



* B R 1 0 2 0 2 3 0 1 0 3 5 3 A 2 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023010353-7 A2

(22) Data do Depósito: 29/05/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
10/12/2024

(54) **Título:** USO DE NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE FERRO E POLÍMERO CONDUTOR COMO PLATAFORMA TERAPÊUTICA PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

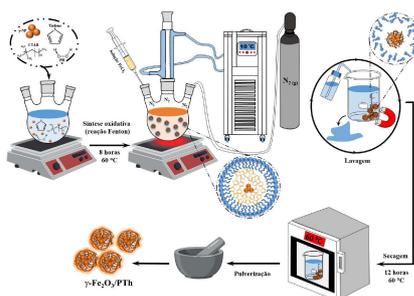
(51) **Int. Cl.:** C08L 65/00; C08G 61/12; A61K 33/26; A61P 33/02; B82Y 5/00.

(52) **CPC:** C08L 65/00; C08G 61/126; A61K 33/26; A61P 33/02; B82Y 5/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** ELTON MARLON DE ARAÚJO LIMA; ROMÁRIO JUSTINO DA SILVA; VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA; GABRIELA PLAUTZ RATKOVSKI; BRUNA GOMES MACIEL; ALICIA ELIZABETH CHÁVEZ GUAJARDO; REGINA CELIA BRESSAN QUEIROZ DE FIGUEIREDO; CELSO PINTO DE MELO.

(57) **Resumo:** USO DE NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE FERRO E POLÍMERO CONDUTOR COMO PLATAFORMA TERAPÊUTICA PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR. A presente invenção se estende ao uso de nanocompósitos magnéticos de óxido de ferro e polímeros intrinsecamente condutores (PIC) como uma efetiva plataforma seletiva para o tratamento de leishmaniose tegumentar. A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) associadas a uma maior vulnerabilidade social em países em desenvolvimento, em que frações significativas de sua população estão ainda sujeitas à escassez de serviços básicos como saneamento, moradia adequada e acesso a tratamentos de saúde, o que contribui para o aumento do número de casos de infecção dessa doença. A presente proposta de inovação se baseia na utilização de um nanomaterial magnético constituído de óxido de ferro e PIC como um agente terapêutico para essa DTN, que apresenta boa citocompatibilidade e promissoras atividades leishmanicidas, aliando uma boa eficácia com alta seletividade pelo parasita frente à célula hospedeira (macrófago).



USO DE NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE FERRO E POLÍMERO CONDUTOR COMO PLATAFORMA TERAPÊUTICA PARA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

[1] A presente invenção se estende ao uso de nanocompósitos magnéticos de óxido de ferro e polímeros intrinsecamente condutores (PIC) como uma efetiva plataforma seletiva para o tratamento de leishmaniose tegumentar. A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) associadas a uma maior vulnerabilidade social em países em desenvolvimento, em que frações significativas de sua população estão ainda sujeitas à escassez de serviços básicos como saneamento, moradia adequada e acesso a tratamentos de saúde, o que contribui para o aumento do número de casos de infecção dessa doença. Em consequência de seus altos índices de prevalência, incidência e mortalidade, essa DTN é considerada como um problema de saúde pública que afeta a qualidade de vida dos indivíduos por ela acometidos. No tratamento dessa parasitose, a diversidade genética dos parasitos que a causam (*Leishmania*) e a complexidade de suas manifestações clínicas estão por trás da variabilidade na obtenção de uma resposta terapêutica eficiente e satisfatória. A terapia mais atual para o tratamento da leishmaniose envolve o uso de drogas antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina. Ocorre que, apesar da eficácia comprovada e de sua razoável disponibilidade para os pacientes, esses medicamentos apresentam desvantagens que impactam negativamente o seu uso de maneira mais ampla, como seu alto valor comercial, a possibilidade de reações adversas (como toxicidade renal e cardíaca) e até mesmo a possibilidade de aparecimento de resistência por parte dos parasitos. A existência desses fatores limitantes tem impulsionado a busca por novas estratégias biotecnológicas para o tratamento da leishmaniose, como a

investigação de novos dispositivos de entrega controlada de drogas anti-*Leishmania* para atuação específica na célula alvo (parasito) e o desenvolvimento de plataformas terapêuticas com menores efeitos tóxicos para as células do hospedeiro. A presente proposta de inovação se baseia na utilização de um nanomaterial magnético constituído de óxido de ferro e PIC como um agente terapêutico para essa DTN, que apresenta boa citocompatibilidade e promissoras atividades leishmanicidas, aliando uma boa eficácia com alta seletividade pelo parasita frente à célula hospedeira (macrófago).

→ **Antecedentes da invenção**

[2] Nas últimas décadas, o uso de materiais e técnicas da nanotecnologia tem se destacado por permitir o aperfeiçoamento e a superação de limitações no diagnóstico da leishmaniose, a redução dos efeitos colaterais de terapias existentes, e o aumento da eficácia de novas drogas e de sistemas terapêuticos anti-*Leishmania*, por meio da indução de respostas imunes efetivas e direcionadas aos parasitas causadores desta doença. Nesse contexto, as nanopartículas magnéticas (NMs) têm sido uma das classes de materiais inorgânicos extensivamente investigados, por apresentarem múltiplas vantagens comparativas, como propriedades ferromagnéticas ou ferrimagnéticas, baixa toxicidade em relação a sistemas biológicos e boa estabilidade química.

[3] Em particular, nanopartículas de óxido de ferro vêm se destacando devido a seu potencial terapêutico contra Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT), tanto na sua forma pura (óxido) quanto quando usadas como um arcabouço para posterior funcionalização e/ou recobrimento com agentes ativos capazes de combater os agentes etiológicos dessas doenças. Por sua vez, além dessas estruturas inorgânicas, os tiofenos e seus derivados, uma classe de

moléculas orgânicas heterocíclicas aromáticas contendo enxofre, têm chamado a atenção por apresentar um versátil potencial biológico e farmacológico, com efeitos antifúngicos, antitumorais e anti-inflamatórios já investigados.

[4] Adicionalmente, o efeito leishmanicida de tiofenos sobre espécies distintas de parasitos causadores da LV e LT tem sido reportada, com destaque para sua ação sobre a *Leishmania amazonensis*, espécie que é a principal causadora da LT no Brasil. O tiofeno é o monômero, isto é, a estrutura repetitiva que dá origem ao politiofeno (PTh), um polímero intrinsecamente condutor (PIC) que possui um sistema π conjugado ao longo da sua cadeia, e que apresenta propriedades eletrônicas que podem ser variadas à medida que se ajusta a concentração de dopantes, isto é, substâncias capazes de lhe retirar ou adicionar elétrons, o que lhe permite passar de um estado isolante para um semicondutor.

[5] Recentemente, o desenvolvimento de novos produtos nanobiotecnológicos baseados em NMs e/ou PIC se apresenta como uma oportunidade de avanços para o tratamento e diagnóstico de doenças infecciosas negligenciadas, como a leishmaniose. Para o tratamento dessa parasitose, várias abordagens terapêuticas baseadas em NMs vêm se destacando, abrindo a possibilidade da ocorrência simultânea de um potencial leishmanicida contra os parasitas causadoras da LV e LT. Assim, aliar NMs e PICs pode resultar na criação de uma plataforma de tratamento eficiente especialmente direcionado para o tratamento da leishmaniose tegumentar, a forma mais prevalente dessa doença entre nós. Dessa forma, diversos nanomateriais magnéticos que foram utilizados com finalidade terapêutica contra a leishmaniose são listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Patentes e artigos de diferentes nanomateriais magnéticos aplicados como plataforma terapêutica para a leishmaniose

Patente/Artigo	Nanomaterial magnético	Espécie do patógeno	Estágios de desenvolvimento dos parasitas utilizados
Khan, Zia Ul Haq <i>et al</i> (2022)	FeO-NPs	<i>Leishmania tropica</i>	Promastigota
Albalawi, Aishah E. <i>et al</i> (2021)	Fe ₃ O ₄ @PO	<i>Leishmania major</i>	Promastigota e amastigota
Kannan, Sriram <i>et al</i> (2021)	PEI ₂₅ -CAN-γ-Fe ₂ O ₃	<i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania donovani</i>	Promastigota e amastigota
Iqbal, Javed <i>et al</i> (2020)	Nanopartículas de ferro	<i>Leishmania tropica</i>	Promastigota e amastigota
Abbasi, Banzeer Ahsan <i>et al</i> (2019)	Nanopartículas de ferro	<i>Leishmania tropica</i>	Promastigota e amastigota
Berry, Sarah L. <i>et al</i> (2019)	Fe ₃ O ₄ comercial	<i>Leishmania mexicana</i>	Promastigota e amastigota
Islam, Arshad <i>et al</i> (2020)	Nanobastões de óxido de ferro	<i>Leishmania tropica</i>	Promastigota e amastigota
Abazari, Reza <i>et al</i> (2018)	Fe ₃ O ₄ @bio-MOF	<i>Leishmania major</i>	Promastigota e amastigota
Zomorodian, Kamiar <i>et al</i> (2018)	Fe ₃ O ₄ @PEG-Ag	<i>Leishmania major</i>	Promastigota
Hassan, Dilawar <i>et al</i> (2018)	α-Fe ₂ O ₃ biossintetizadas	<i>Leishmania tropica</i>	Promastigota e amastigota
Kumar, Rishikesh <i>et al</i> (2017)	Fe ₃ O ₄ @Gly@AmB	<i>Leishmania donovani</i>	Promastigota
Khatami, Mehrdad <i>et al</i> (2017)	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄	<i>Leishmania major</i>	Promastigota

Khalil, Ali Talha <i>et al</i> (2017)	Nanopartículas de Fe ₂ O ₃ biossintetizadas	<i>Leishmania tropica</i>	Promastigota e amastigota
BR 10 2017 004291 0 A2	Nanopartículas de magnetita/quitosana /polianilina	<i>Leishmania chagasi</i>	-

Fe₃O₄: nanopartícula de óxido de ferro (magnetita); PO: Piroctona Olamina; PEI₂₅: Polietilenoimina (PEI 25 KDa); CAN: nitrato de amônio cérico; γ-Fe₂O₃: nanopartícula de óxido de ferro (maghemita); Bio-MOFs: obtidos a partir de uma mistura de di-hidrato de acetato de zinco (0,375mmol), adenina (0,125mmol), ácido 4,4'-bifenil di-carboxílico (BPDC) (0,25mmol), DMF (13,5mL), H₂O (1mL) e ácido nítrico (1mmol); PEG: polietilenoglicol; Ag: prata; Gly: glicina; AmB: anfotericina B; FeO-NPs: nanopartículas de óxido de Fe.

[6] Khan *et al* (2022) obtiveram nanopartículas de óxido de ferro (FeO-NPs) a partir de uma rota verde utilizando extratos vegetais. Dentre as propriedades biomédicas investigadas, os autores verificaram o potencial anti-*Leishmania* das FeO-NPs em formas promastigotas de *Leishmania tropica*. As FeO-NPs exibiram concentração de inibição de 50% das promastigotas de *Leishmania tropica* mais significativas do que o fármaco de referência (Glucantime) utilizado como controle positivo para o teste.

[7] Albalawi, A. E. *et al* (2021) descreveram a síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com Piroctona Olamina (Fe₃O₄@PO) e seu efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* contra espécies causadoras da leishmaniose cutânea. Os resultados indicaram a alta eficiência do nanomaterial Fe₃O₄@PO na inibição do crescimento de formas amastigotas de *L. major*, bem como uma boa recuperação e melhora da leishmaniose cutânea induzida por *L. major* em camundongos (BALB/c) sem citotoxicidade significativa.

[8] Kannan, S. *et al* (2021) desenvolveram um nanofármaco com atividade anti-*Leishmania* usando nanopartículas de maghemita nanoestruturadas que foram dopadas na superfície por $[CeLn]^{3/4+}$ para permitir a ligação efetiva do policatiônico polímero de polietilenoimina (PEI) através da química coordenativa. O nanofármaco resultante, denominado Nano-Leish-IL, foi utilizado em formulações para uso tópico. A aplicação tópica de Nano-Leish-IL foi capaz de reduzir a infecção por *L. major* em camundongos.

[9] Iqbal, J. *et al* (2020) relataram uma rota fácil e ecologicamente correta para a síntese de nanopartículas de ferro (FeNPs), usando extrato vegetal como agente redutor e estabilizante. O potencial leishmanicida demonstrou que houve um efeito dose-dependente das FeNPs, ou seja, quanto maior a dose de tratamento com as FeNPs maior a inibição desses parasitas (amastigotas e promastigotas de *L. tropica*).

[10] Abbasi, B. A. *et al* (2019) descreveram a obtenção de nanopartículas de ferro a partir de extrato de plantas. Dentre as atividades microbianas avaliadas pelos autores, foi obtida a atividade leishmanicida das nanopartículas ferro obtidas contra formas promastigotas e amastigotas de *L. tropica*. As nanopartículas de ferro mostraram uma inibição dose-dependente da atividade de *L. tropica*, com o potencial de ação anti-*Leishmania* sendo maior à medida que a concentração das nanopartículas foi aumentada.

[11] Berry, Sarah L. *et al* (2019), usando nanopartículas magnéticas de óxido de ferro comerciais, avaliaram a hipertermia magnética como um método *in vitro* localizado baseado em calor para matar parasitas de *Leishmania mexicana*, em dois estágios de desenvolvimentos: promastigotas e amastigota diferenciada (axênica). Os resultados demonstraram que a hipertermia magnética gerada pelas nanopartículas de Fe_3O_4 , é um método capaz para matar formas amastigotas

(hospedeiro), com alterações morfológicas consistentes com o tratamento térmico.

[12] Islam, A. *et al* (2020) reportaram a síntese e caracterização de nanobastões ferromagnéticos de óxido de ferro. Adicionalmente, demonstraram que esses nanobastões apresentaram excelente atividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. tropica*, quando irradiadas por 15 min de exposição à luz do diodo emissor de luz de pré-incubação (84 lm/W), o que resultou na geração de espécies reativas de oxigênio e indução de morte celular desses parasitas por apoptose celular.

[13] Abazari, R. *et al* (2018) apresentam a obtenção de um nanocompósito magnético biometalorgânico (MBMOF) com morfologia porosa, que foi sintetizado através de uma abordagem sonoquímica simples. Os efeitos do nanocompósito magnético (Fe_3O_4 @bio-MOF) sobre a *Leishmania major* foi determinado tanto *in vitro* quanto em *in vivo*, quando foi demonstrado ser o nanocompósito capaz de suprimir as formas promastigotas e amastigotas desta espécie. As lesões cutâneas causadas pela infecção por *L. major* em camundongos apresentaram diminuição quando tratadas com o nanocompósito de Fe_3O_4 @bio-MOF.

[14] Zomorodian, K. *et al* (2018) descreveram a obtenção de um nanocompósito (núcleo@casca) de Fe_3O_4 @PEG-Ag em soluções aquosas através de co-precipitação química. O nanocompósito mostrou uma notável atividade contra vários microrganismos patogênicos, entre eles formas promastigotas de *L. major*. Em todos os grupos tratados com o nanocompósito, houve inibição em mais de 50% dos parasitas de *L. major*.

[15] Hassan, D. *et al* (2018) observaram que a eficácia do tratamento de formas amastigotas e promastigotas de *L. tropica* com $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ extraídas de compostos naturais era dependente da concentração, sendo 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a concentração letal para formas promastigotas, com

uma inibição dose-dependente também ocorrendo para formas amastigotas.

[16] Kumar, R. *et al* (2017) relataram o desenvolvimento de um nanocompósito baseado em nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) revestidas com peptídeo (glicina) e anfoterecina B (AmB) - fármaco de referência - contra a leishmaniose visceral. Os resultados obtidos a partir deste estudo revelaram que o nanocompósito encapsulado com AmB ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Gly}@\text{AmB}$) foi duas vezes mais eficaz do que a AmB pura, abrindo, portanto, um novo caminho para o uso de nanocompósitos magnéticos como uma plataforma de carregamento e liberação controlada de drogas contra leishmaniose.

[17] Khatami, M. *et al* (2017) determinaram a atividade leishmanicida de nanopartículas biogênicas de óxido de ferro (Fe_3O_4) contra formas promastigotas de *L. major*. Os autores determinaram que a concentração de Fe_3O_4 capaz de inibir 50% desses parasitas foi de 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

[18] Khalil, A. T. *et al* (2017) demonstraram que nanopartículas de Fe_2O_3 bioinspiradas apresentaram inibição significativa contra o parasita *Leishmania* na forma promastigota, bem como na forma amastigota. A concentração capaz de inibir 50% desses parasitas foi determinada como sendo 17,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 16,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para promastigota e amastigota, respectivamente, o que permitiu a conclusão de que esse nanomaterial magnético tem possibilidade ser usado em terapias anti-*Leishmania*.

[19] A patente (BR 10 2017 004291 0 A2) descreve a aplicação de uma sequência curta de oligonucleotídeos (sonda de DNA) ligados eletrostaticamente à superfície de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) revestidas com quitosana e polianilina. Esta plataforma foi utilizada identificação de sequências específicas do DNA da *Leishmania chagasi* em amostras de cães infectados.

[20] Diante do apresentado, fica estabelecido que até o presente momento não foi descrita a utilização dos nanocompósitos de óxido de ferro e PIC como plataforma terapêutica para leishmaniose tegumentar.

→ **Sumário**

[21] A presente invenção apresenta uma nova plataforma simples, eficiente e seletiva para a inativação dos parasitas da *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* em seus estágios de desenvolvimento promastigota (hospedeiro invertebrado) e amastigota (hospedeiro vertebrado) através do uso de um nanocompósito híbrido formado por um núcleo magnético de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) recoberto por uma camada do polímero condutor politiofeno (PTh). Os danos causados em ambos os estágios de desenvolvimento dos parasitas de *Leishmania* utilizados nesta presente invenção estão associados com a redução nos níveis de ATP, observada no ensaio de viabilidade celular, e assim danos mitocondriais podem ser determinantes na atividade leishmanicida do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PTh. Os tripanossomatídeos (protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, constituída por parasitos de outros protozoários, plantas e animais, e que possui dois gêneros de importância médica: *Leishmania* e *Trypanosoma*) efetuam seu metabolismo energético através de reações de fosforilação oxidativa (contribuem para a produção de ATP), de modo que danos à única mitocôndria em *Leishmania* podem levar ao comprometimento da síntese de moléculas energéticas essenciais, consequentemente resultando em morte.

[22] Inicialmente, a invenção descreve os métodos utilizados para a síntese e caracterização dos nanocompósitos de óxido de ferro e PICs. Para esse fim, primeiramente foram obtidas nanopartículas de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) via co-precipitação química, de acordo com Chávez-

Guajardo *et al*, 2015. Posteriormente, foi realizado o revestimento das nanopartículas com o polímero intrinsecamente condutor, politiofeno, através de uma rota química de polimerização composta (microemulsão e reação Fenton) em atmosfera inerte. As caracterizações químicas e morfológicas das γ -Fe₂O₃ e do γ -Fe₂O₃/Pth foram realizadas através das técnicas de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), determinação do diâmetro das nanopartículas, espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS) e medidas de curva de magnetização.

[23] Em um segundo aspecto, a atual invenção descreve uma metodologia que faz uso do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth, para o qual não existem precedentes de uso como uma plataforma terapêutica para leishmaniose tegumentar.

[24] Em outro aspecto, o método terapêutico de inibição dos protozoários da leishmaniose tegumentar utilizando o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth, mesmo que preferencialmente aplicável aos parasitas das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, não se limita apenas a esses gêneros, podendo ser adaptado para outras espécies e ensaios experimentais.

[25] Pelo termo “óxido de ferro” entenda-se compostos formados por ferro (Fe), oxigênio (O) ou grupos hidroxila (OH). Existem 16 óxidos de ferro, os quais estão classificados em óxidos, hidróxidos ou óxido-hidróxidos. Os dois óxidos de ferro mais usados são a magnetita (Fe₃O₄) e a maghemita (γ -Fe₂O₃), devido a suas excelentes propriedades magnéticas, que fazem com que sejam de grande interesse em diferentes áreas da ciência. Em particular, estes óxidos têm atraído muito atenção em sua forma nanoparticulada. Na presente patente foram utilizadas nanopartículas de maghemita.

[26] Pelo termo “politiofeno” entenda-se, o polímero condutor obtido a partir da polimerização do monômero tiofeno por rota química ou eletroquímica. Esse polímero possui interessantes características, tais como baixo custo de síntese, biocompatibilidade, e propriedades elétricas especiais. A estrutura básica do politiofeno e seus derivados consiste no acoplamento nas posições 2 e 5 (acoplamento α , α') de unidades monoméricas compostas por anéis pentagonais cíclicos que possuem como heteroátomo o enxofre.

[27] Pelo termo “nanocompósito” entenda-se material que possui pelo menos dois componentes ou duas fases, e onde pelo menos um dos componentes tem dimensões na escala nanométrica. As propriedades físicas e químicas dos componentes individuais são distintas, porém ao serem misturados resulta um nanocompósito que adquire características diferenciadas.

[28] Pelo termo “Leishmaniose tegumentar” compreende-se como sendo uma doença infecciosa, não contagiosa, que provoca úlceras na pele e mucosas, com o comprometimento localizado, disseminado ou difuso de lesões cutâneas ou mucocutâneas. A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, existem várias espécies desses parasitos que estão envolvidas na ocorrência de casos de LT, sendo as mais comuns a *Leishmania amazonensis*, a *L. (Viannia) guyanensis* e a *L. braziliensis*. A transmissão da doença ao ser humano se dá através da picada das fêmeas de flebotomíneos (uma espécie de mosca) infectadas. Esse parasita intracelular das células do sistema fagocítico mononuclear costuma se apresentar em duas formas principais: uma flagelada, ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra, aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados.

[29] Pelo termo “Despolarização da membrana mitocondrial” compreende-se o dano causado por agente externo que compromete a membrana da única mitocôndria dos parasitos de leishmania levando a processos de morte celular.

→ **Problemas e limitações do estado da técnica**

[30] As drogas de primeira linha para o tratamento da leishmaniose apresentam alta toxicidade e resultam numa série de efeitos colaterais indesejáveis, levando conseqüentemente, a uma baixa aceitação dos pacientes em aderir ao tratamento. Tem sido relatado que os parasitos de *Leishmania* vêm apresentando resistência a essas drogas. Materiais nanoestruturados surgem como uma alternativa atraente uso em plataformas terapêuticas para esta parasitose devido à sua melhor biodisponibilidade e menor toxicidade, além de outras características que ajudam a aliviar a carga dessa doença.

[31] Atualmente, muitos são os desafios a serem enfrentados no tratamento dessa doença negligenciada, tais como opções terapêuticas limitadas, diagnóstico tardio, pouca conscientização da comunidade com relação a métodos de prevenção e tratamento, a ocorrência de portadores assintomáticos, e, o mais importante, a ausência de vacinas. Tudo isso representa um incentivo para uma mais completa investigação de nanodispositivos para um tratamento de maior eficácia contra a leishmaniose.

[32] À vista disso, a invenção descrita na presente patente propõe a utilização de nanocompósitos magnéticos híbridos de óxido de ferro/PIC para uso como agente terapêutico para o tratamento de leishmaniose e outras doenças causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae*.

→ **Vantagens da invenção**

[33] A utilização da presente invenção como um agente terapêutico para o tratamento de leishmaniose traz como vantagens essenciais:

- 1) A metodologia de preparação dos nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth consiste em um método simples e viável do ponto de vista experimental e econômico;
- 2) O nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth não apresenta toxicidade em três linhagens distintas de células de mamíferos, inclusive macrófagos, as células de defesa que são infectadas pelos parasitos de *Leishmania*;
- 3) O nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth não é capaz de causa hemólise (lise das membranas e liberação de hemoglobina) de hemácias humanas de diferentes fenótipos, o que configura um importante parâmetro para o desenvolvimento de uma formulação com potencial terapêutico;
- 4) A atividade anti-*Leishmania* do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth foi bastante promissora nas formas promastigotas (hospedeiro invertebrado) de *L. amazonensis* e também efetiva sobre as formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (hospedeiro vertebrado);
- 5) O nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth causa danos à membrana mitocondrial das células dos parasitos de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- 6) Ação seletiva e direcionada do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth sobre as células do parasita (*Leishmania*), sem causar alterações na fisiologia da célula hospedeira (macrófago).

→ A novidade e o efeito técnico alcançado

[34] O avanço alcançado com essa invenção consiste no fato de que até o presente momento nenhuma instituição de pesquisa, ensino ou setor privado empregou nanocompósitos magnéticos de óxido de ferro/polímeros intrinsecamente condutores como agente terapêutico para o tratamento de leishmaniose.

→ Breve descrição das figuras

[35] Na Figura 1, é apresentada uma ilustração esquemática das etapas sucessivas da síntese do nanocompósito γ -Fe₂O₃/PTh via reação Fenton.

[36] Na Figura 2, é apresentado o espectro de UV-visível para γ -Fe₂O₃ e o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/politiofeno.

[37] Na Figura 3, é apresentado o espectro de FTIR das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ puras (I), politiofeno puro (II) e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh (III).

[38] Na Figura 4, são apresentadas as micrografias das amostras das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ (A) e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh (B), o espectro de EDS do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh (C) e o histograma do tamanho de partícula (D).

[39] Na Figura 5, são apresentadas as curvas de magnetização à temperatura ambiente para as nanopartículas de γ -Fe₂O₃ (a) e o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh (b). (M: magnetização; H: campo magnético aplicado).

[40] Na Figura 6, são apresentadas as porcentagens de viabilidade das células de mamíferos tratadas por 48 horas com as nanopartículas de γ -Fe₂O₃ (barras laranjas) e γ -Fe₂O₃/politiofeno (barras azuis): células do tipo macrófagos J774G.8 (A), fibroblastos (B) e VERO (C). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes,

realizados em quadruplicata (grupos controle: considerados 100% viáveis, a partir da normalização do sinal de absorbância para porcentagem).

[41] Na Figura 7, são apresentados os percentuais de hemólise das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ (A) e dos nanocompósitos de γ -Fe₂O₃/PTh (B) em células vermelhas de sangue humano de diferentes fenótipos. (C: controle negativo de solução salina 0,9%; T: controle positivo de Triton X-100). Ensaio aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFPE (CAAE: 51663821.8.0000.5208).

[42] Na Figura 8, são apresentados os percentuais de viabilidade das formas de promastigotas de *L. braziliensis* (A) e *L. amazonensis* (B) tratadas com as nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e dos nanocompósitos de γ -Fe₂O₃/PTh sobre *L. braziliensis* (A) e *L. amazonensis* (B), e o índice de inibição das formas promastigotas de *L. amazonensis* (C). As barras representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes, realizados em quadruplicata (*: diferenças significativas em $p < 0,05$, em comparação com o controle não tratado; grupos controle: considerados sejam 100% viáveis, a partir da normalização do sinal de luminescência relativa para porcentagem).

[43] Na Figura 9, são apresentados os percentuais de inibição da viabilidade das formas amastigotas axênicas de *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* tratadas com três valores distintos das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh por 24h. As barras representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes em quadruplicata (*: diferenças significativas em $p < 0,05$, em comparação com o controle não tratado; ***: diferenças significativas em $p < 0,0001$; grupo controle: considerado 0% de células não inibidas, ou seja, 100% viáveis, a partir da normalização).

→ Descrição detalhada da invenção

Exemplo 1 - Preparação e caracterização das formas de realização preferidas dos nanocompósitos magnéticos γ -Fe₂O₃/Pth.

Exemplo 1.1 - Preparação dos nanocompósitos magnéticos γ -Fe₂O₃/Pth.

[44] As nanopartículas de γ -Fe₂O₃ utilizadas foram obtidas por meio da técnica de co-precipitação química, amplamente reportada na literatura. Assim, o protocolo de síntese foi realizado de acordo com o estudo de Chávez-Guajardo, Medina-Llamas. A síntese para o revestimento γ -Fe₂O₃ com politiofeno (γ -Fe₂O₃/Pth) foi realizada via reação Fenton. Assim, em um balão de fundo redondo com 3 bocas foram adicionados: um volume entre 100-500mL de água deionizada, quantidades entre 50-800mg de CTAB, e entre 30-750mg de nanopartículas de γ -Fe₂O₃; amparado em um sistema de aquecimento por banho de óleo, agitação magnética e de refrigeração de líquidos (*chiller*). Após a dissolução completa do CTAB, o sistema foi fechado e acoplado a um condensador de serpentina. Em seguida, foi injetada no sistema uma atmosfera inerte de N₂. Após a diminuição da pressão dentro do balão, foram adicionados sequencialmente um volume na faixa de 1-10mL de tiofeno (C₄H₄S) e um volume entre 1-100mL de uma solução de cloreto férrico (0,1-1M). Este aparato foi mantido em uma faixa de temperatura de 40-120°C por um período entre 2-24 horas. Posteriormente, o nanocompósito formado foi confinado com ajuda de um imã. Em sequência, o nanocompósito obtido foi submetido a lavagens consecutivas com água deionizada para a remoção de contaminantes e de traços remanescentes dos reagentes. O nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Pth resultante foi seco em estufa 50-120°C por 24 horas, e posteriormente pulverizado com o auxílio de um almofariz de ágata, resultando em um

pó fino de cor marrom. A ilustração sequenciada das etapas do processo de síntese do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ é apresentada na Figura 1.

Exemplo 1.2 - Métodos de caracterização e as características dos nanocompósitos magnéticos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$.

[45] Para investigar a composição dos nanocompósitos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ produzidos conforme o procedimento descrito no Exemplo 1.1, espectros de FTIR foram realizadas no intervalo de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ utilizando um espectrômetro IR Tracer-100 (Shimadzu, Japão), com as amostras preparadas em pastilhas de KBr. Os espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções diluídas das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ puras e do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ foram obtidos em um intervalo de $185\text{-}1400\text{nm}$, com a utilização de um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão) com esfera integradora ISR-2600. As propriedades magnéticas das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e do $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ foram determinadas a partir das curvas de magnetização por meio da técnica de magnetometria de amostra vibrante, utilizando um magnetômetro EV7 (Microsense, Estados Unidos). As características morfológicas e a microanálise qualitativa e semiquantitativa dos elementos químicos presentes nas amostras de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura MEV-FEG MIRA3 LM (Tescan, República Checa) e um módulo de EDS (Oxford Instruments, X-ACT) acoplado. A determinação da distribuição do tamanho de foi quantificada a partir das micrografias MEV obtidas, através de medidas do diâmetro das nanopartículas de realizadas manualmente - contagem de 300 partículas diferentes em cada micrografia, com o uso do software ImageJ.

[46] Na Figura 2, são apresentados os espectros de UV-Vis para as nanopartículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e para o nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$.

Nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtidas pelo método de precipitação química usualmente apresentam banda de máxima absorção entre 200-300nm. Dessa forma, foi possível estabelecer o perfil de absorção das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ antes do recobrimento com politiofeno (Figura 2 - linha preta). Após o recobrimento das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, e conseqüentemente a formação do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$, observou-se uma banda de absorção centrada em um comprimento de onda de $\sim 470\text{nm}$ (Figura 2 - linha tracejada azul). A banda de absorção do Pth é em aproximadamente em 441nm e se refere à transição da banda de valência para o estado pólaron antiligante (tipo $\pi\text{-}\pi^*$), que indica o estado dopado do Pth. O deslocamento da banda de absorção após o recobrimento da $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ com PTh se deve a interações interfaciais entres os anéis quinoides do politiofeno e a superfície das nanopartículas.

[47] A técnica de FTIR foi também utilizada para a comprovação do revestimento das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ com o politiofeno, pela identificação dos modos de estiramento e desdobramento molecular característicos de cada espécie química, antes e depois da reação de recobrimento. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura 3, que correspondem a: I) nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ puras; II) politiofeno puro; e III) nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$. As medidas de absorção na região do infravermelho das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ puras revelaram a presença de bandas - 3435cm^{-1} , 713cm^{-1} , 586cm^{-1} e 443cm^{-1} - o que possibilitou a confirmação da fase e da composição desses domínios magnéticos (linha laranja). Já as principais bandas características do politiofeno puro foram observadas em 3435cm^{-1} , 2922cm^{-1} , 2854cm^{-1} , 1402cm^{-1} , 1222cm^{-1} , 1035cm^{-1} e 713cm^{-1} (linha vermelha). Por fim, as bandas características do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ (linha azul) foram observadas nas mesmas regiões de impressão digital observadas nos elementos puros (3435cm^{-1} , 2922cm^{-1} , 2854cm^{-1} , 1402cm^{-1} , 1222cm^{-1} ,

1035 cm^{-1} , 713 cm^{-1} e 586 cm^{-1}), mais uma vez confirmando que a presença do politiofeno como camada invólucro das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

[48] Na Figura 4, são apresentadas as micrografias de MEV correspondentes às nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ puras e revestidas com o politiofeno. Conforme pode ser observado, tanto as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Figura 4A) como o nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ (Figura 4B) apresentam um formato esférico, com uma distribuição de tamanho homogênea. Além disto, uma caracterização química elementar do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ foi realizada através da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), conforme observado na Figura 4C. Pode-se observar que o espectro indica a presença de elementos como carbono (C), oxigênio (O), ferro (Fe), e enxofre (S), bem como seus respectivos níveis dos quais foram emitidas as energias de raios-X. Os picos referentes aos elementos carbono (C) e enxofre (S) confirmam a presença do politiofeno no nanocompósito. A distribuição do tamanho das nanopartículas foi apresentada conforme mostrado na Figura 4D, com as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ apresentando uma distribuição de tamanho entre 15 e 27nm, com diâmetro médio de $21\pm 8,8\text{nm}$, o que se assemelha com os valores esperados para nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtidas segundo a mesma rota experimental. Em contraste, o nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$, apresentou uma distribuição entre 36nm e 48nm, com um diâmetro médio de $41\pm 8,9\text{nm}$. Assim, foi possível inferir que houve o revestimento das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ com o politiofeno e que esse recobrimento se dá através de uma fina camada polimérica com espessura da ordem de 19nm.

[49] Na Figura 5, são apresentadas as curvas de magnetização (a análise de VSM mostra a resposta de materiais magnéticos à aplicação de campos magnéticos externos, a qual pode ser caracterizada pelos

seguintes parâmetros: magnetização da saturação (M_s), campo coercivo (H_c), e magnetização de remanescente (M_r) das nanopartículas γ - Fe_2O_3 e do γ - Fe_2O_3 /Pth cujos laços de histerese magnéticas (forma de S) apresentou uma M_s correspondente a 48,5 e 15,7emu/g, respectivamente. A redução da M_s se dá pelo fato de que as medidas de magnetização consideram a massa total da amostra e que a massa de PTh não contribui para o valor final de magnetização no nanocompósito de γ - Fe_2O_3 /PTh. Assim, a nanopartícula de γ - Fe_2O_3 e o nanocompósito de γ - Fe_2O_3 /PTh apresentaram comportamento superparamagnético, pois não há H_c (campo sob a qual a magnetização se anula) e M_r (magnetização para campo zero), sendo esse modo de histerese magnética bastante comum em materiais cujo núcleo magnético é revestido com polímero condutor.

Exemplo 2 - Citocompatibilidade *in vitro* com células de mamíferos.

[50] A presente invenção compreende o uso do nanocompósito γ - Fe_2O_3 /PTh, mas não somente este, como uma plataforma terapêutica citocompatível (*in vitro*) com linhagens distintas de células de mamíferos.

Exemplo 2.1 - Ensaios de citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos e eritrócitos humanos.

[51] Foi avaliada a citocompatibilidade das nanopartículas de γ - Fe_2O_3 e dos nanocompósitos de γ - Fe_2O_3 /Pth com células de mamíferos de linhagens distintas de acordo com as especificações técnicas descritas na Tabela 2. Esses modelos celulares são aqueles comumente utilizados para a avaliação de toxicidade e segurança de novos nanomateriais, por permitirem a predição dos aspectos de biocompatibilidade sem o uso de animais, a um mais baixo custo operacional e com um tempo de experimentação reduzido.

Nome	Código	Espécie de origem	Propriedades de crescimento
Fibroblasto	L929	Camundongo	Aderente
Macrófago	J774 G.8	Camundongo	Aderente
VERO	ATCC® CCL-81	Macaco	Aderente

ATCC: *American Type Culture Collection*.

Tabela 2 - Especificações técnicas das linhagens de células de mamíferos utilizadas para os testes de citotoxicidade

[52] As células foram semeadas em uma placa de 96 poços (5×10^5 células/poço) e em seguida incubadas por 3 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Posteriormente, os poços foram incubados na presença e na ausência (grupo controle) de nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/Politiofeno (12,5 a 200µg/mL) por 48 horas. Subsequentemente, a viabilidade celular foi avaliada usando 0,5mg/mL de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] - Sigma-Aldrich, EUA). Os ensaios de MTT são uma técnica que dimensiona o dano induzido por um determinado material ao metabolismo celular através da verificação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, ou seja, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a Formazan (sal de coloração púrpura) por ação daquelas enzimas (hidrogenação). A redução do MTT a Formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial, com a viabilidade celular sendo então quantificada por espectroscopia na região do visível. A absorbância das amostras em 560nm foi quantificada usando um leitor de Microplaca GloMAX® Reader (Promega, EUA), após as partículas magnéticas terem sido retiradas do meio por meio do uso de um ímã, para que não viessem a afetar as medidas de absorbância do sobrenadante.

[53] Como pode ser observado na Figura 6, após o tratamento por 48 horas não houve qualquer efeito citotóxico sobre as células de

macrófagos, fibroblastos e VERO. Dessa forma, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre as células tratadas e não tratadas (controle). Mesmo que as células VERO e dos fibroblastos tenham se mostrado mais sensíveis ao tratamento *in vitro* que as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ puras, não foi observada uma redução significativa da viabilidade celular no grupo tratado quando comparado ao controle (Figuras 6B e 6C - barras azuis). Os macrófagos, células alvo na infecção por *Leishmania*, apresentaram menor susceptibilidade ao tratamento com as nanopartículas com ou sem revestimento polimérico, o que indica baixa citotoxicidade, ou mesmo sua ausência, para com essa linhagem celular.

[54] Assim como outros PICs, o politiofeno apresenta uma notável biocompatibilidade com as mais diversas linhagens celulares, devido a sua baixa toxicidade, o que tem permitido a criação de materiais multifuncionais direcionados para a entrega controlada de agentes ativos, e a detecção de DNA e de microRNA. Similarmente, as nanopartículas de óxido de ferro também apresentam boa citocompatibilidade, que pode ser ampliada com o auxílio de funcionalizações químicas, possibilitando a redução de danos celulares, seletividade e entrega controlada de fármacos. Desse modo, o nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{Pth}$ emerge como um nanomaterial promissor para aplicações biomédicas.

Exemplo 2.2 - Potencial hemolítico *in vitro* em eritrócitos humanos.

[55] O teste de hemólise foi executado segundo o protocolo proposto por Yang, Sun, com as amostras de sangue total sendo centrifugadas a 3500rpm por 10 minutos, para separar o plasma sanguíneo (parte líquida - água, proteínas, nutrientes, etc. - do sangue) dos eritrócitos. Após o descarte do plasma, as hemácias foram lavadas três

vezes com uma solução de salina (NaCl 0,9%). Posteriormente, foram preparadas suspensões de hemácias lavadas (100 μ L) em solução de NaCl 0,9% (19,9mL) de cada tipo sanguíneo, sendo em seguida separadas alíquotas de 500 μ L dessas suspensões em microtubos de plástico. Nestes experimentos foram estabelecidos os seguintes grupos de amostras, aos quais serão adicionadas as alíquotas de hemácias preparadas anteriormente: I) controle positivo: 500 μ L de Triton X-100 (tensoativo que causa 100% de hemólise das células); II) controle negativo: 500 μ L solução salina (NaCl 0,9% - não rompe a membrana da hemácia); III) grupos tratados: diferentes concentrações de nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/politiofeno (12,5 a 200 μ g/mL). Todas as amostras foram homogeneizadas e imediatamente incubadas por 30 minutos a 37°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 1.500rpm por 5 minutos, com o sobrenadante sendo coletado e disposto em um microplaca de 96 poços. A hemoglobina livre no sobrenadante foi medida espectrofotometricamente pela absorção em 450nm. Neste ensaio foram cumpridas todas as recomendações éticas da legislação vigente (CAAE: 51663821.8.0000.5208), com projeto devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco.

[56] Foi avaliada a atividade hemolítica das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PEDOT em eritrócitos humanos de diferentes fenótipos (Figura 7). Quando comparados com o grupo controle (salina), nenhum dos dois nanomateriais testados apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas. O aumento gradual das concentrações de tratamento dos dois nanomateriais magnéticos mostrou distintos percentuais de hemólise, no entanto sem que fossem atingidos valores significantes como aqueles observados no controle positivo (Triton X-100). Valores de percentuais de hemólise acima de 20% costumam ser associados a biomateriais que não são hemocompatíveis.

[57] Nanomateriais podem afetar a integridade da membrana dos glóbulos vermelhos (eritrócitos ou hemácias) tanto por danos mecânicos quanto pela geração de espécies reativas de oxigênio, cujo efeito na membrana dos eritrócitos pode ser modulado por variáveis como tamanho, forma, composição química e carga superficial, resultando assim na ruptura/lise dessa estrutura e liberação da hemoglobina.

Exemplo 3 - Atividade leishmanicida em formas de promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*.

[58] Diante dos bons resultados observados nos experimentos de citotoxicidade em *in vitro* e potencial hemolítico, realizamos os ensaios do potencial leishmanicida do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PTh. Para isso, foram utilizados dois estágios de desenvolvimento de formas (promastigotas e amastigotas axênicas) de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania Braziliensis*.

Exemplo 3.1 - Efeito das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /politiofeno sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

[59] Para avaliar a atividade leishmanicida nos dois estágios de desenvolvimento do parasita, foram utilizadas as formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB0016) e *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903), que foram mantidas em meio Schneider® (Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, EUA) a 26°C. As formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram usadas para experimentação após atingirem a fase exponencial de crescimento. Avaliamos o potencial leishmanicida dos nanomateriais ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PTh) sobre as formas promastigotas de

L. amazonensis e *L. braziliensis*. Para isso, as promastigotas foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de SBF, penicilina (100 IU) e estreptomicina (0,01mg/mL). Posteriormente, as células foram incubadas (1×10^6 células/mL) na ausência (grupo controle) e na presença de diferentes concentrações (12,5-200µg/mL) das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/politiofeno. As amostras foram dispostas em um homogeneizador giratório de tubos a 20rpm/mim, por 48 horas a 26°C. Feito isso, a viabilidade das células dos parasitos foi avaliada pela quantificação dos níveis de ATP (Adenosina Trifosfato) intracelular, conforme o protocolo do ensaio bioluminescente CellTiter-Glo® (Promega, EUA). As medidas de luminescência foram coletadas em um leitor de microplacas (GloMax®, Promega, EUA). O efeito dos dois nanomateriais sobre a inibição do crescimento de ambos os parasitos foi estimado através da IC₅₀ (concentração de tratamento capaz de inibir em 50% a proliferação dos parasitas após 48 horas de tratamento). Todas as análises foram executadas em quadruplicata, em dois experimentos independentes.

[60] O efeito leishmanicida das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/politiofeno sobre formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, é apresentado na Figura 8. Os resultados revelaram um efeito inibitório dose-dependente dos nanocompósitos de γ -Fe₂O₃/PTh nas formas promastigotas de *L. braziliensis* (Figura 8A) para as concentrações de 100 e 200µg/mL, quando comparadas com o grupo controle não tratado (100% das células viáveis). Todavia, ao final esse efeito não se mostrou significativo. Por outro lado, nas duas maiores concentrações testadas (100 a 200µg/mL), os promastigotas de *L. amazonensis* foram mais sensíveis ao tratamento *in vitro* com as duas NMs (Figura 8B), sendo o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh capaz de reduzir a viabilidade dessa forma do parasita em 86% (Figura 8C). A distinção na

susceptibilidade ao tratamento entre as promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* pode estar relacionada às diferenças bioquímicas e moleculares entre as duas espécies. Assim como observado neste estudo, outros trabalhos têm também apontado *L. braziliensis* como uma das espécies que apresenta uma maior resistência natural à quimioterapia *in vitro*.

[61] Para a determinação do potencial leishmanicida foi utilizada a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) da cultura de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh (IC₅₀: 117,63 μ g/mL). A IC₅₀ em *L. braziliensis* foi maior que 200 μ g/mL para ambos os tratamentos. Tendo em vista que o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh foi o único capaz de ter seu valor de IC₅₀ obtido pela inibição das promastigotas de *L. amazonensis* e levando em consideração que nenhum dos três nanomateriais reduziu a viabilidade das células de mamíferos, não foi possível determinar o índice de seletividade (ISe), razão entre o IC₅₀ (em *Leishmania*) e a CC₅₀ (células de mamíferos).

Exemplo 3.2 - Efeito das nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/politiofeno sobre formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

[62] Com base em triagem realizada usando as formas promastigotas de ambas as espécies, foi verificado o efeito leishmanicida do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh sobre as formas amastigotas axênicas. Para isso, formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram cultivadas para experimentação no início da fase estacionária. Em seguida, as células na forma promastigota de ambas as espécies foram transferidas para o meio para amastigota axênica (MAA). O MAA foi manufaturado com base no protocolo estabelecido por Sereno, Roy, isto é, solução tampão HBSS (do inglês, *Hanks' Balanced Salt Solution*) numa

proporção específica de sais inorgânicos, suplementado com 0,5% de triptocaseína, 15mM de D-glicose (Sigma Aldrich, EUA), 5mM de L-glutamina (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, EUA), 4mM de bicarbonato de sódio, 0,023mM de hemina bovina (Sigma Aldrich, EUA) e 25mM de HEPES. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,5 e suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado.

[63] As etapas experimentais para a diferenciação das formas promastigotas para amastigotas axênicas foram realizadas de acordo com os seguintes estágios: as células na forma promastigotas, em fase estacionária, foram cultivadas (2×10^6 células/mL) no meio MAA e submetidas a temperaturas crescentes, 24 horas em 28°C e, posteriormente, 96 horas a 37°C; o processo de diferenciação foi acompanhado através de microscopia óptica, de modo a acompanhar modificações na estrutura dos parasitos, como o arredondamento do corpo celular e a internalização do flagelo. As células foram utilizadas para experimentação quando o percentual de formas amastigotas ultrapassou 80% das células em cultura. Dessa forma, as amastigotas axênicas foram incubadas ($\sim 1 \times 10^6$ células/mL) na ausência e na presença de diferentes concentrações do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PTh}$ por 24 horas a 37°C. Finalmente, a viabilidade das formas amastigotas axênicas foi avaliada através da dosagem de ATP. Todos os ensaios de viabilidade em formas amastigotas axênicas foram realizados em dois ensaios independentes em quadruplicata.

[64] As formas amastigotas causam todas as manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado, e por isso é importante que os agentes terapêuticos sejam efetivos contra este estágio de desenvolvimento do parasita. Dessa forma, as formas amastigotas axênicas, obtidas através da indução da amastigogênese (processo de diferenciação *in vitro* de

formas promastigotas em amastigotas), são um modelo celular adequado para estudos de novas terapias anti-*Leishmania*.

[65] A inibição da viabilidade das formas amastigotas axênicas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* tratadas com as nanopartículas de γ -Fe₂O₃ e o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh é mostrada na Figura 9. Nossos resultados mostram que ambos os nanomateriais magnéticos foram capazes de promover inibição nas concentrações testadas, embora com percentuais de inibição distintos. As nanopartículas de γ -Fe₂O₃ apresentaram distintos percentagens de inibição entre as espécies de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, iguais a 36% e 81%, respectivamente. Por outro lado, o efeito inibitório do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/politiofeno alcançou percentual de inibição de 71% (*L. amazonensis*) e 87% (*L. braziliensis*). No presente estudo, notamos que as amastigotas axênicas de ambas as espécies foram sensíveis o nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh quando comparado aos promastigotas, que apenas a *L. amazonensis* era inibida. A variação observada nas taxas de inibição dos parasitos de *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* podem estar relacionadas com as diferenças bioquímicas e moleculares entre estas espécies, especialmente em suas formas amastigotas, que costumam apresentar resposta distinta às terapias.

Exemplo 4 - Análises estatísticas dos ensaios de citotoxicidade e atividade anti-*Leishmania in vitro*.

[66] Os dados de absorvância (abs) e luminescência relativas (LR) foram analisados utilizando o mesmo método de normalização do sinal, ou seja, os dados brutos (abs e LR) foram convertidos em valores percentuais (%) para a viabilidade e inibição do crescimento das amostras biológicas na ausência e na presença do tratamento com os

nanomateriais. Os percentuais de viabilidade celular e de inibição do crescimento celular foram calculados de acordo com a relação

$$\%_{\text{viabilidade e inibição}} = \frac{\text{Sinal}_{\text{tratamento}}}{\text{Sinal}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{Equação 1}),$$

onde $\text{Sinal}_{\text{tratamento}}$ e $\text{Sinal}_{\text{controle}}$ são, respectivamente, a absorbância e a luminescência relativas dos grupos tratados e do controle (isto é, sem tratamento).

[67] A concentração citotóxica de 50% das células (CC_{50}) e a concentração inibitória de 50% foram calculadas a partir de uma regressão linear, utilizando o programa SPSS Statistics 25 (IBM, EUA). Os valores significantes foram definidos a partir de $p < 0,05$, de acordo com o teste de ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, realizados usando o software GraphPad Prism 7 (Graphpad, EUA).

Exemplo 5 - Investigação do mecanismo de ação da atividade anti-*Leishmania* das nanopartículas $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e do nanocompósito $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PTh}$.

[68] A avaliação do efeito do tratamento com as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e com o nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PTh}$ sobre a fisiologia mitocondrial de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* ocorreu por meio da marcação fluorescente e subsequente análise em citômetro de fluxo. A técnica de citometria de fluxo se baseia em uma abordagem multiparamétrica capaz de quantificar o papel funcional e a integridade de uma determinada organela celular, o que permite a elucidação do mecanismo de ação de terapias baseadas em nanomateriais. Para isso, a Rodamina 123 (Rod123 - Invitrogen™) foi escolhida como fluoróforo, de modo a que através da marcação específica das células dos parasitos fosse possível a determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

As características físico-químicas e biológicas da Rod123 são apresentadas na Tabela 3.

Fluoróforo	Fórmula molecular	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)	Organela alvo	Parâmetro avaliado
Rod123	$C_{21}H_{17}ClN_2O_3$	507/529	Mitocôndria	Potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)

Rod123: Rodamina 123; λ_{exc} : comprimento de onda de excitação; λ_{em} : comprimento de onda de emissão.

Tabela 3 - Propriedades da Rod123 utilizada para avaliar o mecanismo de ação do efeito *in vitro* do nanocompósito magnético de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /PTH sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, por meio da técnica de citometria de fluxo

[69] Para estes ensaios, foram utilizadas formas promastigotas (2×10^6 células/mL) de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, que foram tratadas com as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e o nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /politiofeno, em três concentrações distintas (58,81 $\mu\text{g/ml}$, 117,63 $\mu\text{g/ml}$ e 235,26 $\mu\text{g/ml}$) de cada nanomaterial por 48 horas, e em seguida mantidas sob agitação de 20rpm/mim em um homogeneizador giratório de tubos, por 48 horas a 28°C. Posteriormente, as células dos parasitos foram incubadas com Rod123 (10 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos a 26°C, na ausência de luz, e em seguida lavadas três vezes com tampão PBS. Células tratadas com Metanol 70% por 20 minutos foram utilizadas como controle positivo para o dano celular para as análises com a Rod123. Após as marcações, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e levadas ao citômetro para detecção da fluorescência. Os dados coletados foram quantificados no Citômetro de Fluxo - FACSCalibur™, equipado com o software Quest Cell. As informações e análises quanto a intensidades de fluorescência referentes os marcadores funcionais utilizados foram obtidos a partir de valores através do *Windows Multiple Document Interface* (versão 2.8), software para a determinação da porcentagem,

média e mediana das marcações para cada situação. As alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foram estimadas através do cálculo do Índice de Variação (IV - (Equação 2), com base nas medianas da intensidade de fluorescência, que informa o quanto a intensidade de fluorescência para um marcador nas células tratadas é aumentada ou diminuída em relação às células controles. A (Equação 2 corresponde à expressão usada no cálculo do IV,

$$IV = \frac{MT-MC}{MC} \quad (\text{Equação 2}),$$

onde MT é a mediana da intensidade de fluorescência nas células tratadas e MC é a mediana da intensidade de fluorescência em células não tratadas.

[70] O efeito sobre a função bioquímica e fisiologia mitocondrial nas duas espécies de *Leishmania* investigadas neste estudo foi avaliado por citometria de fluxo. A única mitocôndria de parasitos do gênero *Leishmania* costuma ser um alvo em potencial para a ação de drogas e plataformas terapêuticas, por ter essa organela importância vital para esses protozoários.

[71] A análise do $\Delta\Psi_m$ foi avaliado por meio do índice de variação (IV) apresentado na Tabela 4. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial, fenômeno que se relaciona ao comprometimento da fisiologia celular. As promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com as nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ apresentaram diminuição na intensidade de fluorescência de Rod123 para as maiores concentrações de tratamento (IV = -0,24 e -0,51, respectivamente). Já para o nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{PTh}$, as três concentrações de tratamento resultaram em um dano mais significativo ao $\Delta\Psi_m$. Por sua vez, para as promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, não houve despolarização membrana mitocondrial, com o nanocompósito de

γ -Fe₂O₃/PTh somente sendo capaz de reduzir o IV na maior concentração (235,26 μ g/ml), o que sugere maior resistência dessa espécie a dano mitocondrial causado pelos nanomateriais deste estudo. A depleção do $\Delta\Psi_m$ é considerado o evento relacionado com a morte celular.

<i>L. amazonensis</i>			
Material	Tratamento	Rod123 (MIF)	IV
γ -Fe ₂ O ₃	Controle	195	-
	58,81 μ g/ml	210	0,07
	117,63 μ g/ml	147	- 0,24
	235,26 μ g/ml	94	- 0,51
γ -Fe ₂ O ₃ /PTh	Controle	195	-
	58,81 μ g/ml	138	- 0,56
	117,63 μ g/ml	25,5	- 0,91
	235,26 μ g/ml	22,8	- 0,92
<i>L. braziliensis</i>			
Material	Tratamento	Rod123 (MIF)	IV
γ -Fe ₂ O ₃	Controle	922	-
	58,81 μ g/ml	1114	0,20
	117,63 μ g/ml	1041	0,12
	235,26 μ g/ml	1355	0,46
γ -Fe ₂ O ₃ /PTh	Controle	922	-
	58,81 μ g/ml	1009	0,09
	117,63 μ g/ml	1219	0,32
	235,26 μ g/ml	765	- 0,17

Tabela 4 - Efeito das nanop rticulas de γ -Fe₂O₃ e do nanocompósito de γ -Fe₂O₃/PTh sobre o potencial de membrana mitocondrial de *L.*

amazonensis e *L. braziliensis* (Rod123: Rodamina 123; MFI - mediana da intensidade de fluorescência)

[72] Os danos causados a ambos os estágios de desenvolvimento dos parasitas de *Leishmania* utilizados neste estudo estão associados com a redução nos níveis de ATP observada no ensaio de viabilidade celular. Assim, danos mitocondriais podem ser determinantes na atividade leishmanicida do nanocompósito de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /politiofeno. Os tripanossomatídeos efetuam seu metabolismo energético através de reações de fosforilação oxidativa (contribuem para a produção de ATP), de modo que danos à única mitocôndria em *Leishmania* podem levar ao comprometimento da síntese de moléculas energéticas essenciais e, conseqüentemente, resultar em morte.

REIVINDICAÇÕES

1. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença, por meio de danos mitocondriais, mas não somente estes, ao ocasionar prejuízo ao metabolismo enérgico dos parasitas causadores dessa doença.
2. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença, podendo o polímero ser qualquer polímero conjugado de cadeias aromáticas que apresente propriedades de condução elétrica intrínseca, como, por exemplo, politiofeno, polianilina, polipirrol, e poli (3,4-etilenodioxitiofeno), entre outros.
3. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença, podendo a partícula magnética ter escalas nanométricas, ou não, e ser formado por óxidos de ferro tais como magnetita, maghemita, hematita, ou ferritas, tendo, como exemplo, ferrita de cobalto, níquel, manganês, entre outras.
4. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença,

podendo ser usado tanto como agente terapêutico para a leishmaniose tegumentar, quanto potencialmente contra a leishmaniose visceral.

5. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença, podendo ser usado contra as formas morfológicas promastigota e amastigota do protozoário de *Leishmania* pertencentes a duas espécies diferentes causadoras da leishmaniose tegumentar no Brasil.
6. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença, podendo ser utilizado contra as formas evolutivas dos protozoários de *Leishmania*, tendo como exemplo, mas não somente estes, os pertencentes à *Leishmania amazonensis* e à *Leishmania braziliensis*.
7. O uso de nanocompósito de óxido de ferro e polímero condutor como plataforma terapêutica para o tratamento da leishmaniose, preparado pelo método de polimerização simultânea *in situ* e reações Fenton, ou qualquer outro, caracterizados por poderem ser utilizados como agente terapêutico de modo a permitir o tratamento da leishmaniose tegumentar, mas não apenas esta doença, podendo ser utilizado em doenças causadas por outros protozoários da família Trypanosomatidae, tendo como exemplo, mas não somente estes, *Trypanosoma*, e *Endotrypanum*, entre outros.

DESENHOS

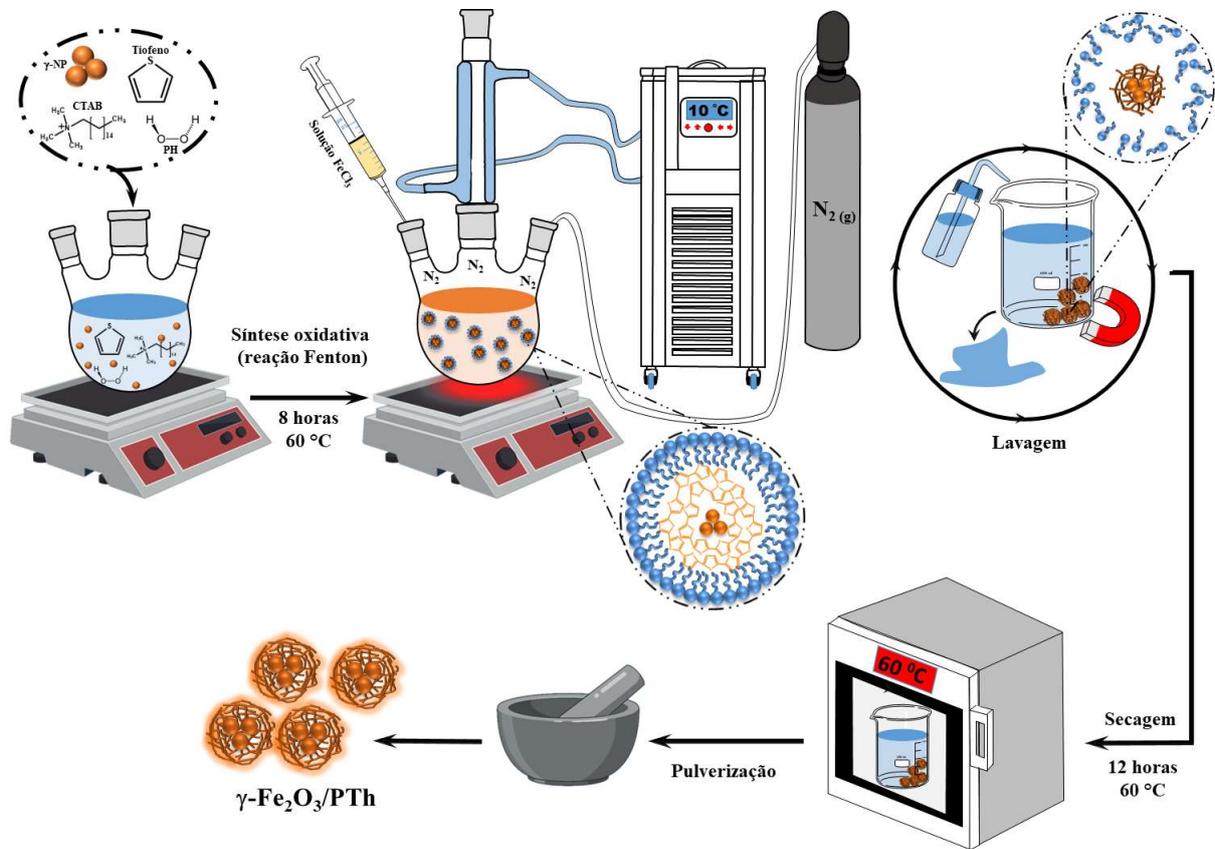


Figura 1

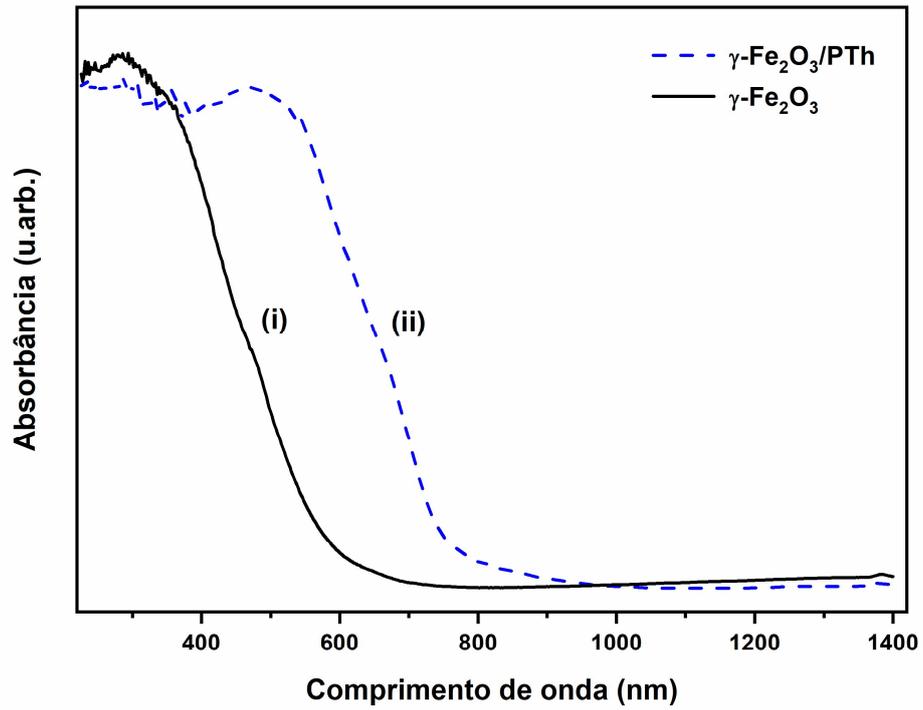


Figura 2

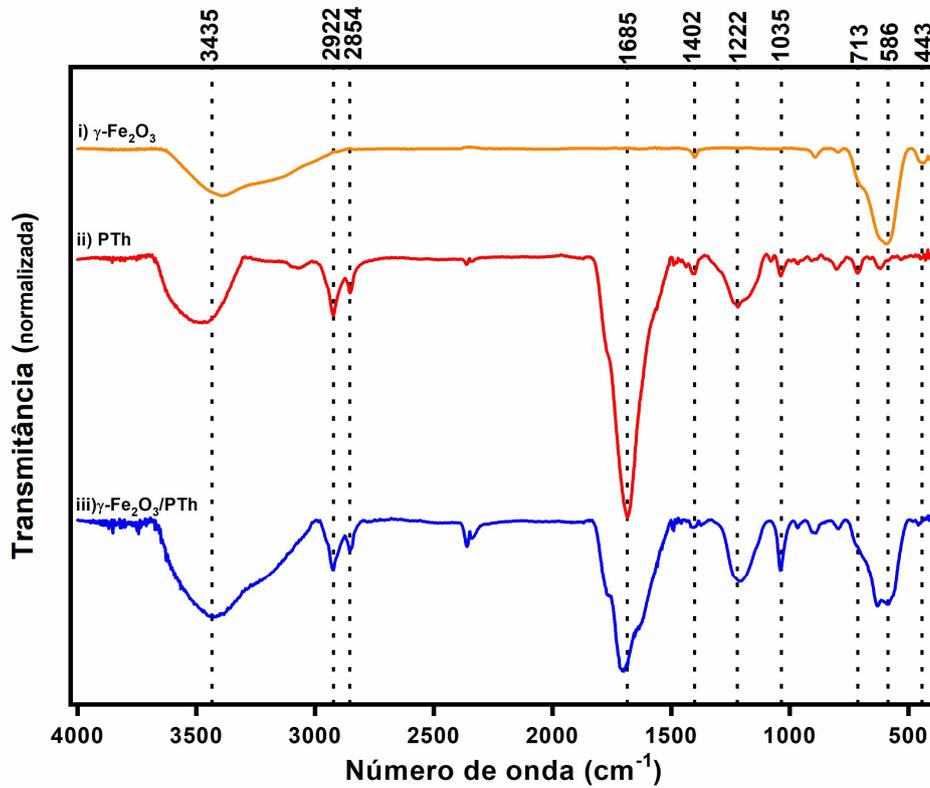


Figura 3

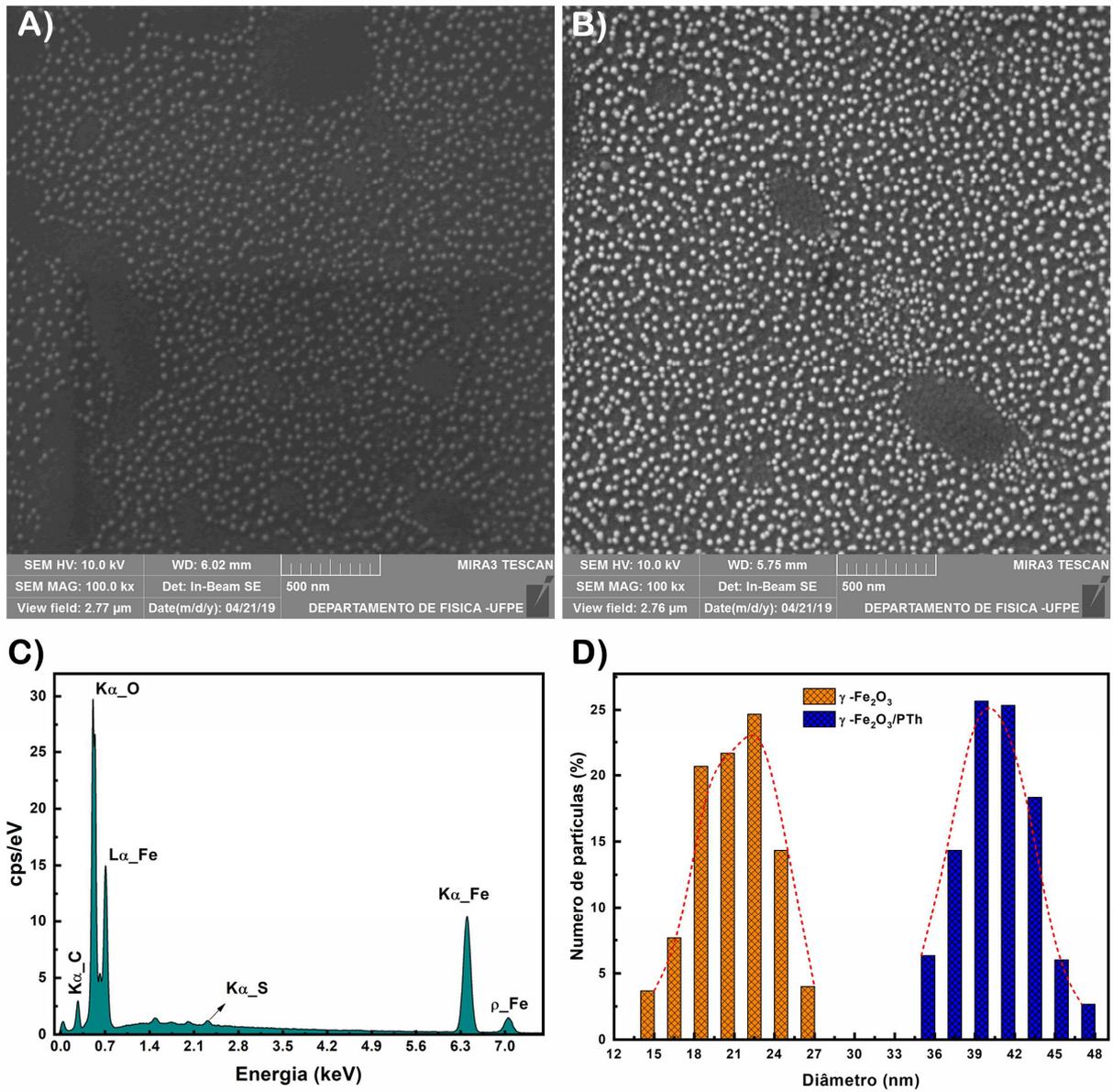


Figura 4

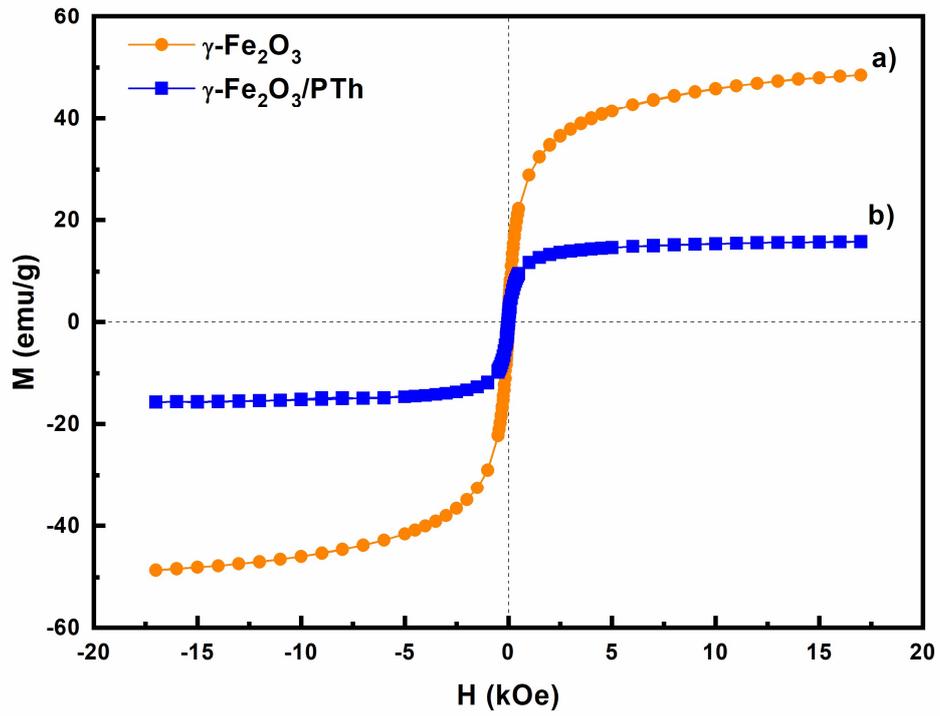


Figura 5

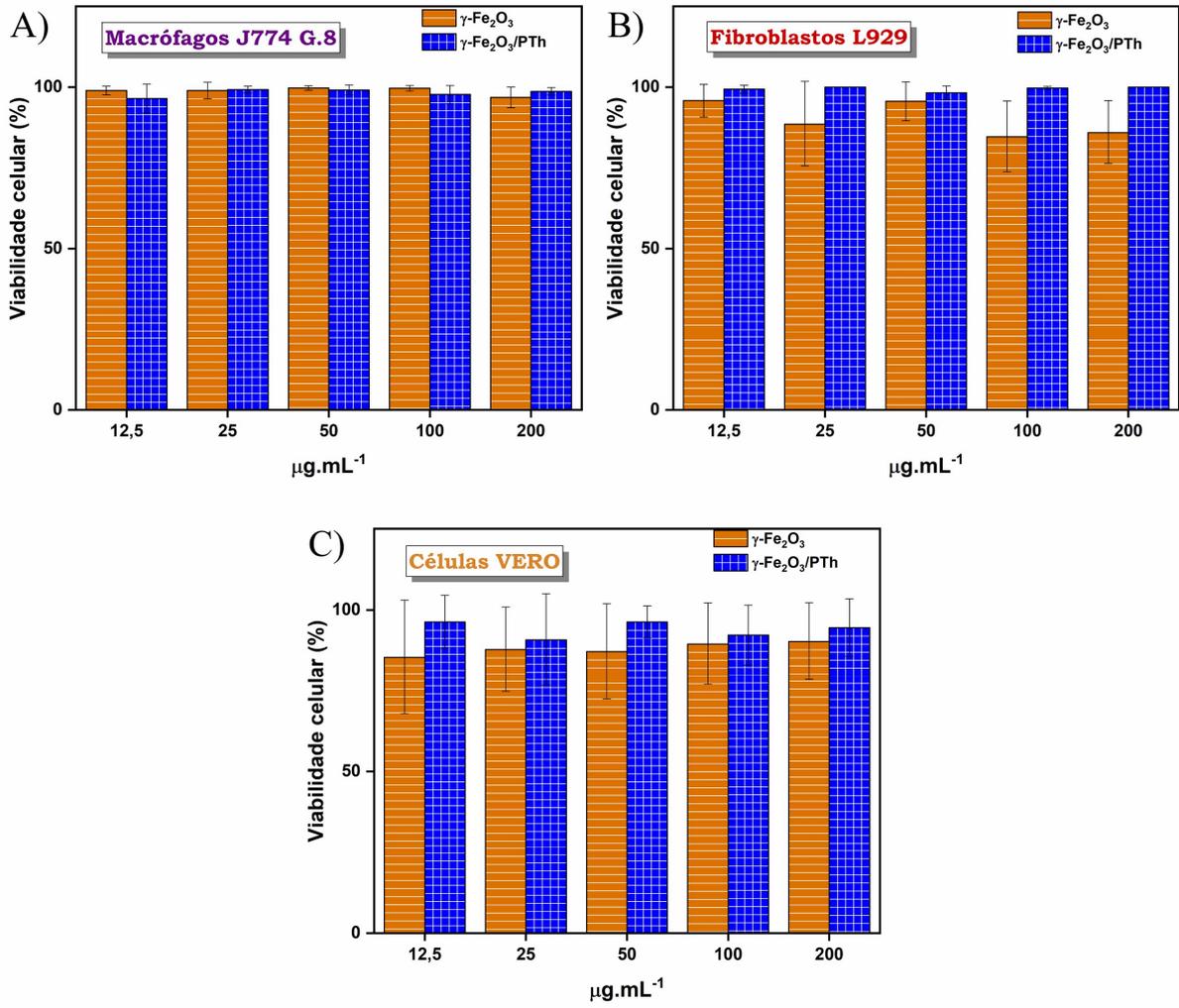


Figura 6

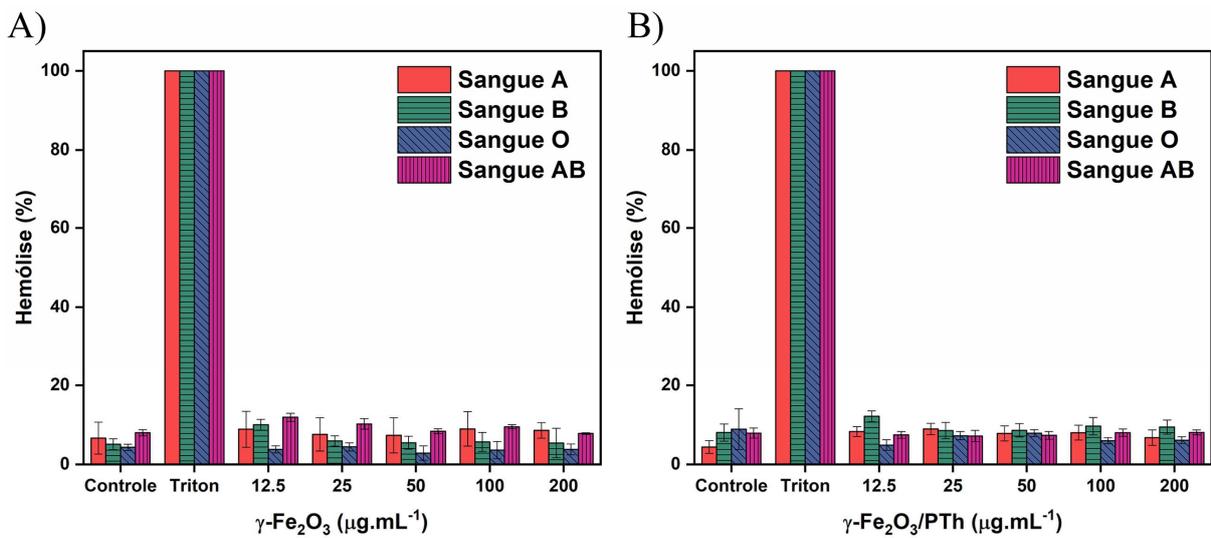


Figura 7

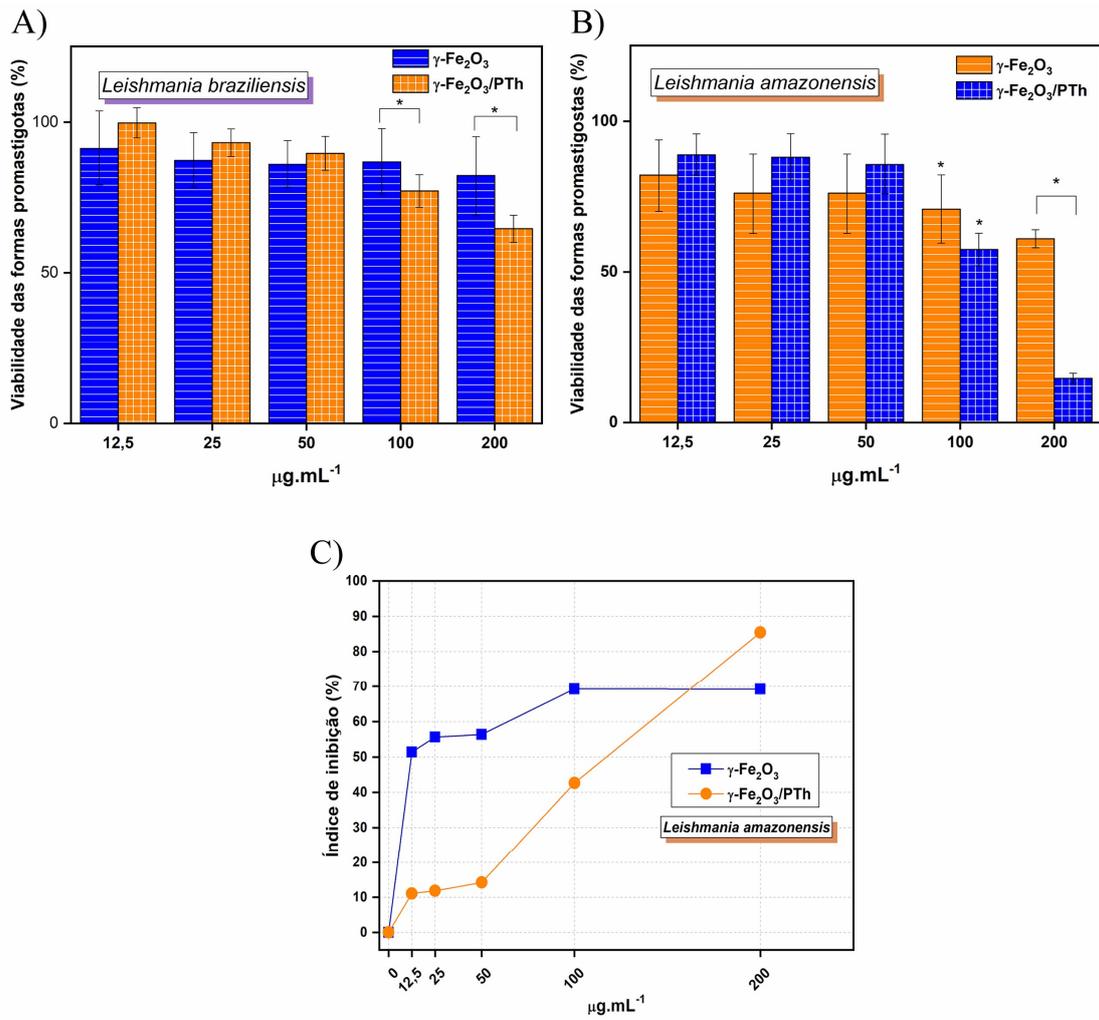


Figura 8

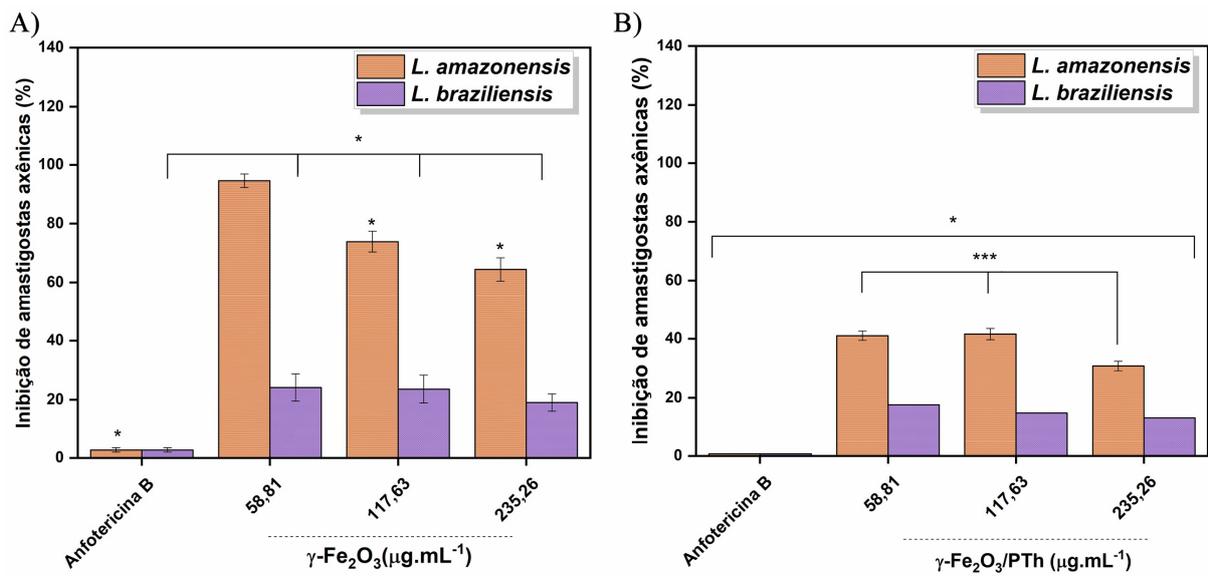


Figura 9

RESUMO**USO DE NANOCOMPÓSITO DE ÓXIDO DE FERRO E POLÍMERO
CONDUTOR COMO PLATAFORMA TERAPÊUTICA PARA A LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR**

A presente invenção se estende ao uso de nanocompósitos magnéticos de óxido de ferro e polímeros intrinsecamente condutores (PIC) como uma efetiva plataforma seletiva para o tratamento de leishmaniose tegumentar. A leishmaniose é uma das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) associadas a uma maior vulnerabilidade social em países em desenvolvimento, em que frações significativas de sua população estão ainda sujeitas à escassez de serviços básicos como saneamento, moradia adequada e acesso a tratamentos de saúde, o que contribui para o aumento do número de casos de infecção dessa doença. A presente proposta de inovação se baseia na utilização de um nanomaterial magnético constituído de óxido de ferro e PIC como um agente terapêutico para essa DTN, que apresenta boa citocompatibilidade e promissoras atividades leishmanicidas, aliando uma boa eficácia com alta seletividade pelo parasita frente à célula hospedeira (macrófago).