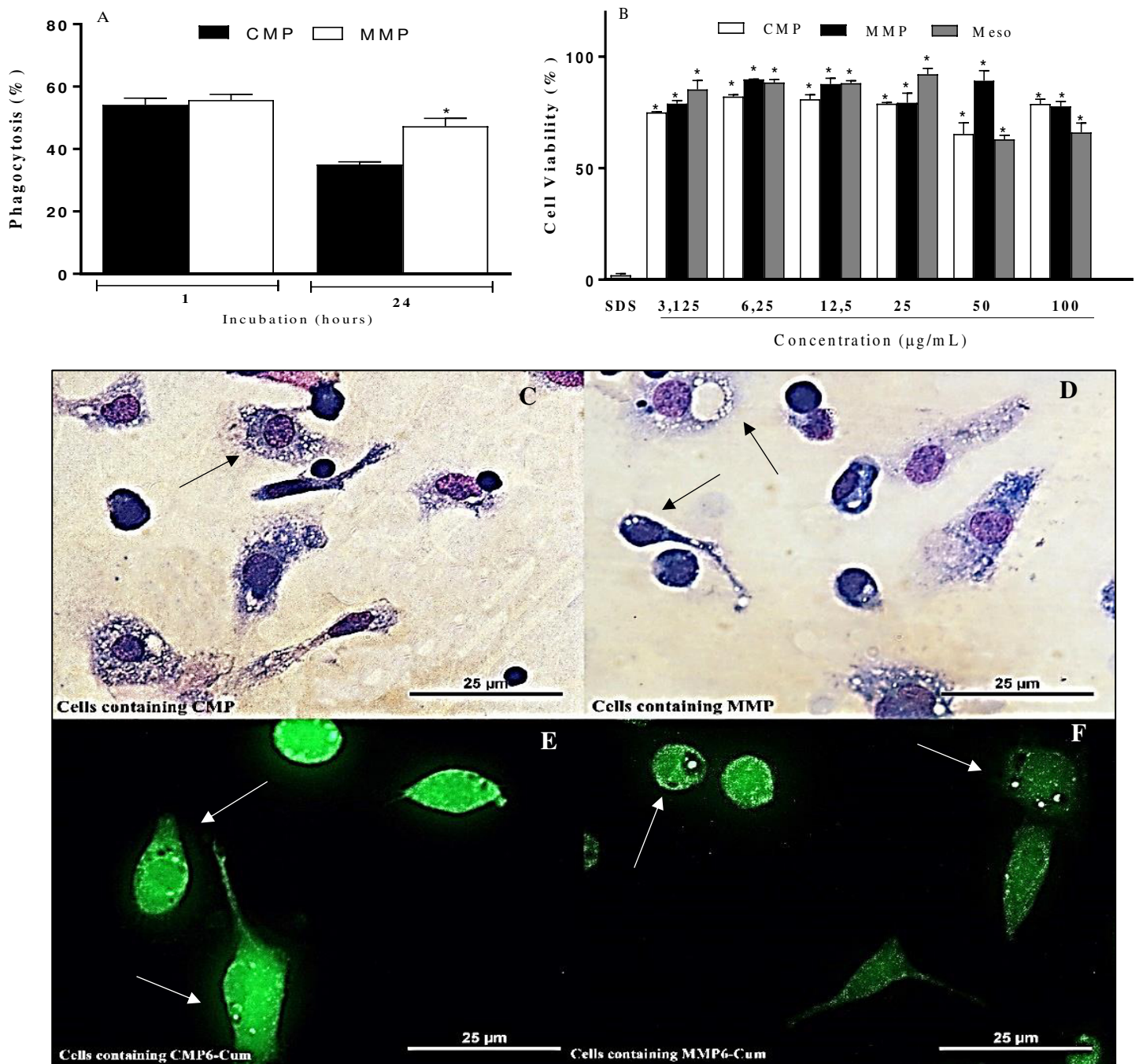
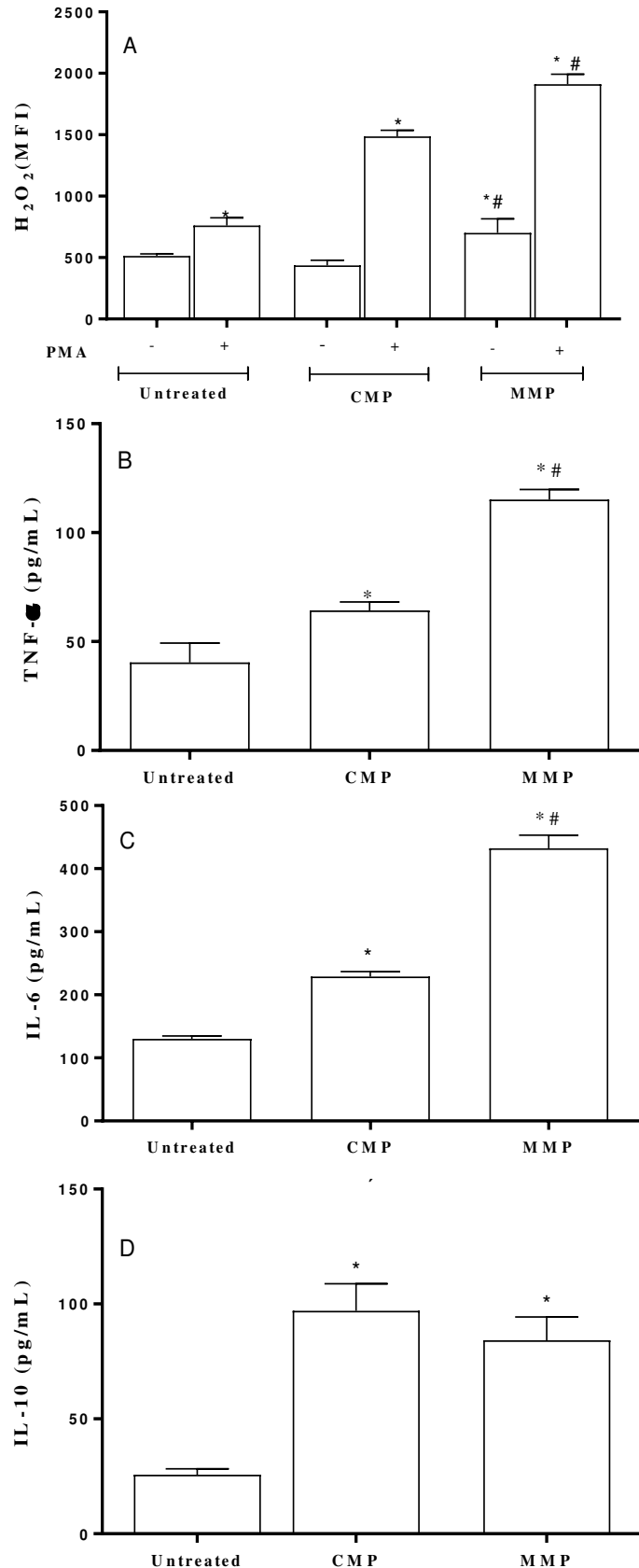


Figura 9. Fagocitose de micropartículas de babaçu por macrófagos peritoneais não infectados (A) e avaliação da citotoxicidade das micropartículas (B). Macrófagos peritoneais foram tratados por 1 ou por 24 horas com micropartículas de babaçu (MMP), ou com micropartículas vazias (CMP), para avaliação do índice fagocítico. Nos ensaios de citotoxicidade (B) a solução de Dodecil Sulfato de Sódio - SDS (10%) foi utilizada como controle positivo e comparado com as culturas tratadas com MMP, ou CMP ou MESO, nas concentrações entre (3 e 100 µg/mL). Todos os resultados correspondem à média $\pm$ SD, de amostras individuais testadas em triplicata (*) $p < 0,05$, quando comparada a CMP (A) ou a SDS (B). As imagens mostram macrófagos com micropartículas no citoplasma, obtidas por microscopia óptica de luz comum (C-D) ou por fluorescência, utilizando 6-cumarina incorporado aos dois tipos micropartículas (CMP6-cum, MMP6-cum) (E-F).

5.1.4 Micropartículas de babaçu apresentam ação imunomoduladora na polarização de macrófagos peritoneais normais



Macrófagos tratados com MMP produziram, espontaneamente, mais H₂O₂ do que macrófagos tratados com CMP ou não tratados. Após estímulo com PMA a produção de peróxido de hidrogênio foi potencializada em todos os grupos, mas a maior produção foi também observada no grupo MMP (Figura 10A).

O tratamento dos macrófagos com MMP aumentou a produção de TNF-α (Figura 10B) e IL-6 (Figura 10C), tanto em relação aos macrófagos não tratados, como relação ao grupo tratado com micropartículas vazias (CMP). A Figura 10D mostra que o tratamento com micropartículas sempre aumentou a produção de IL-10, independente do seu conteúdo, quando comparado as células não tratadas.

Figura 10: Produção de H₂O₂ (A), TNF-α (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) por macrófagos peritoneais incubados ou não com micropartículas. Macrófagos peritoneais não infectados e não tratados (Untreated) foram comparados as culturas tratadas com micropartículas contendo extrato de mesocarpo de babaçu (MMP), ou micropartículas vazias (CMP), durante 24 h. Os resultados correspondem a médias ± SD de amostras individuais testadas em triplicata. (*) $p < 0,05$, quando comparada grupo Untreated e (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CMP.

5.2 Micropartículas de babaçu tem ação anti-*Leishmania amazonensis* in vitro

5.2.1 Ação das micropartículas de babaçu sobre as formas promastigotas

A Tabela 4 mostra que a concentração inibitória (IC_{50}) das MMP (12 $\mu\text{g/mL}$), foi pelo menos 10 vezes menor do que o extrato em solução (111,4 $\mu\text{g/mL}$) e pelo menos 6 vezes menor do que as micropartículas controle - CMP (71,8 $\mu\text{g/mL}$). A atividade das MMP só foi menor do que a Pentamidina, usada como controle positivo de atividade (0,8 $\mu\text{g/mL}$).

TABELA 4: Concentração inibitória mínima de micropartículas contendo mesocarpo de babaçu em comparação ao extrato em solução e as micropartículas vazias sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Tratamento ^a	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^b
MMP	12*
CMP	71,8
MESO	111,4
Pentamidina	0,8

(a) MMP: micropartículas contendo extrato de mesocarpo de babaçu; CMP: micropartículas vazias; MESO: extrato aquoso de mesocarpo de babaçu em solução.

(b) A concentração inibitória de 50% (IC_{50}) das amostras individuais testadas em triplicata.

(*) $p < 0,05$, quando comparada aos demais grupos.

5.2.2 Atividade anti-Leishmania amazonensis das micropartículas de babaçu sobre as formas amastigotas

O tratamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis* com micropartículas contendo o extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (MMP) reduziu o número de amastigotas com eficiência semelhante à Pentamidina como mostra a (Figura 11A).

A Figura 11B mostra que taxa de infecção no grupo tratado com MMP (TI=3,1±1) foi semelhante a do grupo tratado com Pentamidina (TI= 2,5±1) e menor do que controle negativo - CMP (TI=8±1). O tratamento com MMP também reduziu o percentual de macrófagos infectados, com intensidade similar a Pentamidina (Figura 11C).

A Figura 11D-I, mostram o aspecto microscópio de macrófagos normais ou infectados. Macrófagos normais (Figura 11D); macrófagos infectados não tratados (Figura 11E) ou submetidos ao tratamento com CMP (Figura 11F); tratados com Pentamidina (Figura 11G); tratados com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (Figura 11H) ou com MMP (Figura 11I). Nas fotomicrografias é possível observar a presença de formas amastigotas no citoplasma das células infectadas, com notada redução no número de parasitos nas figuras 11G e 11I, respectivamente Pentamidina e MMP.

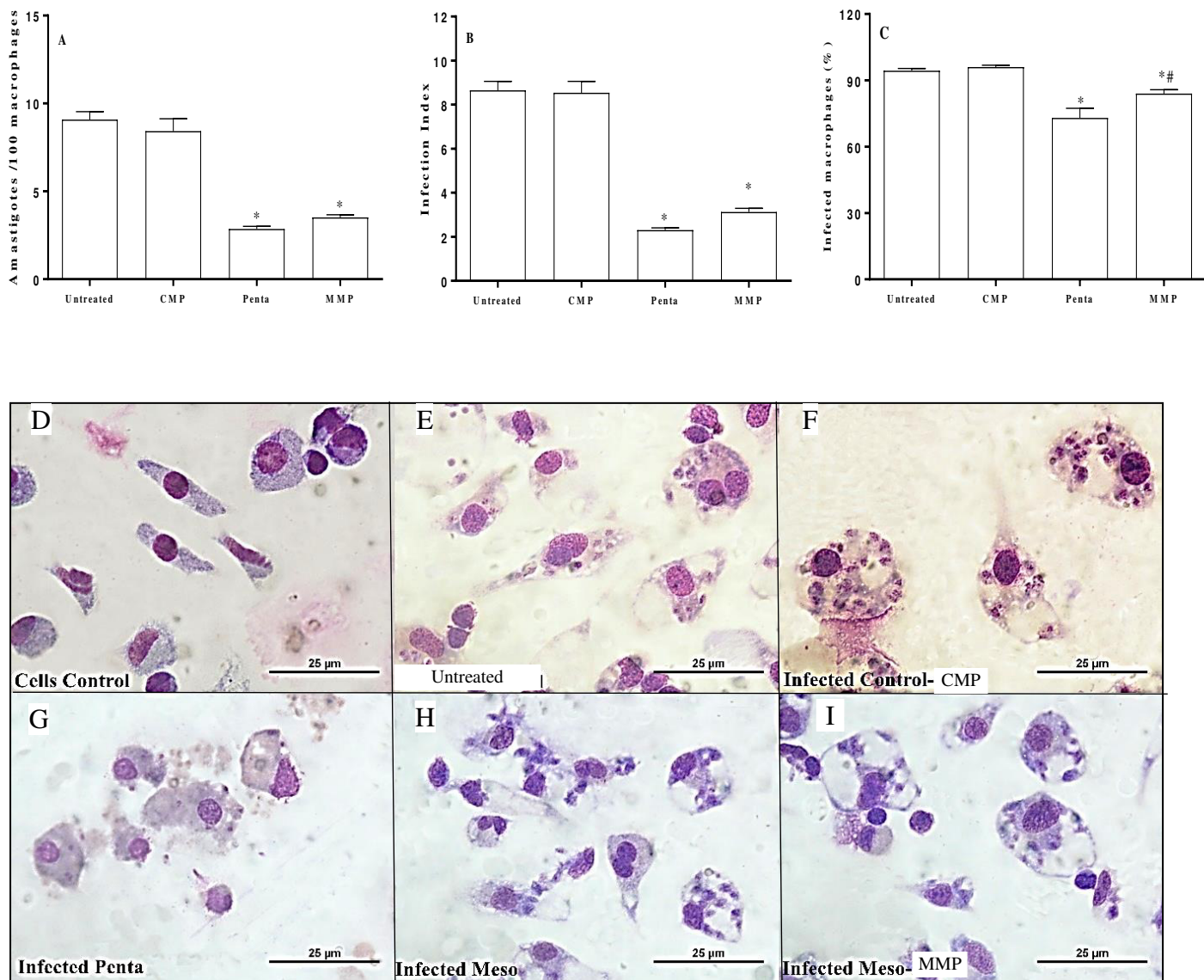


Figura 11. Ação de micropartículas de mesocarpo de babaçu em macrófagos infectados com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. As culturas tratadas com micropartículas foram comparadas com as tratadas com o extrato de mesocarpo de babaçu livre ou com a pentamidina, para determinação de: número de amastigotas nos macrófagos infectados (A); taxa de infecção (B); percentual de células infectadas nas culturas (C). Os resultados correspondem a médias $\pm$ SD, de amostras individuais testadas em quintuplicatas. (*) $p < 0,05$, quando comparado aos grupos Control e CMP e (#) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Meso. As imagens obtidas por microscopia óptica de luz comum de macrófagos (X400) mostram os macrófagos não infectados (D); macrófagos infectados não tratados (E); macrófagos infectados e tratados com micropartículas vazias [CMP], ou com Pentamidina [Penta - 5 μ g/mL (G)], ou com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu [Meso - 100 μ g/mL (H)] ou com micropartículas de babaçu [MMP - 100 μ g/mL (I)].

5.2.3 Efeito imunomodulador das micropartículas de babaçu sobre a polarização de macrófagos infectados *in vitro* com *L. amazonensis*

As micropartículas contendo o extrato (MMP) aumentaram a produção de TNF- α (Figura 12A), mas não tiveram efeito sobre a produção de IL-6 (Figura 12B). Por outro lado, reduziram a produção de IL-10 (Figura 12C) de forma semelhante ao observado no grupo tratado com Pentamidina. Já o tratamento com as micropartículas CMP não alterou a produção de nenhuma das citocinas.

O tratamento com MMP aumentou a produção de óxido nítrico em relação aos demais grupos (Figura 12D). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade da enzima arginase (dados não mostrados).

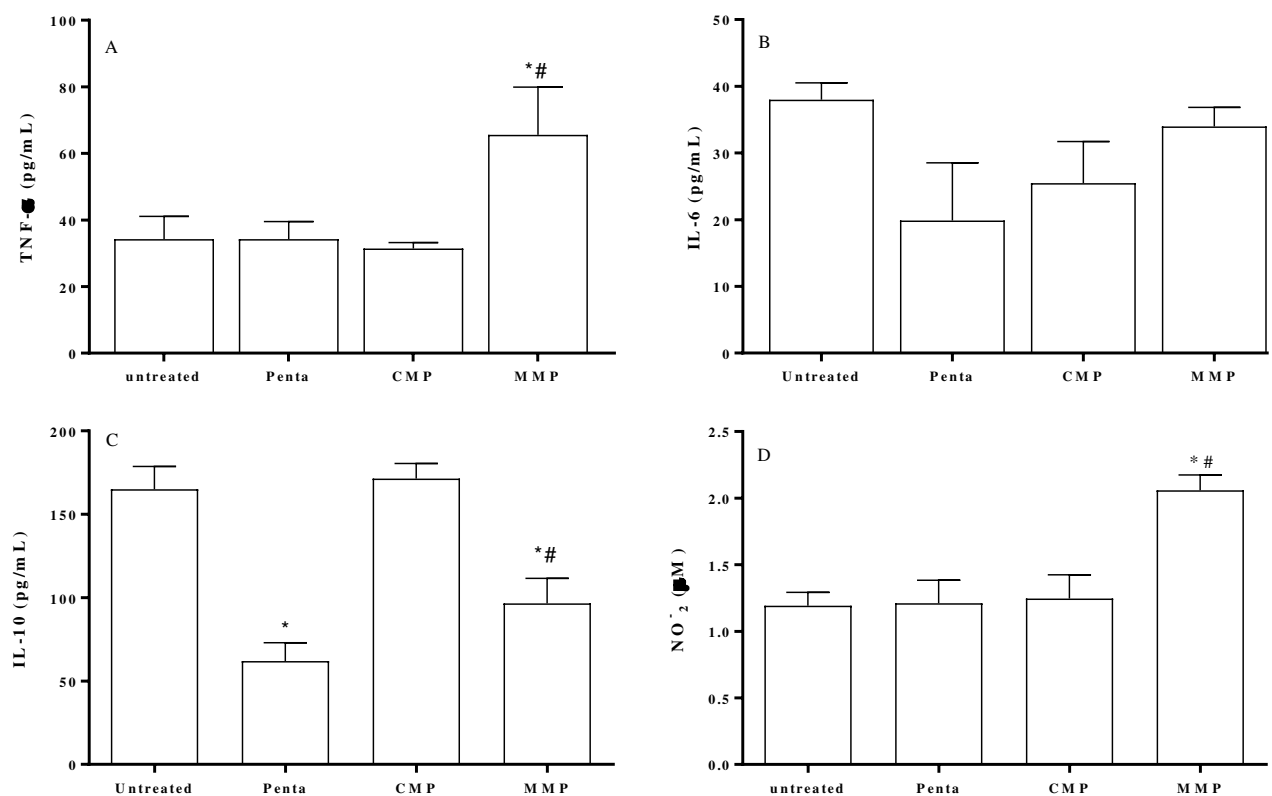


Figura 12: Produção de citocinas e liberação de óxido nítrico (NO) em culturas de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*. Os macrófagos foram tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$ de micropartículas de babaçu (MMP); ou com micropartículas vazias – controle negativo (CMP); ou com Pentamidina (Penta) – controle positivo e foram comparados a macrófagos infectados não tratados (Untreated). A concentração de TNF- α (A); IL-6 (B) e IL-10 (C) e a produção de nitritos (D), foi avaliada após 48h de cultivo. (*) $p < 0,05$, quando comparada ao grupo Untreated e (#) $p < 0,05$, em comparação a CMP.

6 DISCUSSÃO

Os tratamentos atuais para as leishmanioses têm sido considerados insatisfatórios devido à prevalência dos casos de resistência aos parasitos e a elevada toxicidade (MUKHOPADHYAY et al., 1996; HADIGHI et al., 2006; ROJAS et al., 2006). Por isso, diversos grupos têm investigado novas abordagens e novos tratamentos visando a descoberta de produtos e formulações com atividade anti-*Leishmania*, que sejam ao mesmo tempo, seguros, eficazes e que possam ser utilizados como alternativa ou concomitante com os tratamentos atuais.

Neste trabalho avaliamos a atividade leishmanicida do mesocarpo de babaçu. Utilizamos tanto o extrato aquoso do mesocarpo de babaçu em solução, como encapsulado em micropartículas biodegradáveis. Após o microencapsulamento fizemos a avaliação morfométrica das micropartículas obtidas, bem como avaliamos sua atividade anti-*Leishmania*.

Ao analisarmos a interação do mesocarpo de babaçu com antígenos de *Leishmania amazonensis* por Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) observamos que o mesocarpo de babaçu apresentou forte interação biomolecular com o protozoário de *Leishmania*, sugerindo um possível efeito terapêutico. O extrato do mesocarpo de babaçu, nas menores concentrações, mostrou melhor interação com o protozoário do que a pentamidina, considerada droga padrão, por ter atividade leishmanicida comprovada e ser utilizada como fármaco no tratamento da leishmaniose (BRYNCESON, 2001).

Segundo Phillips; Cheng, (2007) e Roque (2010), compostos que apresentam interação biomolecular com microrganismos são importantes alvos para bioprospecção de compostos biologicamente ativos e devem ser utilizados na busca de novos tratamentos, pois a interação biomolecular entre o produto e o parasito mostra que seu efeito pode ser direcionado ao microrganismo em estudo, razão pela qual resolvemos avaliar a eficácia de uma preparação utilizando o extrato de babaçu encapsulado, numa formulação microestruturada constituída por micropartículas de PLGA.

As micropartículas de PLGA, contendo ou não babaçu produzidas, apresentaram diâmetro e morfologia adequados, com variação entre 5.4 – 6.4 μ M, portanto com diâmetros biologicamente compatíveis (NICOLETE et al., 2007, 2008;

WISCHKE;SCHWENDEMAN, 2008). Adicionalmente, as micropartículas de babaçu (MMP), apresentaram potencial zeta aceitável (-26,4 mV), para estabilidade da formulação, pois quanto mais negativo for o potencial zeta, menor será a agregação de partículas por conta da repulsão eletrostática entre elas (SCHAFFAZICK et al, 2003).

A avaliação morfológica das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura, mostrou que tanto as micropartículas MMP como as CMP apresentaram formato esférico e tamanho predominantemente homogêneo, indicando que as formulações foram adequadamente preparadas. Embora a adição de 6-cumarina tenha reduzido o tamanho das micropartículas, os valores obtidos ainda estavam dentro dos parâmetros para uso intracelular, sendo que este menor tamanho já era esperado, pois a 6-cumarina diminui a tensão superficial da micropartícula (NICOLETE et al., 2008).

As micropartículas em estudo foram também caracterizadas por espectroscopia no UV-Vis, em comparação ao extrato aquoso de mesocarpo de babaçu livre (Meso), com o objetivo de identificar picos de absorção e as curvas de calibração que poderiam quantificar e atestar a eficiência do encapsulamento do Meso nas micropartículas de PLGA. No extrato livre foram obtidos dois picos de absorção na região do ultravioleta (210 nm e 280 nm), já as micropartículas MMP só apresentaram um pico na região λ 280 nm, indicando que o extrato foi incorporado e ainda que esse pico poderia ser utilizado como marcador dessas MMP.

As análises da FTIR mostraram que as bandas de absorção detectadas nos espectros de MMP e CMP são correspondentes aos grupos funcionais presentes no PLGA (WANG et al., 2016) e não foram observadas diferenças entre os espectros dos dois tipos de micropartículas (MMP e CMP). Segundo Murakami et al., (1999) superfície do PLGA é hidrofóbica e as drogas em solução aquosa são internalizadas no interior das micropartículas, assim é possível que o extrato de babaçu tenha sido internalizado, não restando resíduos na superfície das micropartículas MMP, que pudessem ser detectados nesse tipo de análise.

O espectro FTIR do extrato do mesocarpo apresentou várias bandas de absorção que correspondem a grupamentos funcionais diversos e por isso pouco servem para elucidar a natureza química dos principais compostos presentes no extrato, sobretudo se considerarmos que hidroxilas, grupamentos metilas e

grupamentos vinil estão presentes em grande número de metabólitos primários e secundários em vegetais (SILVERSTEIN et al., 2014). Segundo Barroqueiro et al., 2016, há no extrato do mesocarpo de babaçu polifenóis, incluindo a presença de ácidos fenólicos e flavonoides, compostos que poderiam explicar a eficácia das micropartículas de babaçu como agente anti-*Leishmania*, conforme os resultados aqui apresentados.

As micropartículas MMP e CMP apresentaram baixa citotoxicidade para macrófagos não infectados, de camundongos Balb/c, mantendo a viabilidade celular entre 77 e 83 %, respectivamente, portanto dentro da normalidade e do aceitável para células em cultura. Importante ressaltar que o encapsulamento reduziu a toxicidade do extrato nas duas maiores doses, o que demonstra que o encapsulamento melhorou a segurança do uso desse extrato.

Para avaliar a eficiência das micropartículas na fagocitose de macrófagos peritoneais e na ativação celular realizamos dois ensaios o primeiro com 1 hora de incubação e o outro com 24 h de incubação. Os resultados mostraram que as MMP foram mais eficientemente fagocitadas após 24 h de incubação. Esse dado corrobora com a análise do FTIR, pois confirma a eficiência do encapsulamento do extrato, considerando que as micropartículas não influenciaram a fagocitose na primeira hora. Entretanto, após 24 horas de incubação não houve perda da capacidade fagocítica das MMP, sugerindo que com o passar do tempo ocorreu liberação do extrato, possivelmente devido a degradação do polímero das micropartículas após o contato com o pH ácido dos fagolisossomos.

Reforçam essa nossa hipótese quanto a ativação e polarização de macrófagos, os dados da produção de citocinas, os quais mostram que o tratamento com MMP aumentou a produção de H_2O_2 e de $TNF-\alpha$; e de IL-6 em relação as micropartículas vazias. Em conjunto esses dados indicam que a ativação dos macrófagos ocorreu pela presença do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu e não pelas micropartículas. Corroboram com esses dados os resultados anteriormente descritos por Nascimento et al 2006, quanto ao efeito imunomodulador do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu sobre a produção de H_2O_2 e citocinas inflamatórias por macrófagos peritoneais murinos. Citocinas como $TNF-\alpha$ e IL-6 são capazes de modular a resposta imunológica de macrófagos, induzindo aumento na produção de

espécies reativas de oxigênio (UNDERHILL; OZINSKY 2002), da mesma forma que ocorreu nos nossos ensaios.

Macrófagos produtores de H_2O_2 e das citocinas TNF- α tem sido caracterizados como células M1. O conceito de macrófagos M1 e M2 é baseado na polarização de linfócitos T auxiliares Th1/Th2. Segundo Martinez et al (2009) Macrófagos M1 são frequentemente ativados em presença de produtos microbianos ou citocinas pró-inflamatórias. Apresentam aumento da atividade fagocítica e da produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , como ocorreu nos macrófagos tratados com MMP, além do aumento na produção de óxido nítrico. Por outro lado, macrófagos M2 são ativados em presença de IL-4 e IL-13, estão associados a resolução dos processos inflamatórios e produzem citocinas anti-inflamatórias ou regulatórias, como IL-10 e produzem arginase -1.

Importante ressaltar que os dois tipos de micropartículas (CMP e MMP) aumentaram a produção de citocinas em macrófagos não infectados, entretanto somente a produção de IL-10, foi similar nos dois grupos, sugerindo ser essa atividade está mais relacionada a natureza das micropartículas do que ao seu conteúdo. Segundo Nicolette et al., 2011 a fagocitose de micropartículas de PLGA, mesmo sem qualquer composto encapsulado, resulta na ativação de NF κ B, o que poderia explicar o aumento na produção de citocinas observado no grupo CMP.

As citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β , inibem a ativação de macrófagos, atividade muitas vezes relacionada ao agravamento da infecção por *Leishmania* spp. A IL-10 é produzida por uma variedade de células na infecção, sendo as principais produtoras as células T reguladoras (Treg), T CD8 +, macrófagos M2, células dendríticas; porém células Th1, células células B, células NK, e neutrófilos produzem em pequena quantidade. Esta citocina protege o organismo durante infecções crônicas revertendo o processo de inflamação intensa (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; HEDRICH; BREAN, 2010). Por outro lado, pode contribuir para a persistência de microrganismos, agindo diretamente na supressão de macrófagos e células dendríticas, prejudicando suas funções microbicidas e de apresentação de antígenos além de inibir a ativação de células Th1 (SABAT et al., 2010) e de macrófagos M1 (BHATTACHARYA; ALI, 2013; GANNAVARAM et al 2016). Barral et al., (1993) reportam que experimentos *in vivo*, em camundongos infectados em processo de cura

quando tratados com TGF- β , os parasitos em estado de latência foram reativados. A reativação da doença foi acompanhada pelo aumento na produção de IL-10

O encapsulamento do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu potencializou em quase dez vezes, a sua ação anti-*Leishmania*, sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os dados relativos a ação anti-*Leishmania* de micropartículas do mesocarpo de babaçu são inéditos, embora não sejam novos os relatos quanto aos efeitos do extrato em solução sobre as formas promastigotas. Tendo em vista que resultados prévios obtidos por Bezerra et al (2006), também descreveram a ação anti-promastigotas do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu. Curiosamente, nossos resultados mostraram uma melhor eficácia (IC₅₀ -111 μ g/mL) do extrato em solução do que esses autores (IC₅₀ > 500 μ g/mL), possivelmente, devido a variações na metodologia, incluindo o tempo de incubação e a preparação do extrato, pois, utilizamos aqui 48 horas de incubação do extrato com os parasitos, conforme descrito por De Moura et al., (2014) ao invés de 24 h.

As micropartículas de babaçu apresentaram melhor eficácia como agente anti-*Leishmania* do que extrato aquoso em solução, quando utilizado em culturas de macrófagos previamente infectados, os quais apresentavam formas amastigotas no citoplasma. Em geral, os macrófagos infectados estão suprimidos devido ao aumento de IL-10 e aos mecanismos de escape da *L. amazonensis*, o que resulta na redução de citocinas inflamatórias Th1 e na baixa produção de espécies reativas de oxigênio (MARTINEZ; PETERSEN, 2014; CABRERA-FUENTES et al 2015). Nossos resultados mostram que as MMP apresentaram ação microbicida sobre os protozoários e ainda preservaram a ação imunomoduladora do mesocarpo de babaçu, pois a fagocitose dessas MMP reverteu a supressão ocasionada pela infecção, sugerindo que essas micropartículas tiveram ação imunomoduladora sobre a ativação e polarização de macrófagos para M1, o que resultou no aumento da produção de TNF- α e NO e, em contrapartida, na redução de IL-10, em decorrência da liberação lenta do extrato dentro da célula. Esses achados corroboram com alguns resultados já descritos quanto a atividade imunomoduladora do extrato de mesocarpo de babaçu sobre a ativação de macrófagos (NASCIMENTO et al 2006); na resposta de camundongos a antígenos de *Leishmania* (GUERRA et al 2011) ou na sepse (BARROQUEIRO et al, 2016). Entretanto, são os primeiros resultados quanto das

micropartículas de babaçu na polarização de macrófagos M2 para M1, durante a infecção por *Leishmania amazonensis*.

As micropartículas vazias apresentaram moderada ação sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, mas nenhuma atividade contra as formas amastigotas no interior de macrófagos, indicando que a degradação das micropartículas pode interferir na viabilidade e/ou proliferação das promastigotas, por mecanismos que ainda precisam ser elucidados. Segundo Nicolette et al, 2011, as micropartículas de PLGA, por si só, provocam instabilidade celular e mudanças no citoplasma, devido ao seu tamanho (4,5-6,4µM), o que poderia explicar sua ação sobre as formas promastigotas. Entretanto, quando o mesocarpo de babaçu está presente na formulação, a ativação celular é potencializada, o que resulta no aumento na produção de mediadores químicos e citocinas, que auxiliam no processo de morte ou inibição da proliferação do protozoário no citoplasma da célula.

Concentrações elevadas de citocinas inflamatórias podem promover um efeito deletério nas células, incluindo necrose e/ou apoptose (BARCINSKY; DOS REIS, 1999). Assim, é possível inferir que a produção de citocinas inflamatórias induzida pelas MMP garantem não só a reversão da imunossupressão ocasionada pela infecção e a polarização dos macrófagos, mas também protegem as células de apoptose, sem o risco de efeitos deletérios para a célula, mesmo diante do aumento na produção de TNF- α .

Considerando os achados sobre a atividade anti-*Leishmania* das micropartículas de babaçu - MMP investigamos se a presença de metabólitos secundários como polifenóis estariam envolvidos no mecanismo de ação da atividade anti-*Leishmania*. Segundo Dos Reis et al., 2013, alguns compostos da classe dos flavonóis inibem a enzima arginase, potente alvo terapêutico contra os protozoários do gênero *Leishmania*, pois participa de rotas envolvidas na proliferação e diferenciação destes protozoários. Avaliamos a atividade da arginase (dados não mostrados) nas culturas de macrófagos infectados e tratados com os dois tipos de micropartículas, entretanto nenhuma inibição foi observada, indicando, ainda que indiretamente, que não são os polifenóis os compostos envolvidos na atividade anti-*Leishmania* das partículas MMP.

7 CONCLUSÕES:

Com base nos resultados obtidos concluímos que o encapsulamento do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu reduziu a citotoxicidade do extrato para células normais e potencializou a atividade anti-*Leishmania*, tanto para formas promastigotas, como para amastigotas e, adicionalmente, apresentou ação imunomoduladora sobre os macrófagos murinos infectados por *L. amazonenseis*, como anteriormente descrito para o extrato livre, em decorrência do efeito sobre a polarização de macrófagos para o padrão M1 de ativação.

Os dados aqui descritos adquirem especial relevância se considerarmos que o grande número de drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose, apresentam elevada toxicidade e induzem resistência do parasito, resultando em ineficácia terapêutica e em baixa adesão ao tratamento. Dessa forma, inferimos que a formulação em sistema de micropartículas biodegradáveis contendo mesocarpo de babaçu pode servir como protótipo de novas drogas a serem utilizadas no tratamento contra a leishmaniose tegumentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE T, HAILU A, WOLDEYES M, MEKONEN W, BILCHA K, CLOKE T, KROPP P. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6 (6), e1684, 2012.

ACHARYA S, SAHOO SK., PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. Advanced Drug Delivery Reviews. 63, 170–183, 2011.

ALEXANDER J, SATOSKAR AR, RUSSELL DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. Journal of Cell Science. 18, 2993-3002, 1999.

ALEXANDER JE, RUSSELL DG. The interaction of Leishmania species with macrophages. Advances in Parasitology. 31, 175-254, 1992.

ANDERSON AB, BALICK MJ. Taxonomy of Babassu Complex (*Orbignya* sp.: Palmae). Systematic Botany 13: 32-50, 1988.

ANDREO FILHO N, OLIVEIRA AG. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. Infarma, 9: 18-21, 1999.

ASSCHE VT, DESCHACHT M, DA LUZ RI, MAES L, COS P. *Leishmania* - macrophage interactions: insights into the redox biology. Free Radical Biology and Medicine 51, 337–351, 2011.

ASTETE CE, SABLIOV C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition* 17: 247–289, 2006.

AZEVEDO AP, FARIAS JC, COSTA GC, FERREIRA SCP, ARAGÃO-FILHO WC, SOUSA PRA, PINHEIRO MT, MACIEL MCG, SILVA LA, LOPES AS, BARROQUEIRO ESB, BORGES MOR, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 115-159, 2007.

AZEVEDO APS, FERREIRA SCP, CHAGAS AP, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. Efeito do tratamento com mesocarpo de babaçu sobre o edema de pata e a liberação de mediadores da inflamação. *Revista de Ciências da Saúde*, 5:21-28, 2003.

BARCINSKY MA, DOS REIS GA. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 4, 395-401, 1999.

BARRAL A, BARRAL-NETTO M, YONG EC, BROWNELL CE, TWARDZIK DR, REED SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proceeding National Academy of Sciences USA*. 90: 3442-3446, 1993.

BARROQUEIRO ESB, CHAGAS AP, NASCIMENTO FRF, GUERRA RNM. B Cell, macrophage activation and the diabetogenic effect of babassu mesocarp. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, 34: 72, 2001.

BARROQUEIRO ESB, PRADO DS, BARCELLOS PS, SILVA TA, PEREIRA WS, SILVA LA, GUERRA RNM. Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2859652. <http://doi.org/10.1155/2016/2859652>.

BARROQUEIRO ESB. Efeito de babaçu sobre a população de anticorpos auto-reativos, 2001; 65p. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA.

BASANO SA, CAMARGO LMA. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7: 328-337, 2004.

BEZERRA JL, COSTA GC, LOPES TC, CARVALHO ICDS, PATRÍCIO, FJ, SOUSA, SM, AMARAL FMM, REBELO JMM, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO, FRF. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16, 631-637, 2006.

BHATTACHARYA P, ALI N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46: 128 -134, 2013 .

BIRKHOLTZ L, WILLIAMS M, NIEMAND J, LOUW AI, PERSSON L, HEBY O. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenesis protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochemistry Journal*. 438: 229–244, 2011.

BOCEDI A, DAWOOD KF, FABRINI R, FEDERICI G, GRADONI L. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. *FASEB Journal*. 24: 1035–1042, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRITO RMF. Avaliação da auto-reatividade induzida pelo tratamento com o babaçu. 2001. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia. (monografia) - Universidade Federal do Maranhão.

BRITTINGHAM A, MOSSER DM. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology Today*. 11, 444-447, 1996.

BRODSKYN C, DE OLIVEIRA CL, BARRAL A, BARRAL-NETTO M. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Review of Vaccines*. 5, 705-717, 2003.

BRYNCESON A. 2001 - Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*. 190:81-84.

CABRERA-FUENTES HA, LOPEZ ML, MCCURDY S, FISCHER S, MEILER S, BAUMER Y. Regulation of monocyte/macrophage polarisation by extracellular RNA. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 113: 473–481, 2015.

CAPUTO A, BROCCA-COFANO E, CASTALDELLO A, DE MICHELE R, ALTAVILLA G, MARCHISIO M, GAVIOLI R, ROLEN U, CHIARANTINI L, CERASI A, DOMINICI S, MAGNANI M, CAFARO A, SPARNACCI K, LAUS M, TONDELLI L, ENSOLI B. Novel biocompatible anionic polymeric microspheres for the delivery of the HIV-1 Tat protein for vaccine application. *Vaccine* 22: 2910– 2924, 2004.

CHAGAS AP Atividade autoimune do babaçu (*Orbignya phalerata*) e sua correlação com a população de linfócitos B CD5 positivos. 2001. Trabalho de Conclusão de Curso de Biologia. (monografia) - Universidade Federal do Maranhão, 2001.

CORRÊA MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v.1. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, p. 225.

CORREIA D, MACÊDO VO, CARVALHO EM, BARRAL A, MAGALHÃES AV, ABREU, MVA, ORGE MLA, MARDSEN P. Estudo comparativo entre antimoniato de meglumina, isotianato de pentamidina e sulfato de aminosidina, no tratamento de lesões cutâneas primárias causadas por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29: 447-453, 1996.

COSTA JF, WANDERLEY JLM, COSTA JML, BARCINSKI MA, BARRAL A, BORGES VMB. Apoptotic mimicry as a possible immunopathogenic mechanism of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Gazeta Médica da Bahia*. 79, 40-44, 2009.

COUPER KN, BLOUNT DG, RILEY EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity. *Journal of Immunology*, 180: 5771-5777, 2008.

CROLL TI, O'CONNOR A, STEVENS JGW, COOPER-WHITE JJ. Controllable Surface Modification of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects. *Biomacromolecules*, 5: 463-473, 2004.

DA SILVA MF, ZAMPIERI RA, MUXEL SM, BEVERLEY SM, FLOETER-WINTER LM. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PloS One* 7:e34022, 2012.

DANHIER F, ANSORENA E, SILVA JM, COCO R, BRETON AL, PRÉAT V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 161;505–522, 2012.

DE MOURA AA, KAYANO A M, OLIVEIRA GA, SETÚBAL SS, RIBEIRO JG, BARROS NB, NICOLETE R, MOURA LA, FULY AL, NOMIZO A, DA SILVA SL, FERNANDES CF, ZULIANI JP, STÁBELI RG, SOARES AM, CALDERON LA. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. *BioMed Research International*, Article ID 195356, 2014. doi:10.1155/2014/195356

DE SOUZA LS, LANG T, PRINA E, HELLIO R, ANTOINE JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science*. 108: 3219-3231, 1995.

DESCOTEAUX A, TURCO SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2-3, 341-352, 1999.

DING A H, NATHAN CF, STUEHR DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology*, 141: 2407-2412, 1988.

DOS REIS MBG, MANJOLIN LC, MAQUIAVELI CC, SANTOS-FILHO OA, da SILVA E L. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and Rat Arginases by Green tea ECG,(+)- Catechin and (-) – Epicatechin: A Comparative Structural Analysis of Enzyme-Inhibitor Interactions. *PLoS ONE* 8(11):e78387, 2013.

EL-ON J, BRADLEY DJ, FREEMAN JC. *Leishmania donovani*: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Experimental Parasitology*, 49: 167-74, 1980.

SALTZMAN, W., *Drug Delivery - Engineering principles for drug therapy*. Oxford University Press: NY, 2001.

DANG, J. M.; LEONG, K. W., Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58, (4), 487-499.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária. Departamento de Orientação e Apoio à Programação de Pesquisa, Brasília, D.F. Babaçu: Programa Nacional de Pesquisa. Brasília. EMBRAPA-DDT, 1984.

FARROW AL, RANA T, MITTAL MK, MISRA S, CHAUDHURI G. 2011. Leishmania-induced repression of selected non-coding RNA genes containing B-box element at their promoters in alternatively polarized M2 macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 350:47-57.

FINCH, C.A. Microencapsulation. In: ELVERS, B.; HAWKINS, S.; SCHULZ, G. *Olmann's encyclopedia of industrial chemistry*. 5th ed. Neinhene: VCH Verlagsgesellschaft, v.A16, p.575-588, 1990.

FREITAS-JUNIOR LH, CHATELAIN E, KIM H A, SIQUEIRA-NETO J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2: 11-19, 2012.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 5ª ed. Brasília: Funasa; 2001.

GANNAVARAM S, BHATTACHARYA P, ISMAIL N, KAUL A, SINGH R, NAKHASI HL. Modulation of Innate Immune Mechanisms to Enhance Leishmania Vaccine-Induced Immunity: Role of Coinhibitory Molecules. *Frontiers in Immunol*, 13:187, 2016. doi: 10.3389/fimmu.2016.00187. eCollection.

GIAIMIS J, LOMBARD Y, MAKAYA-KUMBA M, FONTENEAU P, POINDRON P. A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. *Journal of Immunological Methods*. 154, 185 -193, 1992.

GORDON S, UNKELESS J, COHN ZA. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis; evidence for a 2-stage process. *Journal of Experimental Medicine* 140, 995, 1974.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews of Immunology*, 31: 23-35, 2003.

GHOSH, P.; HAN, G.; DE, M.; KIM, C. K.; ROTELLO, V. M., Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008, 60, (11), 1307-1315.

GULTEPE, E.; NAGESHA, D.; SRIDHAR, S.; AMIJI, M., Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010, 62, (3), 305-315.

UCHEGBU, I., Introduction. In *Polymers in drug delivery*, Uchegbu, I.; Schatzlein, A., Eds. Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S., Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science* 2008, 33, (11), 1088-1118.

KIM, S.; KIM, J.-H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K., Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009, 71, (3), 420-430.

FREIBERG, S.; ZHU, X., Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 282, (1-2), 1-18.

LEE, K. Y.; YUK, S. H., Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science* 2007, 32, (7), 669-697

GUERRA RNM, BARROQUEIRO ESB, CHAGAS AP. Increase of self-antibodies and glucose levels in mice treated with babassu (*Orbignya phalerata*, Palmae). *Scandinavian Journal of Immunology*, p. 54-66, 2001.

GUERRA RNM, BRITO RM, MAIA MS, SOARES SM. Aumento da produção de auto-anticorpos em animais tratados com extrato bruto de babaçu ou com sua fração metanólica. *Resumo In: XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE*;1:390, 1998.

GUERRA RNM, SILVA VMG, ARAGÃO-FRANÇA LS, OLIVEIRA PR, FEITOSA R, NASCIMENTO FRF, CARVALHO LCP. Babassu aqueous extract (BAE) as an adjuvant for T helper (Th)1-dependent immune responses in mice of a Th2 immune response-prone strain. *BioMedCentral of Immunology*, 12: 1-8, 2011.

HADIGHI R, MOHEBALI M, BOUCHER P, HAJJARAN H, KHAMESIPOUR A, OUELLETTE M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drugresistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS Medicine*, 3: 659-667, 2006.

HANDMAN E, BULLEN DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 8, 332- 334, 2002.

HEBY O, PERSSON L., RENTALA M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas disease, and Leishmaniasis. *Amino Acids*, 33: 359-366, 2007.

HEDRICH CM, BREM JH. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunologic Research*, 47:185-206, 2010.

HINES DJ, KAPLAN DL. Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 30: 257-276, 2013.

HORIKAWA MM, PEÑA MS. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: strategies for a successful infection. *Revista da Biologia* 6b: 32-37, 2011.

IBGE-- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da Extração vegetal e da Silvicultura, ISSN 0103-8435. Rio de Janeiro, v. 30, p.1-48, 2015

IBGE, Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura 2008. Rio de Janeiro: IBGE, 2009. em:< <http://mapas.ibge.gov.br/interativos/ferramentas/censo-2010>>. Acesso em: 14 Jan. 2017.

INACIO JDF, CANTO-CAVALHEIRO MM, S. MENNA-BARRETO RF, ALMEIDA-AMARAL EE (2012) Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology* 132: 151–155.

INIESTA V, CARCELE NJ, MOLANO I, PEIXOTO PM, REDONDO E. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infection Immunity* 73: 6085–6090, 2005.

JAIN R, SHAH NH, MALICK AW, RHODES CT. Controlled drug delivery by biodegradable poly (ester) devices: different preparative approaches. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24: 703-727, 1998.

KAYE P, SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Review Microbiology*, 9: 604-14, 2011.

KUNOU A, OGURA Y, YASUKAWA T, KIMURA H, MIYAMOTO H, HONDA Y, YKADA Y. Long term sustained release of ganciclovir from biodegradable scleral implant for the treatment of *Cytomegalovirus* retinitis. *Journal of Control Release*, 68: 263-271, 2000.

LAINSON R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92:377-87,1997.

LIMAJRO, SILVA RB, SILVA CCM, SANTOS LSS, SANTOS JRJr, MOURA EM MOURA CVR. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. *Química Nova*, 30: 600-603, 2007.

LIMA JUNIOR, JAC; COSTA, GC; REIS, AS; BEZERRA, JL; PATRÍCIO, FJB; SILVA, LA; AMARAL, FMM; NASCIMENTO, FRF. Inibição da infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. *Revista de Ciências de Saúde*, 16: 46-53, 2014.

LINARES E, AUGUSTO O, BARÃO SC, GIORGIO S. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *Journal of Parasitology*. 86, 78-82, 2000.

MANTOVANI, A., SICA, A., LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, 23: 344-346, 2005.

MARTINEZ FO, HELMING L, GORDON S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27: 451– 483, 2009. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532

MARTINEZ PA, PETERSEN CA. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. *Immunologic Research*,59: 153-165, 2014. doi:10.1007/s12026-014-8535-y.

MCCONVILLE MJ, HANDMAN E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*. 10, 1047-1051, 2007.

MCCONVILLE MJ, TURCO SJ, FERGUSON MA, SACKS DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO Journal*. 10, 3593-3600, 1992.

MEHNERT W, MADER K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Review*, 47: 165-196, 2001.

MITCHELL RN. Innate and adaptive immunity: the immune response to foreign materials. In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (Eds.), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 304–318, 2004.

MUKHOPADHYAY M, MUKHERJEE S, ROY S, DALTON JE, KUNDU S, SARKAR A, DAS NK, KAYE PM, CHATTERJEE M. M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(10): e0004145, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0004145

MUKHOPADHYAY R, DEY S, XU N, GAGE D, LIGHTBODY J, OULLETTE M, ROSEN BP. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania tarentolae*. *Proceedings. Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 93: 10383-10387, 1996.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000, 50, (1), 161-177.

MURAKAMI H, KOBAYASHI M, KAMADA M, TAKEUCHI H, KAWASHIMA Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmacology*, 187: 143, 1999.

MURRAY HW. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 2185-2197. 2001.

NASCIMENTO FRF, BARROQUEIRO ESB, AZEVEDO APS, FERREIRA SCP, SILVA LA, MACIEL MCG, RODRIGUEZ D, GUERRA RNM. Macrophage activation by *Orbignya phalerata* (babassu). *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 53-58, 2006.

NEGRÃO GN; FERREIRA MEMC. Circuitos espaciais da leishmaniose tegumentar americana no estado do Paraná. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 9: 74 - 94, 2013.

NICOLETE R, LIMA KDE M, JUNIOR JM, BARUFFI MD, DE MEDEIROS AI, BENTLEY MV, SILVA CL, FACCIOLI LH. *In vitro* and *in vivo* activities of leukotriene B₄- loaded biodegradable microspheres. *Prostaglandins Other Lipid. Mediators*. 83, 121–129., 2007.

NICOLETE R, RIUS C, PIQUERAS L, JOSE PJ, SORGI CA, SOARES EG, SANZ, MJF, FACCIOLI LH. Leukotriene B₄-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. *BMC Immunology*. 9, 36, 2008.

NICOLETE R, SANTOS DF, FACCIOLI LH. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct *in vitro* inflammatory response. *International Immunopharmacology*, 11:1557–1563, 2011.

NIWA T, TAKEUCHI H, HINO T, KUNOU N, KAWASHIMA Y. Preparation of biodegradable nanoparticles of water-soluble and insoluble drugs with D, L - lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *Journal of Control Release*, 25: 89–98, 1993.

NUNES AC, ALMEIDA-CAMPOS FR, HORTA MF, RAMALHO-PINTO FJ. *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology*, 115: 601-609,1997.

OLIVEIRA GA, SCARPA VM, BUENO FHJ, EVANGELISTA CR. Micro e nanocápsulas. Um eficiente sistema com dimensões reduzidas para liberação controlada e direcionamento de fármacos. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, 14: 37-49, 1992.

PEARSON RD, SOUSA AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clinical and Infectious Diseases*, 22:1-13, 1996.

PETERS W, EVANS DA, LANHAM SM. Importance of parasite identification in cases of leishmaniosis. *Journal of the Royal Society of Tropical Medicine*, 27: 67-72, 1983.

PETERS W, EVANS DA, LANHAM SM. Importance of parasite identification in cases of leishmaniosis. *Journal of the Royal Society of Tropical Medicine*, 27:67-72, 1983.

PHILLIPS KS, CHENG Q. Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,387:1831–1840, 2007.

READY PD. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58:227–50, 2013.

REGUERA RM, TEKWANI BL, BALAÑA-FOUCE R. Polyamine transport in parasites: a potential target for new anti-parasitic drug development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 140:151-164 2005.

REY L. Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

RIBEIRO TG, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, VALADARES DG, et al. Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 877 - 890, 2014. doi:10.2147/IJN.S55678.

RILEY E, ROBERTS SC, ULLMAN B. Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I. *International Journal of Parasitology*, 41: 545–552, 2011.

ROBERTS MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin*, 75: 115–130, 2005.

RODRIGUES AM, HUEB M, SANTOS TA, FONTES CJ. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39: 139-145, 2006.

ROJAS R, VALDERRAMA L, VALDERRAMA M, VARONA MX, OUELLETTE M, SARAVIA NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *Journal of Infectious Disease*, 193: 1375-1383, 2006.

ROMÃO PRT, FONSECA SG, HOTHERSALL JS, NORONHA-DUTRA AA, FERREIRA SH, CUNHA FQ.. Glutathione protects macrophages and *Leishmania major* against nitric oxide-mediated cytotoxicity. *Parasitology*, 118: 559-566, 1999.

ROMERO AL, MORILLA MJ. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opinion Drug Delivery*, 5: 805-823, 2008.

ROQUE ACA. Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery Methods and Protocols. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010.

ROSENTHAL FRT. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 6: 29-33, 1975.

ROSSI D, ZLOTNIK A. The Biology of Chemokines and Their Receptors. *Annual Review of Immunology*, 18: 217-242, 2000.

RUSSEL DG, WILHELM H. The involvement of the major surface glycoprotein (GP63) of *Leishmania promastigotes* in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology*, 7: 2613-2620, 1986.

SABAT R, GRÜTZ G, WARSZAWSKA K, KIRSCH S, WITTE E, WOLK K, GEGINAT J. Biology of interleukin-10. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 21: 331–344, 2010.

SALEM SA, HWEI NM, SAIM AB, HO CCK, SAGAP I, SINGH R, YUSOF MR, MD ZAINUDDIN Z, BT. HJ IDRUS R. Polylactic-co-glycolic acid mesh coated with fibrin or collagen and biological adhesive substance as a prefabricated, degradable, biocompatible, and functional scaffold for regeneration of the urinary bladder wall. *J Journal of Biomedical Materials Research*, 101A: 2237–2247, 2013.

SCHAFFAZICK SR, GUTERRES SS, FREITAS LL, POHLMANN AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, 26: 726-737, 2003.

SHAHA C. Apoptosis in *Leishmania* species and its relevance to disease pathogenesis. *The Indian Journal of Medical Research*, 3: 233-244, 2006.

SHENOY DB, ANTIPOV AA, SUKHORUKOV GB, MOHWALD H. Layer-by-layer engineering of biocompatible, decomposable core-shell structures, *Biomacromolecules*, 4: 265– 272, 2003.

SILVA BP, PARENTE JP. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*, 72: 887-893, 2001.

SILVERSTEIN RM, WEBSTER FX, KIEMLE DJ. Spectrometric Identification of Organic Compounds 8th ed. p. 71-105, John Wiley & Sons 2014.

SINAN/SVS/MS-Sistema de Informação de Agravos de Notificação/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. 2014. Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2015. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>

SOLBACH W, LASKAY T. Evasion Strategies of Leishmania Parasites. In Molecular and Immune Mechanisms in The Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Eds F.J.Tapia, G.Cáceres-Dittmar & M.A.Sanches. pp. 25-47,1996.

SOUZA MH, MONTEIRO CA, FIGUEREDO PM, NASCIMENTO FR, GUERRA RNM. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phareolata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhao, Brazil. Journal of Ethnopharmacology, 133: 1-5, 2011.

SUNDAR S, RAI M, VERMA DK, NAWIN K, ALAM S, CHAKRAVARTY J, VAILLANT M, VERMA N, PANDEY K, KUMARI P, LAL CS, ARORA R, SHARMA B, ELLIS S, STRUB-WOURGAFT N, BALASEGARAM M, OLLIARO P, DAS P, MODABBER F.. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. Lancet, 377: 477-486, 2011.

TAKELE Y, ABEBE T, WELDEGEBREAL T, HAILU A, HAILU W, HURISSA Z, ALI J, DIRO E, SISAY Y, CLOKE T, MODELELL M, MUNDER M, TACCHINI-COTTIER F, MÜLLER I, KROPF P. (2013) Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. PloS Neglected Tropical Disease, 7:e1977

TROMBONE APF, SILVA CL, ALMEIDA LP, ROSADA RS, LIMA KM, OLIVER C. Tissue distribution of DNA-Hsp65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptakes by phagocytic cells. Genetic Vaccine Therapy, 5: 1-8, 2007.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/50237823>>. Acesso em: 20 Out. 2016.

UHRICH KE, CANNIZZARO SM, LANGER RS, SHAKESHEFF KM. Polymeric systems for controlled drug release. Chemical Reviews, 99, p. 3181-3198, 1999.

UNDERHILL DM, OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annual Review of Immunology, 20: 825-852, 2002.

VAN GRIENSVEN J, BALASEGARAM M, MEHEUS F, ALVAR J, LYNEN L ; BOELAERT M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. Lancet Infectious Diseases, 10: 184–194, 2010.

VERRECK FA, DE BOER T, LANGENBERG DM, HOEVE MA, KRAMER M, VAISBERG E, KASTELEIN R, KOLK A, DE WAAL-MALEFYT R, OTTENHOFF TH. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10- producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 4560– 4565, 2004.

WALTER E, DREHER D, KOK M, THIELE L, KIAMA SG, GEHR P, MERKLE HP, Hydrophilic poly(dl-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells, The Journal of Controlled Release 76, 149–168, 2001.

WANDERLEY JL, BARCINSKI MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. Cellular and Molecular Life Sciences. 67, 1653-1659, 2010.

WANG F, LIU X, YUAN J, YANG S, LI Y, GAO Q. Synthesis and characterization of poly(lactic acid-co-glycolic acid) complex microspheres as drug carriers. *Journal of Biomaterials Applications*, 31: 544 – 552, 2016.

WISCHKE C, SCHWENDEMAN SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 298-327-08 Dec., 2008.

WOLDAY D, BERHE N, AKUFFO H, DESJEUX P, BRITTON S. Emerging Leishmania/HIV Co-infection in Africa. *Medical Microbiology and Immunology*, 190: 65-67, 2001.

World Health Organization. 2015. Leishmaniasis status of endemicity of cutaneous leishmaniasis:2015 World Health Organization, Global Health Observatory (GHO) data: Leishmaniasis. http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.

WYLLIE S, CUNNINGHAM ML, FAIRLAMB AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 39925-39932, 2004.

YASINZAI M, KHAN M, NADHMAN A, SHAHNAZ G. Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives *Future Medicine and Chemistry*, 5: 1877–1888, 2013.

YING AND, GROETTRUP M. PLGA microspheres for improved antigen delivery to dendritic cells as cellular vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 475-482, 2005.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo publicado na revista Journal of Medicinal Plants
Research:

Sensitization with babassu mesocarp induces activation of
murine splenocytes against tumor cells

Full Length Research Paper

Sensitization with babassu mesocarp induces activation of murine splenocytes against tumor cells

Leticia Prince P. Pontes¹, Josemar M. F. Godinho Jr.¹, Elza Moraes¹, Diego S. Arruda¹, Caroline S. C. Almeida², Mayara C. Pinto³, Graciomar C. Costa⁴, Rosane N. M. Guerra⁴, Luce M. B. Torres⁵, Vanessa F. Oliveira⁷, Flávia R. F. Nascimento⁴ and Ana P. S. Azevedo-Santos^{6*}

¹Health Sciences Graduate Program, Biological and Health Sciences Center (UFMA), Brazil.

²Medical Faculty, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão (UFMA), Brazil.

³Medical Faculty, Pinheiro Campi-Federal University of Maranhão (UFMA), Brazil.

⁴Department of Pathology, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão (UFMA), Brazil.

⁵Botanic Institute, Center for Research in Ecology and Physiology - São Paulo, SP, Brazil.

⁶Department of Physiology Sciences, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhão (UFMA), Brazil.

⁷Health Sciences Center, Mogi das Cruzes University - São Paulo, SP, Brazil.

Received 8 July, 2016; Accepted 29 August, 2016

Attalea speciosa Mart. (babassu) fruit contains a mesocarp that is rich in carbohydrates with immunomodulatory effects. The induction of the tolerogenic response is a tumor escape mechanism, and immunomodulator adjuvants have been studied to reestablish host immunogenicity. This study evaluates the adjuvant potential of babassu mesocarp carbohydrates in a tumor model. The babassu mesocarp extraction (BME) yield was 75.54%, and the total sugar concentration was 29.79 mg ml⁻¹ containing monosaccharides, reducing sugars, polysaccharides and 0.506 mg ml⁻¹ total protein. Chromatography analysis identified glucose, sucrose and fructose. Sensitization increased the spleen weight in the tumor group compared with the control, and a comparatively lower frequency of T helper and higher frequency of B-lymphocytes was also observed. The tumor+BME group had more cytotoxic T lymphocytes compared with the control. After co-culture with cancer cells, the tumor splenocytes showed lower proliferation, lower frequency of T helper cells and higher concentrations of interleukin (IL)-2, IL-6 and IL-10. However, the tumor+BME splenocytes presented results similar to the control, suggesting a reduction in the regulatory response of the tumor group. These results demonstrated that BME sensitization with cancer cells modulated an immune response in Balb/c animals, indicating an immunogenic effect.

Key words: Arecaceae, *Attalea speciosa* Mart., adjuvant, carbohydrate, antitumor.

INTRODUCTION

The palm tree *Attalea speciosa* Mart., known as babassu, is a common species in Northeastern Brazil. The mesocarp of babassu fruit predominantly consists of

carbohydrates (Silva and Parente, 2001) and is popularly used as a health food. Previous studies have demonstrated that the babassu mesocarp has been

ANEXO B

NORMAS DA REVISTA ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY

