

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Tarcísio de Albuquerque Martins

***AVALIAÇÃO DO USO DE NANOTUBOS DE HALOISITA
APLICADOS AO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES***

Uberaba - MG

2023

Tarcísio de Albuquerque Martins

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOTUBOS DE HALOISITA APLICADOS
AO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia básica e aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Uberaba – MG

2023

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

M347a Martins, Tarcísio de Albuquerque
Avaliação do uso de nanotubos de haloisita aplicados ao tratamento das
leishmanioses / Tarcísio de Albuquerque Martins. – 2023.
63 p. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva
Coorientador: Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

1. Leishmaniose. 2. Argila. 3. Nanotubos. 4. Nanotecnologia. 5. Nióbio.
I. Silva, Marcos Vinícius da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
III. Título.

CDU 616.993.161

TARCÍSIO DE ALBUQUERQUE MARTINS

AVALIAÇÃO DO USO DE NANOTUBOS DE HALOISITA APLICADOS AO
TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia básica e aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Uberaba, 26 de janeiro de 2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Pinto
Universidade de Uberaba

Prof. Dra. Thaís Soares Farnesi de Assunção
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Documento assinado eletronicamente por **THAIS SOARES FARNESI DE ASSUNCAO, Técnico-Administrativo em Educação**, em 27/01/2023, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS VINICIUS DA SILVA, Professor do Magistério Superior**, em 27/01/2023, às 14:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rodrigues Pinto, Usuário Externo**, em 27/01/2023, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tarcísio de Albuquerque Martins, Usuário Externo**, em 31/01/2023, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **TUANIA ALVES CUNHA ANDRE, Técnico-Administrativo em Educação**, em 31/01/2023, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0918599** e o código CRC **63A2C611**.

*Dedico este trabalho a Deus, a
minha família, aos meus amigos, e
a mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter guiado meus passos até aqui, sem Ele nada seria possível na minha vida. “Que darei ao senhor por todos os benefícios feitos a mim? ”

À minha família, minha, minha irmã e paiinho a qual sempre apoiou minha formação desde o curso técnico, passando pela graduação até aqui. Agradeço também aos demais, primos e tios que de alguma forma direta ou indiretamente me auxiliou para que eu pudesse estar aqui hoje.

Aos meus orientadores, Marcos Vinicius e Lucio Roberto, nada disso teria sido feito se não fosse por eles. Acredito que são as pessoas mais solícitas que conheci no meio acadêmico até hoje.

Aos colegas de laboratório, Thais Farnesi, Thais Lima, Chambertan, Júlia Moura, Wesley, Leticia Ruiz e em especial Beatriz Sodré, Isabela Ferrato, Rafael Obata e Malu Mateus, os quais foram essenciais para a realiza o do trabalho.

Agradeço em especial a Adriana Nunes, não tenho palavras para descrever o quão grato eu sou. Rainha da haloisita, me estendeu a mão num momento muito importante, mesmo sem me conhecer. Agradeço demais! Agradeço também a professora Gardênia do LACOM-UFPB.

Agradeço aos meus amigos de João Pessoa-PB e os de Uberaba- MG e em especial a Guilherme Bizinotto que acompanhou a reta final do meu trabalho me dando forças e apoio moral quando estive cansado e desestimulado de alguma forma.

“Dizem que, na vida, quem perde o telhado ganha as estrelas. É assim mesmo. Às vezes você perde o que não queria, mas conquista o que nunca imaginou.”

(Sóstenes Cruz)

RESUMO

A leishmaniose é caracterizada por ser uma doença crônica endêmica que pertence a um grupo de doença infecto parasitária negligenciadas. Seu tratamento é basicamente restrito a duas drogas (Glucantime e Anfotericina B), que promovem efeitos adversos. Diante desse contexto, o uso de materiais híbridos vem sendo estudado com a finalidade de aumentar a eficiência e diminuir os efeitos colaterais de certos fármacos. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo sintetizar e avaliar o efeito leishmanicida de um material híbrido composto por nanotubos de haloisita (HNTs) conjugados com nióbio e drogas usadas no tratamento da leishmaniose (Glucantime e Anfotericina B). Os HNTs são materiais que possuem uma superfície externa com cargas negativas e uma superfície interna com cargas positivas, além de possuir um centro oco, essas características têm sido exploradas para veiculação de fármacos. Já o nióbio, metal abundante no território brasileiro, vem sendo estudado na área médica devido sua característica biocompatível e de agregar valor a determinados materiais quando em associação. Primeiramente os HNTs foram complexados com 50 e 75% de nióbio e posteriormente conjugados com os fármacos Anfotericina B e Glucantime. As nanoformulações foram testadas em cultura VERO para determinar a concentração inibitória em 50% (IC₅₀), e a viabilidade celular, além da atividade leishmanicida em formas promastigotas de *L.major*, tratamento de macrófagos THP-1 infectados com *L.major* e dosagem de citocinas (TNF- α , IL-4, IL-1 e IL-6) dessas células. As caracterizações físico-químicas da haloisita bruta (HNT) utilizada, através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) comprovam a forma tubular da HNT utilizada. Já as análises de difração de raio-x (DRX) sugere que houve interação da HNT com o nióbio. O infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) mostrou que houve interação entre os fármacos e os HNTs. A haloisita bruta não apresentou efeito citotóxico direto nas células VERO. A concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de HNT, HNT+Nb50% e HNT+Nb75% reduziu o crescimento celular das formas promastigotas de *L. major* a partir do quinto dia de incubação. O tratamento das células infectadas com as nanoformulações mostrou-se efetivo na redução do índice de parasito por célula bem como na média de macrófagos infectados. As nanoformulações a base de Anfotericina B induziram uma resposta anti-inflamatória nos macrófagos THP-1 infectados, devido a secreção de IL-4 e redução dos níveis de IL-6, TNF- α e IL-1, em contrapartida, as nanoformulações a base de Glucantime, apesar da expressão de TNF- α e IL-1 não mostraram um padrão no perfil pró-inflamatório. Concluímos que a síntese de HNT com nióbio e as drogas antileishmania mostrou-se viável e biocompatível, e que a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi a mais efetiva nos testes realizados.

Palavras-chave: Leishmaniose. Argila. Nanotubos. Nanotecnologia. Nióbio.

ABSTRACT

Leishmaniasis is characterized as an endemic chronic disease that belongs to a group of neglected infectious parasitic diseases. Its treatment is basically restricted to two drugs (Glucantime and Amphotericin B), which cause adverse effects. In this context, the use of hybrid materials has been studied with the aim of increasing efficiency and reducing the side effects of certain drugs. In this sense, the present work aimed to synthesize and evaluate the leishmanicidal effect of a hybrid material composed of halloysite nanotubes (HNTs) conjugated with niobium and drugs used in the treatment of leishmaniasis (Glucantime and Amphotericin B). HNTs are materials that have an outer surface with negative charges and an inner surface with positive charges, in addition to having a hollow center, these characteristics have been explored for drug delivery. Niobium, an abundant metal in Brazil, has been studied in the medical field due to its biocompatible characteristic and the ability to add value to certain materials when combined. First, the HNTs were complexed with 50 and 75% of niobium and subsequently conjugated with the drugs Amphotericin B and Glucantime. The nanoformulations were tested in VERO culture to determine the inhibitory concentration at 50% (IC₅₀), and cell viability, in addition to the leishmanicidal activity in promastigotes forms of *L. major*, treatment of THP-1 macrophages infected with *L. major* and dosage of cytokines (TNF- α , IL-4, IL-1 and IL-6) of these cells. The physical-chemical characterizations of the crude halloysite (HNT) used, through scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM) confirm the tubular form of the used HNT. X-ray diffraction analysis (XRD) suggests that there was an interaction between HNT and niobium. Fourier transform infrared (FTIR) showed that there was interaction between drugs and HNTs. Crude halloysite did not have a direct cytotoxic effect on VERO cells. The concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ of HNT, HNT+Nb50% and HNT+Nb75% reduced the cell growth of the promastigotes forms of *L. major* from the fifth day of incubation. The treatment of infected cells with the nanoformulations proved to be effective in reducing the parasite index per cell as well as the average number of infected macrophages. The nanoformulations based on Amphotericin B induced an anti-inflammatory response in the infected THP-1 macrophages, due to the secretion of IL-4 and reduction of the levels of IL-6, TNF- α and IL-1, in contrast, the nanoformulations base of Glucantime, despite the expression of TNF- α and IL-1 did not show a pattern in the pro-inflammatory profile. We conclude that the synthesis of HNT with niobium and antileishmania drugs proved to be viable and biocompatible, and that the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ was the most effective in the tests performed.

Keywords: Leishmaniasis. Clay. Nanotubes. Nanotechnology. Niobium.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Morfologia da haloisita..... | 18 |
| Figura 2 – Estrutura da haloisita em relação a molécula de água..... | 19 |
| Figura 3 – Fontes de nióbio encontradas na natureza..... | 21 |
| Figura 4 – Estágios evolutivos da <i>Leishmania</i> sp..... | 23 |
| Figura 5 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp no mosquito..... | 24 |
| Figura 6 – Diferentes formas da leishmaniose tegumentar..... | 28 |
| Figura 7 – Estrutura química das principais drogas usadas na leishmaniose..... | 29 |
| Figura 8 – Molécula da Anfotericina B..... | 30 |
| Figura 9 – Compósitos contendo Glucantime e Anfotericina B..... | 41 |
| Figura 10 – Microscopia eletrônica de varredura da haloisita bruta..... | 42 |
| Figura 11 – Microscopia eletrônica de transmissão das nanoformulações..... | 42 |
| Figura 12 – Difratoogramas de raios-X da haloisita bruta e com nióbio..... | 43 |
| Figura 13 – Espectroscopia no infravermelho (FTIR) dos compósitos com anfotericina B..... | 44 |
| Figura 14 – Espectroscopia no infravermelho (FTIR) dos compósitos com Glucantime..... | 45 |
| Figura 15- Viabilidade em células VERO..... | 46 |
| Figura 16 – Curva de crescimento de <i>Leishmania major</i> em contato com os materiais bruto..... | 47 |
| Figura 17 – Ensaio de infecção e tratamento de macrófagos THP-1..... | 49 |
| Figura 18– Microscopia de fluorescência dos macrófagos THP-1 infectados e tratados com as nanoformulações..... | 50 |
| Figura 19 –Produção de citocinas em macrófagos THP-1 infectados e tratados com as nanoformulações..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Valores do pH das nanoformulações após a síntese..... | 41 |
|-----------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HNT: Nanotubo de haloisita

Nb: Nióbio

HNT+Nb50%: Nanotubos de haloisita conjugados com nióbio a 50%

HNT+Nb75%: Nanotubos de haloisita conjugados com nióbio a 75%

FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

DRX: Difração de raio-x

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

LV: Leishmaniose Visceral

LT: Leishmaniose tegumentar

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutânea difusa

LCM: Leishmaniose cutâneo mucosa

NK: Células Natural Killer

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleucina

ROS: espécies reativas de oxigênio

NO: Óxido nítrico

TNF- α : Fator de necrose tumoral

Treg: Células T reguladoras

L-AmB: Anfotericina B lipossomal

RAW: Macrófago RAW

IC₅₀: Concentração inibitória em 50%

VERO: Células de rim de macaco-verde africano

PLGA: Poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

Ensaio de MTT: Teste usado para avaliar a viabilidade celular

MØ: Macrófago

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 18 |
| 2.1 HALOISITA..... | 18 |
| 2.2 NIÓBIO..... | 20 |
| 2.3 LEISHMANIOSE..... | 22 |
| 2.3.1 ABORDAGEM HISTÓRICA..... | 22 |
| 2.3.2 AGENTE ETIOLÓGICO..... | 23 |
| 2.3.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICO..... | 25 |
| 2.3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... | 26 |
| 2.3.5 TRATAMENTO..... | 28 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 33 |
| 4 OBJETIVOS | 34 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL..... | 34 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| 5. METODOLOGIA..... | 35 |
| 5.1 SÍNTESE DA HALOISITA COM NIÓBIO..... | 35 |
| 5.2 SÍNTESE DOS COMPÓSITOS DE HALOISITA E NIÓBIO COM DROGAS ANTILEISHMANIA..... | 35 |
| 5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA HALOISITA BRUTA..... | 35 |
| 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO..... | 36 |
| 5.5 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX) DA HALOISITA BRUTA E COM NIÓBIO..... | 36 |
| 5.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR) DOS COMPÓSITOS..... | 36 |
| 5.7 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ DAS FORMULAÇÕES DE HALOISITA E NIÓBIO..... | 37 |
| 5.8 CULTIVO CELULAR DE <i>L.MAJOR</i> | 37 |
| 5.9 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO EM PROMASTIGOTAS DE <i>L.MAJOR</i> | 37 |
| 5.9.1 CULTIVO CELULAR DE MONÓCITO THP-1..... | 38 |
| 5.9.2 INFECÇÃO DE MACROFÁGO THP-1 COM <i>L.MAJOR</i> | 38 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.9.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS INFECTADAS COM AS NANOFORMULAÇÕES..... | 38 |
| 5.9.4 DETERMINAÇÃO DO PARASITISMO EM THP-1..... | 39 |
| 5.9.5 PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACROFÁGOS THP-1 INFECTADOS E TRATADOS..... | 40 |
| 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 40 |
| 6 RESULTADOS | 41 |
| 6.1 SÍNTESE DOS COMPÓSITOS DE HALOISITA E NIÓBIO COM DROGAS ANTILEISHMANIA..... | 41 |
| 6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA HALOISITA BRUTA..... | 41 |
| 6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOFORMULAÇÕES..... | 42 |
| 6.4 DRX DA HALOISITA BRUTA E COM NIÓBIO..... | 43 |
| 6.5 FTIR DOS COMPÓSITOS..... | 44 |
| 6.6 DETERMINAÇÃO DA IC ₅₀ EM CÉLULAS VERO..... | 46 |
| 6.7 AVALIAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L.MAJOR</i> | 46 |
| 6.8 INFECÇÃO DE MACRÓFAGO THP-1 E TRATAMENTO COM AS NANOFORMULAÇÕES..... | 48 |
| 6.9 EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM AS NANOFORMULAÇÕES..... | 50 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 53 |
| 7.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO..... | 53 |
| 7.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA..... | 55 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 59 |
| 9 REFERÊNCIA..... | 60 |

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses pertencem a um amplo grupo de doenças infecto-parasitárias endêmicas e negligenciadas no mundo, apresenta subtipos/variantes formando um complexo de doenças de caráter crônico. A infecção ocorre quando insetos flebotomíneos infectados pelos protozoários do gênero *Leishmania* realizam o repasto sanguíneo no homem ou em outro hospedeiro mamífero (STEVERDING. D, 2017).

Clinicamente, a doença manifesta-se através de lesões únicas ou múltiplas ao longo da epiderme, podendo afetar ou não as mucosas já que o curso clínico é dependente também da espécie do parasito adquirido. Já a forma visceral afeta principalmente órgãos específicos como o fígado e o baço, de acordo com o tropismo dos parasitos para tais tecidos sendo considerada a forma mais grave da doença podendo levar a óbito se não tratada corretamente (BAÑULS *et al.*, 2007).

No Brasil, são usados basicamente duas opções terapêuticas para tratar a leishmaniose: a droga de primeira escolha representada pelos antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina -Glucantime®), e a de segunda escolha representada pela anfotericina B, entretanto, esse tratamento, uma vez que necessita de atendimento ambulatorial/hospitalar e pela citotoxicidade imposta pelos fármacos, acaba trazendo prejuízos ao paciente e contribuindo para a descontinuidade do mesmo (GOTO & LINDOSO, 2010.; BRASIL, 2010).

Nanopartículas de argila, compósitos e hidrogéis bem como os biovidros estão surgindo como uma nova classe de biomateriais com potencial inovador para engenharia de tecidos e aplicações em medicina regenerativa. As partículas de argila têm sido extensivamente exploradas em nanocompósitos poliméricos principalmente por seu potencial em sistemas de entrega de drogas e administração de medicamentos (PIRES *et al.*, 2018; MOUSA, *et al.*, 2018).

Minerais argilosos possuem propriedades físico-químicas desejáveis, como a capacidade de sorção, propriedades reológicas positivas, inércia química, capacidade de intumescimento, reatividade a ácidos, baixa toxicidade e biocompatibilidade, o que os levaram a desempenhar um papel substancial nas formulações farmacêuticas (KHURANA *et al.*, 2015).

A haloisita, um nanomaterial argiloso pertencente ao grupo da caulinita, encontra-se disponível no ambiente, sendo economicamente viável sua extração em depósitos. As

partículas da haloisita podem ser encontradas de diversas formas, sendo os tubos alongados os mais comuns. Nanotubos de haloisita (HNTs) são formados por folhas de caulino aluminossilicato laminadas várias vezes, possuem grupos aluminol no interior e siloxano na superfície externa que facilitam a formação de ligações de hidrogênio com biomateriais em sua superfície (COELHO, *et al*, 2007).

As propriedades apresentadas tornam o HNT essencial em diversas aplicações, em especial na nanomedicina, como candidatos a sistemas de entrega de medicamentos, genes, engenharia de tecidos, isolamento de células-tronco, nanoplataformas, dentre outros. Os HNTs são suficientemente capazes de ligar-se a muitos componentes sintéticos e biológicos devido à versatilidade das cargas apresentadas na sua estrutura, ou seja, uma superfície interna com carga positiva (grupos Al-OH) e uma superfície externa com carga negativa (grupos Si-OH e Si-OSi) (COELHO, *et al*, 2007; SATISH, *et al*, 2019).

O nióbio, um metal abundante no território brasileiro, que já é explorado em diversas áreas industriais, vem sendo ultimamente estudado nas áreas médicas, em especial na odontologia, devido sua capacidade de melhorar as propriedades mecânicas e químicas de determinados biomateriais, como os biovidros, por exemplo (DEGRAZIA, *et al*, 2018).

O nióbio possui diversas formas estruturais e fases cristalinas consideradas complexas, suas formas polimórficas: pseudo-hexagonal, ortorrômbico e monoclinico, confere a esses materiais distintas atividades catalíticas. Apresentam propriedades promissoras para aplicações ambientais como caráter hipoalergênico, biocompatibilidade e alta estabilidade termodinâmica, sendo assim, pode ser utilizado não apenas na física e química, mas como também na medicina (FIGUEIREDO, *et al*, 2022).

Neste trabalho, utilizamos a haloisita e o oxalato amoniacal de nióbio para sintetizar um sistema híbrido capaz de ser conjugado com drogas utilizadas no tratamento da leishmaniose e avaliar a sua efetividade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. HALOISITA

A haloisita foi descrita pela primeira vez em 1826 pelo geólogo belga Omalius d'Halloy como um mineral argiloso pertencente ao grupo caulim com um maior teor de água. Os minerais argilosos são materiais naturais compostos de óxido de sílica tetraédrico em camadas e óxido de alumina octaédrico. São encontradas na forma pura em vários depósitos naturais localizados em todo o mundo, sendo os maiores na Nova Zelândia, EUA, China, Canadá e Turquia, utilizados principalmente pela indústria de cerâmica (SETTER; SEGAL, 2020).

Os nanotubos de haloisita (HNTs) (Figura 1) são nanoargilas naturais derivadas do caulim que possuem uma superfície química interessante, com uma proporção entre as camadas de alumina e sílica de 1:1 sendo assim conhecida como um filossilicato. A haloisita também contém monocamada intercalada de moléculas de água entre cada camada dupla de alumina-sílica adjacentes; assim, sua fórmula geral se aproxima de $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 4$ para forma totalmente hidratada). A particularidade dos HNTs está em sua superfície externa, que é composta de grupos Si-O-Si carregados negativamente, enquanto a superfície interna consiste em grupos Al-OH carregados positivamente (SETTER; SEGAL, 2020; CAVALLARO *et al.*, 2020).

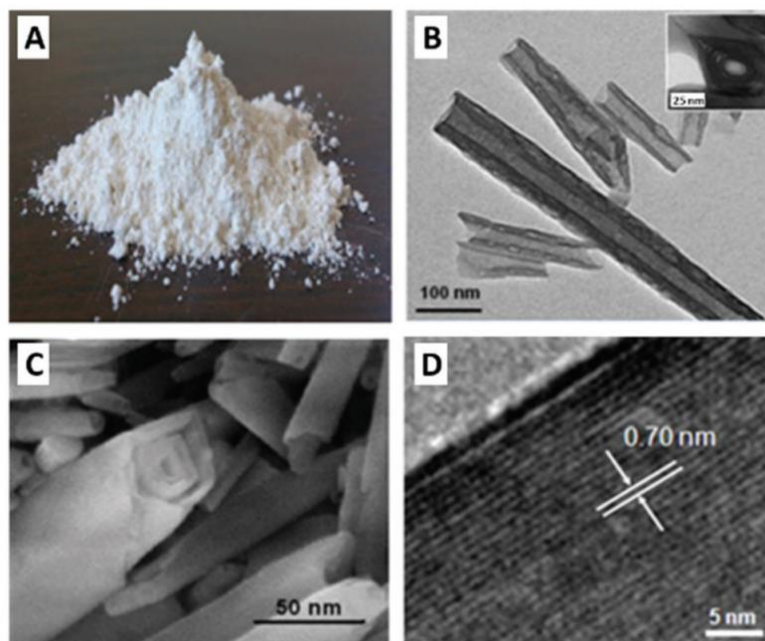


Figura 1. Morfologia da haloisita. A) haloisita bruta; B) imagem de MET de nanotubos de haloisita evidenciando o lúmen oco; inserção mostrando a seção transversal do tubo; C) imagem de MEV da borda do nanotubo de haloisita representando as camadas enroladas que formam as paredes do tubo; D) imagem de MET de alta resolução da rede de alumina e sílica de haloisita desidratada. A espessura de uma camada ($d_{001} = 7 \text{ \AA}$) é indicada com setas brancas. Adaptado de Setter e Segal, 2020.

Algumas características dos nanotubos de haloisita (HNTs) como tamanho, polidispersidade e pureza mineral são afetados por sua origem geológica específica. Em geral, a forma tubular oca possui um lúmen com diâmetro interno de 10–15 nm, seu tamanho médio varia de 200 a 1000 nm e o diâmetro externo entre 50 e 70 nm. A distância entre as camadas é de 1 ou 0,6 nm, dependendo do estado de hidratação da haloisita (JOO, *et al.*, 2013.; ZHANG, *et al.*, 2019).

A haloisita apresenta semelhança química com a caulinita, entretanto as camadas de haloisita são separadas por monocamada de moléculas de água, gerando duas principais formas e denominações da haloisita: sua forma hidratada denominada como haloisita -10 Å devido ao espaçamento basal (d_{001}) de 1,0 nm; e $n = 0$ refere-se à sua forma desidratada, que por sua vez é referida como haloisita-7Å, cuja distância basal (d_{001}) é de 0,7 nm (YUAN *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2016).

As moléculas de água (Figura 2) contidas na região interlamelar da haloisita-10 Å proporciona uma importante influência nas propriedades físico-químicas desta nanoargila em especial na sua reatividade. Essas moléculas de água formam ligações de hidrogênio entre si, com os oxigênios do plano siloxano e com as hidroxilas do plano aluminol (JOSSUEN, E. *et al.*, 2005).

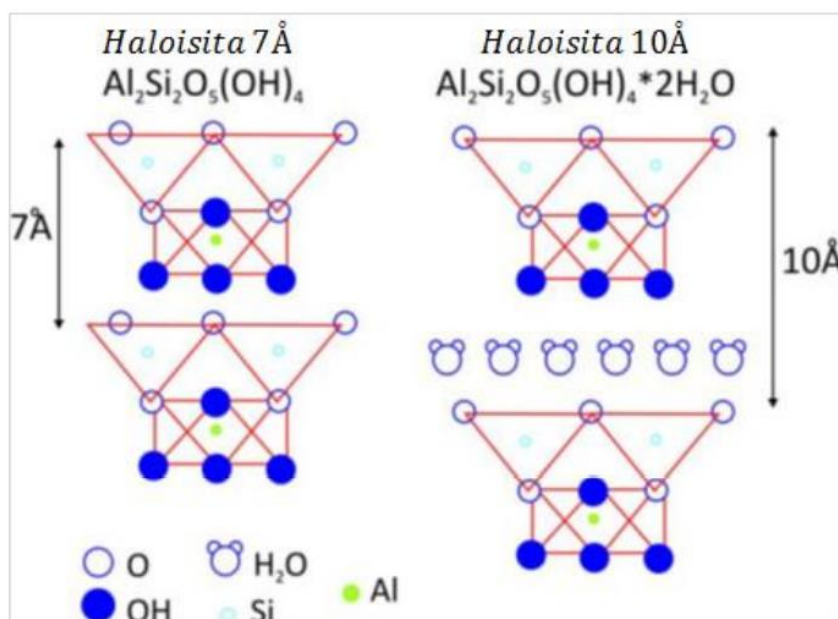


Figura 2. Estrutura da haloisita em relação a molécula de água: (7Å), haloisita desidratada. (10Å), haloisita hidratada. Adaptada de Lázaro, 2015.

Devido a sua biocompatibilidade e a baixa citotoxicidade, além das suas propriedades físico-químicas, os nanotubos de haloisita puros ou funcionalizados, têm sido cada vez mais estudados como sistemas de entrega de drogas nas células podendo ser usados para o carregamento de drogas e moléculas biologicamente ativas, com o objetivo de protegê-las da decomposição, promover uma liberação controlada, direcionar a droga para o alvo específico e até mesmo diminuir os efeitos adversos com a redução da dose tóxica (BIDDECI, *et al.* 2021).

2.2 NIÓBIO

O nióbio (Nb) é um metal de transição pertencente à família 5B da tabela periódica, possui massa atômica de 92,9064 g e que foi descoberto em 1801 pelo químico inglês Charles Hatchett sendo denominado inicialmente de Colúmbio, por ter sido encontrado no mineral columbita. Quarenta e quatro anos depois, em 1845, Henrique Rose, um químico e mineralogista alemão provou que o nióbio é um mineral diferente da tantalita, mineral onde o nióbio é geralmente encontrado em associação, denominando-o de Nióbio em homenagem a Niobe, filha de Tântalo da mitologia nórdica (SEER H. MORAES L.C. 2022).

A maior ocorrência do Nióbio no mundo está localizada no Brasil, correspondendo a 87% do teor mundial, dentre estes, 75% estão localizados em Minas Gerais, mais especificamente em Araxá e Tapira, 21,3% no Amazonas e 4% no estado de Goiás, o restante é distribuído principalmente na Austrália e Canadá (JÚNIOR, 2009; BRASIL, 2010).

O nióbio possui alta afinidade geoquímica com o tântalo, por isso são encontrados juntos na maioria das rochas e dos minerais em que ocorrem. Existe mais de 90 espécies de minerais de nióbio e tântalo conhecidas na natureza, das quais podemos destacar: a columbita-tantalita, com teor máximo de 76% de Nb₂O₅; o pirocloro, com teor máximo de 71% de Nb₂O₅; o bariopirocloro, com teor máximo de 67% de Nb₂O₅ e a loparita com teor máximo de 20% de Nb₂O₅. A columbita-tantalita e o pirocloro são as principais fontes de nióbio no Brasil e no mundo (Figura 3) (JÚNIOR, 2009; BRUZIQUESI, *et al.* 2019).

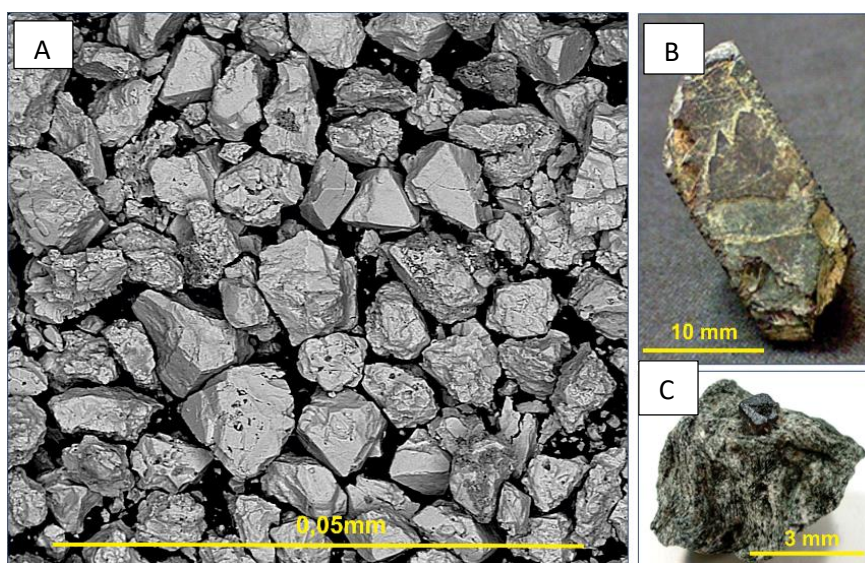


Figura 3. Fontes de nióbio encontradas na natureza. A) Concentrado de pirocloro; B) Columbita-tantalita; C) Cristal maclado de Loparita. Fonte: <http://recursomineralmg.codemge.com.br/> Acesso em 13/5/2022.

O nióbio possui características específicas que o torna um metal promissor sendo bastante explorado em diversas indústrias, em especial na siderurgia compondo diversos tipos de ligas e aços, indústrias automotivas e cerâmica, na tecnologia nuclear e ultimamente vem chamando atenção na indústria médica em razão de suas características biocompatíveis (BRUZIQUESI, *et al.*, 2019).

Dentre as diversas características, o nióbio apresenta baixa dureza e densidade alta (8,57 g/cm³) além de possuir temperatura de fusão a 2.468°C, conduz corrente elétrica livre de resistência em grandes densidades, possui propriedades supercondutoras de temperatura e eletricidade quando em temperaturas abaixo de -264°C é resistente à corrosão, além de ser um metal dúctil (BRASIL, 2010. SEER H. MORAES L.C. 2017).

A Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM) é a principal empresa responsável pela extração do nióbio no Brasil. É realizada através da extração do mineral pirocloro, o qual passa por processos de homogeneização, concentração e refino, até obtenção do óxido de nióbio (CBMM, 2016).

O nióbio tem a capacidade de formar compostos com o oxigênio, sendo denominados de óxidos de nióbio, como por exemplo, dióxido de nióbio (NbO₂) e monóxido de nióbio (NbO), pentóxido de nióbio (Nb₂O₅), este, é o mais bem estudado e possui características anfotéricas, solubilidade em ácidos e bases fortes, é um sólido branco, estável ao ar e insolúvel em água. Suas principais aplicações envolvem o uso em

reações de desidratação, hidratação, esterificação, eterificação, hidrólise, condensação, desidrogenação, alquilação, fotoquímica, eletroquímica, polimerização e reações de oxidação (NEVES JUNIOR. 2014.; LOPES, *et al.*, 2015).

Diversos estudos na área biomédica vêm utilizando o nióbio na tentativa de explorar seu potencial biotecnológico graças a sua biocompatibilidade, principalmente na área da odontologia onde o nióbio vem agregando melhorias nos materiais odontológicos já existentes, como os utilizados nas restaurações, promovendo maior resistência mecânica e durabilidade ao material, além disso, observa-se a presença do nióbio em materiais para implantes, promovendo em alguns casos a osteointegração (BRUZIQUESI, *et al.*, 2019.; DEGRAZIA, *et al.*, 2019).

2.3. LEISHMANIOSE

2.3.1. Abordagem histórica

Segundo dados da literatura, os primeiros casos de leishmaniose foram registrados entre os séculos XVIII e XIX. A leishmaniose cutânea, uma doença comum no norte da Índia e da África e no mediterrâneo oriental, sendo descrita apenas como uma ferida indolor e denominada de diferentes formas de acordo com o local em que ocorria (STEVERDING, D. *et al.*, 2017).

Entretanto, no começo do século XIX, uma doença febril desconhecida e considerada por alguns médicos como uma variação da malária, e que possuía nomes distintos como febre Dumdm e doença negra era na verdade a forma visceral da leishmaniose (LV). Entretanto, somente em 1835 é que ocorreu a primeira descrição da leishmaniose visceral, quando alguns médicos gregos registraram um caso de esplenomegalia infantil na ilha de Hidra, sintoma conhecido que é característico da doença. O termo calazar, usado ainda hoje surgiu na Índia em 1883 e no Hindu significa “doença negra” (COX, 2017; AZIZI *et al.*, 2016).

Apesar das observações feitas nessas épocas, foi a partir de 1900 que as principais descobertas a respeito das leishmanioses aconteceram, nesse ano, um médico militar escocês chamado Willian Boog Leishman examinava amostras de tecidos do baço proveniente de um soldado que havia morrido de calazar na Índia, ele observou corpos ovais no interior das células. A partir daí, foram observados a presença do parasito em outras amostras esplênicas de diversos indivíduos na época. Porém, apenas em 1903, junto com Charles Donovan, William Leishman publicou seus achados e descreveram o

agente causador da leishmaniose, denominando de *Leishmania donovani* (LEISHMAN, 1903.; COX, 2016).

Em 1934 foi descrito no Brasil o primeiro caso de leishmaniose visceral, quando encontraram parasitos do gênero *Leishmania* em amostras *post mortem* de tecido hepático de pacientes com suspeita de febre amarela. Já em 1936, Evando Chagas realizou o primeiro diagnostico *in vivo* da doença, identificando uma nova espécie a qual denominou *Leishmania chagasi* (CHAGAS, E. *et al.*, 1937).

2.3.2. Agente etiológico

As leishmanioses são causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania* que apresenta em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos. Pertencem a família *Trypanosomatidae*, divididos em dois subgêneros de interesse médico: *Leishmania* e *Viannia*, sendo que onze espécies dermatópicas já foram descritas nas Américas (Figura 4) (BORGHI, *et al.*, 2017).

Atualmente, aproximadamente 30 espécies de leishmania foram descritas no mundo, dentre elas, 20 são patogênicas para a espécie humana (AKHOUNDI *et al.*, 2016; BORGHI *et al.*, 2017). No continente europeu, africano e asiático, prevalecem as espécies *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica*. Já no continente americano, os agentes etiológicos mais relevantes são *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonenses*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (KEVRIC, *et al.* 2015). As espécies predominantes no Brasil são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (BRASIL, 2007).

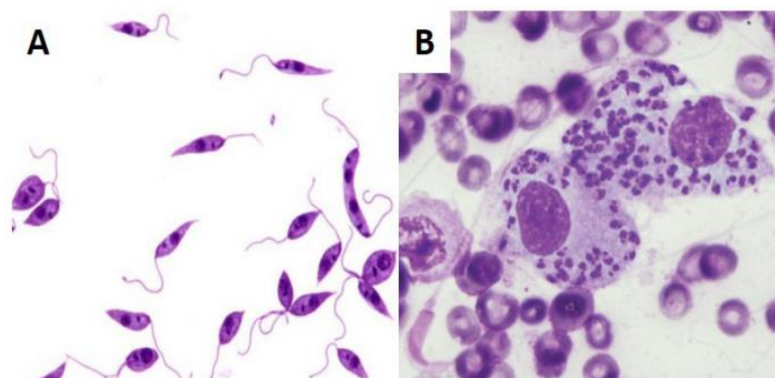


Figura 4. Estágios evolutivos da *Leishmania sp.* A) forma promastigota. B) forma amastigota.
Fonte: Martins, 2016

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo biológico bem definido, caracterizado pela necessidade de um hospedeiro intermediário e um definitivo, compreendido como o ciclo heteroxênico, também chamado de digenético, ou seja, possuem a capacidade de viver em hospedeiros vertebrados como os mamíferos e invertebrados, representados pelos insetos vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (SANTIAGO, A. 2021).

O ciclo de vida do parasito se inicia no vetor, durante o repasto sanguíneo que é realizado pela fêmea do flebotomíneo em um indivíduo infectado, nessa etapa, o vetor ingere sangue com macrófagos e monócitos parasitados com o parasita na sua forma amastigota (intracelular) (Figura 5). Posteriormente, na porção média do intestino do vetor, as amastigotas encontram-se envoltas por uma matriz de proteína, glicoproteínas e quitina, chamada de matriz peritrófica. Seguindo o processo digestivo, já na porção posterior do trato digestório, devido a mudanças bioquímicas como alterações no pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes entre outros, ocorre a diferenciação da forma amastigota para a forma promastigota procíclica, a qual é caracterizada pela presença de um curto flagelo (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007).

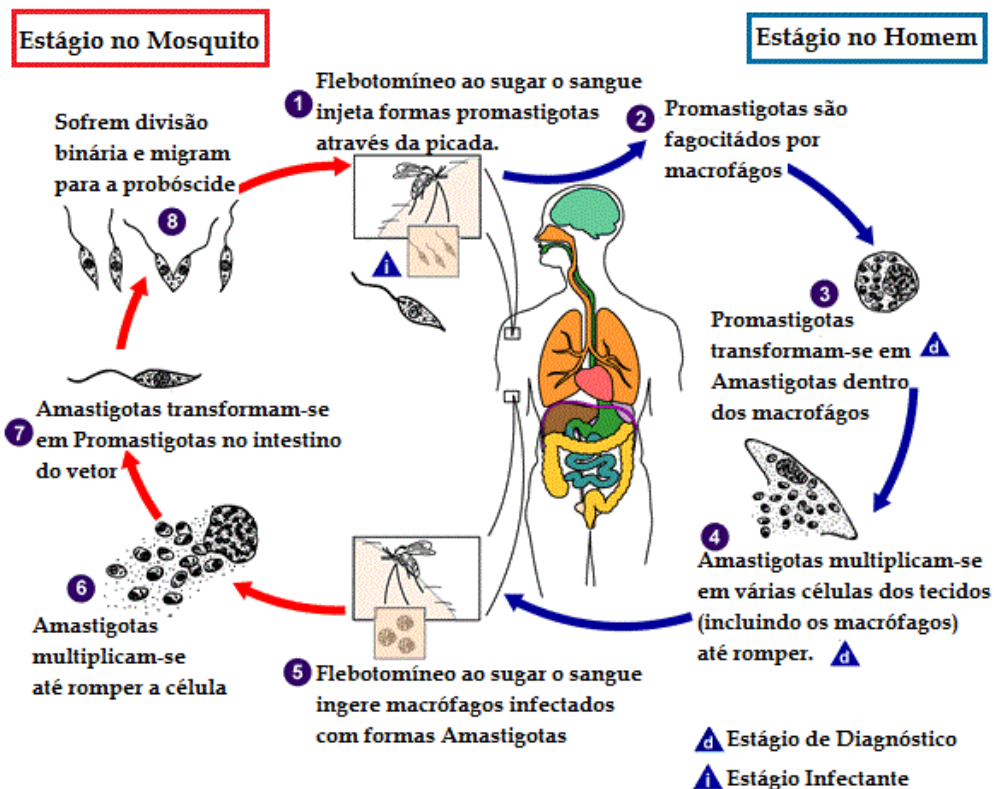


Figura 5. Ciclo de vida da *Leishmania sp.* no mosquito e no homem. Fonte: Adaptado CDC, 2010.

As promastigotas passam por vários estágios de diferenciação que ocorrem de forma gradual e é conhecida como metacicloênese. Inicialmente, as promastigotas procíclicas se diferenciam em nectomonadas, forma tal que propicia sua migração para a porção anterior do intestino do vetor. Em seguida, as nectomonadas se diferenciam em leptomonadas, que é definida por uma replicação acentuada e colonização no segmento anterior do trato digestivo do vetor e por último, evoluem para a forma promastigotas metacíclicas, as quais apresentam um flagelo alongado que confere motilidade ao parasita, definido assim como a forma infectante (KAUFER, *et al.* 2017). Essas formas apresentadas se distinguem basicamente quanto a sua morfologia, exigência nutricional, capacidade de se multiplicarem, taxa de crescimento e a regulação da expressão gênica (PIMENTA, *et al.* 2012).

O ciclo continua quando o flebótomo fêmea infectado realiza um novo repasto sanguíneo inoculando na pele do hospedeiro as formas promastigotas metacíclicas que são regurgitadas em associação com componentes da saliva e fatores imunomodulatórios. Esse processo gera respostas inflamatórias no indivíduo e conseqüentemente a migração de células imunológicas para o local da infecção (KRAVEA, *et al.* 2016; KATO, *et al.* 2010).

Dessa forma, as promastigotas metacíclicas que foram inoculadas, ocasionam uma recrutação de neutrófilos para o sítio da inoculação os quais fagocitam os parasitas onde alguns são capazes de sobreviver dentro dessas células até sofrer fagocitose pelos macrófagos (CHARMOY, *et al.*, 2010). Já no interior do macrófago, especificamente no vacúolo parasitóforo ou fagolisossomo, acontece a diferenciação das formas promastigotas metacíclicas em amastigotas, as quais posteriormente se replicam por divisão binária gerando a lise da célula hospedeira e acarretando a reinfeção de novas células fagocíticas (LIESE; SCHLEICHER, BOGDAN 2008. CHANG, *et al.* 2003, GRIMALDI; SCHOTTELIUS 2001).

2.3.3. Aspectos imunológicos

O padrão e a qualidade da resposta imune, assim como a espécie do parasito, definem a forma clínica apresentada pelo indivíduo. Uma resposta protetora na leishmaniose depende da produção de interferon-gama (IFN- γ) por células T CD4, natural killer (NK) e T CD8. O IFN- γ age sobre os macrófagos ativando-os, o que faz com que produzam espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Outras citocinas

importantes nesse combate são as interleucinas (IL)-2, IL-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais fazem parte do padrão de resposta Th1. O equilíbrio dessa resposta é muito importante, já que uma exacerbação leva à um extremo da clínica (LCM) e a ausência ao outro extremo (LCD) (BRASIL, 2017; NEVES, D.P, 2016; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016).

Uma vez dentro do macrófago, a *Leishmania* modula-o de forma a impedir ou diminuir sua ação microbicida (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). As células dendríticas são a principal fonte de IL-12, citocina essencial na diferenciação de células T CD4+ em Th1, que conferem uma resposta protetora na LC com a produção de IFN- γ e TNF- α . De modo geral a ação sinérgica de IFN- γ e TNF- α é essencial para uma melhor resposta dos macrófagos. No entanto, altos níveis de TNF- α na infecção por *L. braziliensis* coincide com o desenvolvimento de úlceras em humanos (BRASIL, 2017; NOVAIS; SCOTT, 2016).

A regulação da imunidade é essencial para que não haja uma exacerbação dessa resposta e isso gere danos imunomediados. Um dos mecanismos de regulação mais importante nas leishmanioses é a produção de IL-10, que é feita tanto por células T regulatórias (Treg), quanto por células Th1 (ANDERSON *et al.*, 2007). Contudo, níveis elevados de IL-10 podem afetar a ativação de CDs, diminuindo a produção de IL-12, o que pode gerar uma resposta do tipo Th2, com a produção de IL-4, a qual é associada à susceptibilidade da doença (BRASIL, 2017; NOVAIS; SCOTT, 2016).

2.3.4. Manifestações clínicas

A apresentação clínica da doença está relacionada com a espécie do parasito envolvido na infecção, sendo as principais formas clínicas a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) (SANTIAGO A, 2021).

A LV causada pela *L. infantum* e *L. donovani* é a forma mais grave da doença, e se não tratada pode levar à óbito. Cerca de 95% dos infectados são assintomáticos, entretanto, se ocorrer evolução clínica da doença pode ser observado febre prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia, perda de peso, tosse seca, astenia, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Outros sintomas como diarreia, vômito, edema e icterícia podem

ser observados com o decorrer da doença (KAYE; SCOTT, 2011; KUMAR, 2013; ADRIAENSEN *et al* 2018; DE OLIVEIRA *et al* 2010).

A LT agrupa três formas clínicas distintas: Leishmaniose Cutânea (LC), a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), na qual o paciente apresenta lesões não ulceradas difusas por todo o corpo e a Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM), a qual se apresenta como lesões em mucosas, normalmente nas vias aéreas superiores. *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* são as espécies relacionadas com a LT nas Américas (Figura 6) (KUMAR, 2013; VASCONCELOS, *et al.*, 2018).

A LC é forma clínica com menor gravidade, caracterizada por lesões ulceradas únicas no local da picada do vetor onde se iniciam como uma pápula e crescem formando úlceras arredondadas, com bordas definidas e elevadas com um fundo granuloso. As principais espécies envolvidas na LC nas Américas são a *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Já nos países da África, Europa e Ásia, são a *L. major* e *L. tropica* (BRASIL, 2010).

Na LCD, o paciente apresenta lesões não ulceradas difusas que progridem de forma lenta podendo recobrir uma grande extensão cutânea. Geralmente acomete indivíduos imunodeficientes os quais não apresentam uma resposta celular específica para antígenos de *Leishmania* (anergia) e é considerada rara. Nesse caso, na ausência de uma resposta imune celular efetiva, o parasito se multiplica demasiadamente aumentando assim o número de lesões no corpo. Os principais agentes envolvidos são *L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. aethiopica*, porém no Brasil o principal causador da LCD é a *L. amazonensis* (BRASIL, 2010; HANDLER *et al* 2015; GOTO LINDOSO 2012).

Ao contrário da LCD onde existe uma deficiência na resposta imune celular, na LCM ocorre uma resposta imunecelular exacerbada em detrimento a uma baixa quantidade de parasito, que nesse caso o principal é a *L.(V) braziliensis* a qual possui tropismo pelo tecido mucoso. A LCM caracteriza-se principalmente pela presença de lesões graves nas mucosas, a oral e a nasal são as mais afetadas, lesões crônicas na pele também podem ser encontradas (STRAZZULLA, *et al.* 2013).

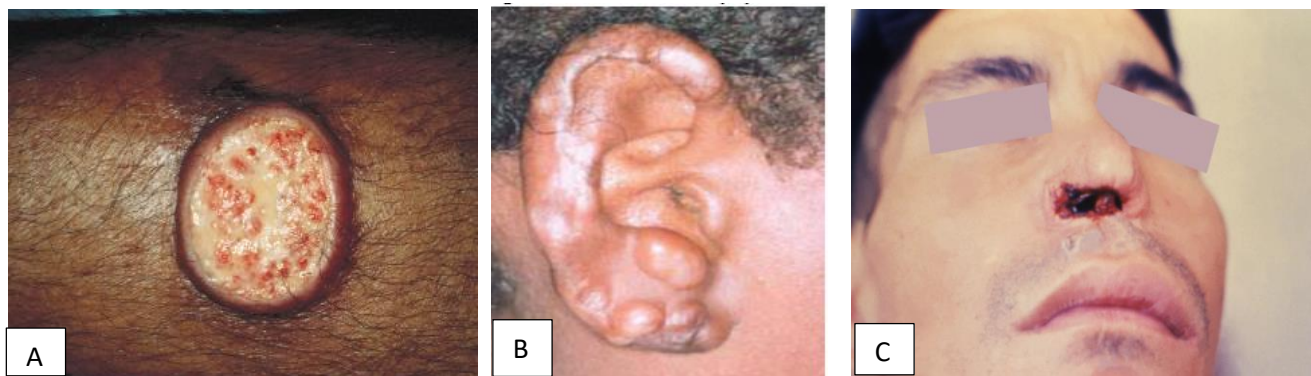


Figura 6. Diferentes formas da leishmaniose tegumentar. A) Leishmaniose cutânea (LC). B) leishmaniose cutâneo difusa (LCD). C) leishmaniose cutaneomucosa (LCM). Fonte: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/protozo%C3%A1rios-extraintestinais/leishmaniose>. Acessado em: 17/05/2022.

De forma geral, o diagnóstico das diferentes formas da leishmaniose humana é realizado através da associação de dados clínicos e epidemiológicos com técnicas laboratoriais específicas, como a sorologia e a detecção do parasita. (GOTO, H. LINDOSO; J.A.L, 2012). O diagnóstico imunológico baseia-se na detecção de anticorpos anti *leishmania* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) que considera amostras positivas na diluição de 1:80 e o Teste Rápido Imunocromatográfico. Já o diagnóstico parasitológico é tido como o diagnóstico exato realizado pelo encontro de formas amastigotas do parasito, em material biológico obtido preferencialmente da medula óssea ou por meio de raspagem das lesões (BRASIL, 2010.; 2022).

2.3.5. Tratamento

De modo geral, o tratamento das leishmanioses no Brasil apresenta um cenário desafiador devido à diversidade encontrada no contexto da transmissão para o homem, que está relacionada com as espécies do parasito, dos vetores, dos reservatórios e dos ecossistemas envolvidos. Essa diversidade por vezes gera uma variabilidade nas características clínicas da doença, embora exista uma certa correspondência entre as distintas apresentações clínicas e as diferentes espécies do parasito (BRASIL, 2010).

A droga de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (Sb+5). Há dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, entretanto este último não é comercializado no Brasil (Figura 7). Nos casos de resistência aos antimoniatos e em algumas condições clínicas específicas onde o paciente não pode fazer uso dos antimoniais, a Anfotericina B e a Miltefosina (hexadecilfosfocolina) têm sido utilizadas como drogas de segunda linha (PIRES, *et al.*; BRASIL, 2010).

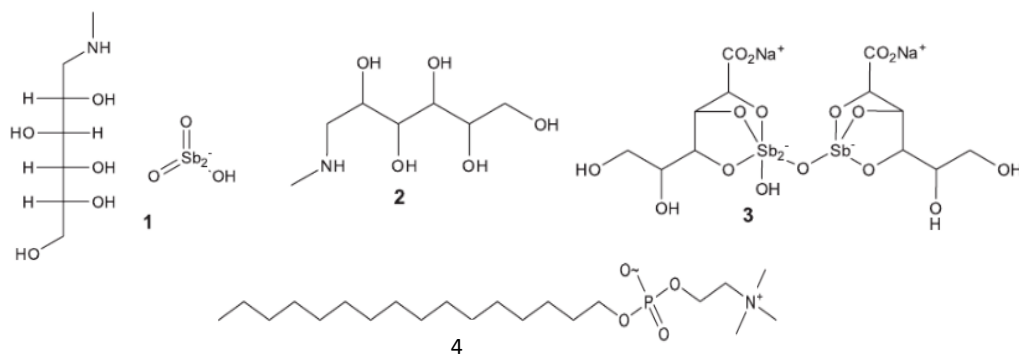


Figura 7. Estrutura química das principais drogas usadas na leishmaniose. 1) glucantime, 2) meglumina, 3) estibogluconato de sódio (Pentosan), 4) mitlfolosina. Fonte: Adaptado de Silva-Jardim 2014.

Utilizados pela primeira vez em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna na forma trivalente (antimônio trivalente - Sb 3+), conhecido como tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), alcançando resultados positivos em alguns casos, tendo em vista que naquela época a maioria dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento estabelecido. Entretanto, essa formulação gerava grande toxicidade aos pacientes como tosse, dores no peito e até depressão, além da difícil administração (PADRÓN-NIEVES, *et al.* 2009).

Em 1937, começou a ser utilizado o estibogluconato de sódio (Pentostan®), onde o antimônio encontrava-se na forma pentavalente (Sb 5+) derivado do ácido estibórico. Nesta forma, houve redução de alguns efeitos colaterais e a toxicidade que o tártaro emético apresentava. Atualmente o estibogluconato de sódio não é comercializado no Brasil, sendo utilizado em países de língua inglesa. No Brasil, o antimonial usado é o antimoniato de N-metilglucamina, também um antimonial pentavalente (Glucantime®) (PADRÓN-NIEVES *et al.* 2009).

É indicado para o tratamento de todas as formas clínicas da LTA, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. É recomendado pela Organização Mundial de Saúde (2012), a dose de 20 mg/kg por dia, durante 28 dias para o tratamento de LTA devendo ser administrados por via endovenosa ou intramuscular. As lesões ulceradas podem sofrer contaminação secundária, razão pela qual devem ser prescritos cuidados locais como limpeza com água e sabão (CARVALHO, *et al.*, 2019).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi totalmente elucidado, mesmo sendo comprovada a sua eficácia desde que começou a ser utilizado.

Entretanto, há um consenso que essa droga pode atuar em diversas vias do metabolismo celular do parasita, principalmente interferindo na bioenergética das formas amastigotas da leishmania, atuando na glicólise e oxidação dos ácidos graxos, gerando uma depleção de ATP. Outros mecanismos foram observados, como interferência na síntese e indução do efluxo de tióis, e um ação similar a endonucleases levando a célula a apoptose (CATALDO, *et al.*, 2018; WYREPKOWSKI, *et al* 2020).

Os efeitos colaterais gerados por esses medicamentos são diversos, o Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (Brasil, 2017), aponta que durante o tratamento podem ocorrer um ou vários dos seguintes sintomas: artralgia, mialgia, náuseas, vômitos, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, tontura, edema e insuficiência renal aguda, além de dor no local da injeção. Nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade também foram observados, sendo essa última um dos fatores determinantes na avaliação dos efeitos colaterais das drogas de referência para o tratamento das leishmanioses, pois podem gerar danos irreversíveis como a insuficiência renal crônica (HOLANDA, *et al.* 2018).

A anfotericina B (AmB) é um antibiótico da classe dos polienos, de alto peso molecular a qual possui atividades antifúngicas e leishmanicidas, sendo isolado pela primeira vez em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus*. Tem um caráter hidrossolúvel, anfotérica e anfipática, e apresenta baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos (Figura 8) (FALCI e PASQUALOTTO, 2015; PEREZ, *et al*, 2015).

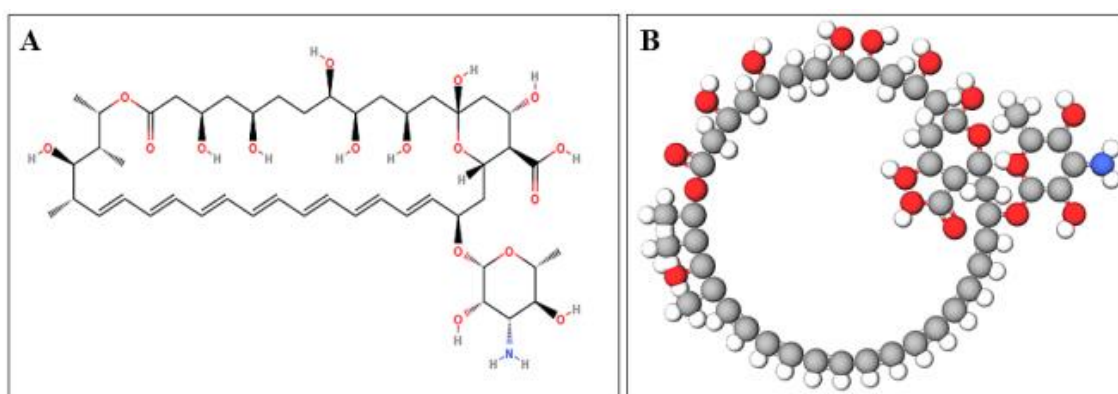


Figura 8. Representação gráfica da molécula da Anfotericina B. A) representada em linhas. B) bola e bastão. Fonte: Holanda et al, 2018.

A AmB apresenta um amplo espectro de ação e eficácia frente a micoses sistêmicas, apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado,

todavia, sabe-se que o efeito direto na membrana é o principal mecanismo que a anfotericina B utiliza para causar a morte celular; esse mecanismo se dá pela ligação e desestabilização do ergosterol presente na membrana dos fungos e de alguns protozoários como a leishmania, levando a formação de poro que resultam em perda da sua integridade e conseqüentemente perda de potássio e outros íons essenciais à célula. Além da lesão direta na membrana celular, a indução do estresse oxidativo é outro mecanismo de ação importante da AmB responsável pelo seu efeito antimicrobiano (LEMKE, A. *et al*, 2005; MESA-ARANGO, *et al*, 2012; WYREPKOWSKI, *et al*, 2020).

A principal limitação no uso clínico da AmB é devido a nefrotoxicidade observada nos pacientes, alcançando índices entre 49 a 65%. O mecanismo pelo qual a AmB causa nefrotoxicidade é mediado principalmente pela apoptose das células renais, bem como outros eventos, como hipocalcemia, hipomagnesemia e acidose metabólica. Essa nefrotoxicidade geralmente ocasiona perda da função renal levando o paciente a diálise (VARLAM, *et al*, 2001).

A toxicidade da AmB também é observada em efeitos agudos nas reações infusionais, que estão relacionadas com a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6, são caracterizadas por sintomas como calafrios, febre repentina, náuseas e vômitos, cefaleia, hipotensão, arritmias, taquicardia e dispnéia durante a infusão da AmB. Já os efeitos subagudos, caracterizam-se pela toxicidade renal, hematológica e hepática (LANIADO, 2009; LEMKE, A. *et al*, 2005; WYREPKOWSKI, *et al*. 2020).

Nesse contexto, na tentativa de amenizar a toxicidade no uso da AmB foram desenvolvidas formulações à base de lipídios. Hoje, existem, três formulações lipídicas disponíveis no mercado: Ambisome® é a anfotericina B lipossomal (L-AmB); Abelcet® corresponde ao complexo lipídico de anfotericina B (ABLC); Amphotec® ou Amphocil® é a dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD). A (L-AmB e ABLC) são as mais utilizadas na prática clínica e disponíveis no mercado brasileiro (FALCI e PASQUALOTTO, 2015).

A utilização da anfotericina B é indicada quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimônio pentavalente ou na impossibilidade de seu uso. A administração da anfotericina B deve ser evitada em pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (MARTINEZ, 2006). Devido à baixa solubilidade, a AmB não é administrada por via oral, sendo utilizada por via endovenosa, com infusão lenta,

na vazão máxima de 2,5 mg/kg/h. A dose diária única de 1 mg/Kg de peso corporal resulta em concentrações séricas máximas aproximadas de 1 a 2 µg/mL na primeira hora após infusão, e estima-se a sua meia-vida inicial em 24 a 48 horas (WORTMANN G, *et al.*, 2010.; NEVES, *et al.*, 2011).

Nessa perspectiva, novas pesquisas vêm surgindo nas últimas décadas afim de desenvolver alternativas terapêuticas com ações eficazes e seguras para o tratamento das leishmanioses. Nesse cenário, destaca-se o uso da nanotecnologia que tem como objetivo redução da dose e direcionamento do fármaco para o alvo específico. Nanopartículas metálicas, como ouro, prata, óxido de zinco e dióxido de titânio, têm se mostrado promissoras no tratamento das leishmanioses por serem facilmente preparadas e modificadas quimicamente, possuem amplo espectro de ação e baixa toxicidade, podendo gerar espécies reativas de oxigênio que favorecem seu uso contra diferentes espécies de *Leishmania* (GUERRA *et al.*, 2022).

Nanocompósitos a base de óxido de zinco e óxido de prata foram efetivos na inibição da replicação de *L. braziliensis* intra e extracelular além de modular e ativar a expressão de receptores de superfície gerando a produção de citocinas induzindo uma resposta pró-inflamatória, tornando esse nanocompósitos de Ag-ZnO/AgO como uma opção promissora para o tratamento da leishmaniose tegumentar (BARBOSA *et al.*, 2022).

Nanopartículas lipídicas sólidas modificadas (SLNs) modificadas com 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina com base no sistema de carga combinada oral de Anfotericina B (AmB) e Paromomicina (PM) foram desenvolvidas a fim de obter uma terapêutica oral eficaz contra a leishmaniose visceral em murinos (PARVEZ *et al.*, 2020).

Nanomicelas funcionalizadas com manose contendo Anfotericina B e Doxorrubicina (DOX) foram desenvolvidas para o tratamento da leishmaniose visceral. Elas têm como alvo os macrófagos infectados através interação entre resíduos de manose presente na micela e receptores de manose (MRs) na membrana do macrófago. A combinação de AmB e DOX levou a uma maior eficácia terapêutica anti-leishmania através de um efeito sinérgico tornando-as promissoras para o tratamento da leishmaniose (WEI *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o atual esquema terapêutico disponível para o tratamento das leishmanioses pode acarretar complicações para o paciente devido a sua toxicidade, além de gerar despesas devido ao tempo de tratamento, contribuindo assim para o abandono. É primordial o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, que permitam a redução da toxicidade e um aumento de resultados positivos para o paciente.

Nossa estratégia visa a utilização de um material inovador com potencial farmacológico a fim de oferecer novas alternativas para o tratamento das leishmanioses de uma forma menos tóxica. Vale salientar que as argilas já são usadas em cosméticos, logo, pode ser transformada em tratamento tópico de leishmaniose cutânea, além disso, possui características físico-químicas e de biocompatibilidade que permite seu uso como sistema de entrega de fármacos podendo ser usada para leishmaniose visceral, e transformar novas estratégias terapêuticas em realidade a população.

Além da argila, utilizaremos o nióbio como matéria prima para a construção das nanoformulações associada aos fármacos antileishmania a fim de avaliar seu potencial farmacológico. O nióbio é um metal utilizado por diversas indústrias no mundo inteiro, e que despertou o interesse aqui no Brasil após a descoberta de grandes reservas, principalmente em Araxá-MG. Ainda é um material pouco explorado do ponto de vista biológico, apesar de encontrarmos alguns estudos relacionados a próteses e materiais para uso odontológico, é necessário a realização de mais pesquisas, a fim de determinar possíveis usos.

Nossa hipótese é que as nanoformulações de HNT e Nb com os fármacos antileishmania sejam capazes de promover uma boa resposta no tratamento de leishmanioses.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Sintetizar, caracterizar e avaliar o efeito leishmanicida de nanotubos de haloisita sintetizados com nióbio e conjugados com drogas antileishmania (Anfotericina B e Glucantime®).

4.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar compósitos de haloisita bruta e nióbio e conjugá-los com Glucantime® e Anfotericina B.
- Realizar a caracterização físico-química dos compósitos.
- Determinar a IC_{50} e viabilidade celular dos nanotubos de haloisita bruta e sintetizados com nióbio e conjugadas com os fármacos sobre culturas de células VERO.
- Avaliar a curva de crescimento celular de *L.major* em contato com nanotubos de haloisita bruta e sintetizados com nióbio.
- Infectar macrófagos humanos com *L.major* e tratar com as nanoformulações para avaliar sua eficácia.
- Determinar a expressão de citocinas em macrófagos humanos infectados submetidos ao tratamento com as nanoformulações.

5. METODOLOGIA

5.1. Síntese da haloisita com nióbio

Os nanotubos de haloisita (HNTs) foram adquiridos pela (Sigma Aldrich, San Luis, EUA) e o nióbio foi disponibilizado na forma de oxalato amoniacal de nióbio pela Universidade Federal da Paraíba, campus I. Sintetizamos em duas proporções de haloisita/nióbio, a primeira utilizamos 500 mg de haloisita para 3,86 g de oxalato de nióbio, correspondendo a 75% de nióbio, a segunda utilizamos 1g de haloisita para 3,86 g de nióbio, correspondendo a 50% de nióbio. Em um erlenmeyer foram adicionados 100 ml de água destilada e submetidos à agitação magnética em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, centrifugamos a amostra a 7500 rpm por 5 minutos. O pellet formado foi deixado *overnight* em estufa a 60°C para secar, após a secagem, o pó foi peneirado em peneira de 200 mesh e armazenado.

5.2 Síntese dos compósitos de haloisita e nióbio com drogas antileishmania

Para a síntese dos compósitos foram utilizados 150 mg de haloisita bruta (HNT) e haloisita conjugada com nióbio nas duas proporções sintetizadas anteriormente (HNT+Nb50% e HNT+Nb75%), a variação ocorreu na concentração dos fármacos, onde utilizamos 10 mg do pó da anfotericina B comercial (Anfo) e 3,30 µl de glucantime (Glu), também comercial. Num erlenmeyer envolto com papel alumínio, diluímos em 100 ml de água destilada as concentrações descritas anteriormente dos fármacos e submetemos a agitação magnética em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse tempo, medimos o pH das soluções devido ao ponto isoelétrico inerente aos fármacos utilizados (Tabela 1) e centrifugamos a solução a 7500 rpm por 5 minutos, em seguida lavamos o resíduo com água destilada duas vezes, seguidas de novas centrifugações. O pellet formado foi colocado *overnight* em estufa a 60°C para secar. Após a secagem, o pó foi peneirado e armazenado (LI *et al.*, 2017). Toda a síntese ocorreu de forma que as amostras não obtivessem contato com a luz para evitar fotodegradação dos fármacos.

5.3 Microscopia eletrônica de varredura da haloisita bruta

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras foram realizadas na Universidade Federal da Paraíba no laboratório de Solidificação Rápida-LSR. Utilizou-se um microscópio com fonte por emissão de campo (FEG) modelo

MIRA3 LMH (TESCAN), operando em uma aceleração de 30 kV e equipado com um detector de energia dispersiva de raios-X (EDS) - modelo Ultim Max 65, marca Oxford - e um detector de elétrons difratados EBSD. Para a realização dessa análise, as amostras foram fixadas em fita de carbono e recobertas com 22,5 nm de ouro em um aplicador de pulverização controlado digitalmente (modelo K550x Emitech/Quorum sputter coater) durante 1 min e 30 s a 25 mA, por um plasma gerado sob uma atmosfera de argônio.

5.4 Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram realizadas na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. (UFTM), obtido por meio de microscópio eletrônico de transmissão, modelo Zeiss, EM 109 (Carl Zeiss), operando com aceleração de 30 kV. Para realizar esta análise, 10 µg das amostras foram previamente dispersas em 10 ml de água ultrapura por ultrassom (40 kHz, 10 min). Em seguida, 10 µl da solução foi pipetada na grade e inserida no microscópio.

5.5 Difração de raio-x (DRX) da haloisita bruta e conjugada com nióbio

Foi realizada a análise de difração de raios – X, da haloisita bruta no laboratório de combustíveis (LACOM) da Universidade Federal da Paraíba, utilizando um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD – 6000, com potência de 2 kVA, voltagem de 30 kV, corrente de 30 mA e radiação $K\alpha$ do cobre ($\lambda = 0,15406 \text{ \AA}$). Para cada análise, realizou-se uma varredura no intervalo de 4° a 65° com passo de $0,02^\circ$ e velocidade de 0.50 (graus/min).

5.6 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) dos compósitos

Para a caracterização da haloisita bruta, foi realizada uma análise por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), realizada através com espectrofotômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21, utilizando-se faixa espectral entre 4.000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , 16 scans e resolução de 4 cm^{-1} . A amostra foi preparada utilizando pastilhas de Brometo de potássio (KBr). Essas análises foram executadas na Universidade Federal da Paraíba, no laboratório de combustíveis (LACOM).

5.7 Determinação da IC₅₀ e viabilidade celular das nanoformulações de haloisita e nióbio e conjugadas com os fármacos

O ensaio de IC₅₀ foi realizado em triplicata, utilizando as amostras de nanotubos de haloisita bruta (HNT), nióbio (Nb), haloisita+nióbio a 75% (HNT+Nb75%) e haloisita + nióbio a 50 % (HNT+Nb50%) na concentração a partir de 14 mg/mL. Para o teste de viabilidade celular, usamos três concentrações de nanotubos de haloisita conjugados com Glucantime e Anfotericina B (100, 10 e 1µg/mL). Foram plaqueadas 5x10⁵ de células VERO cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, na placa de 96 poços e submetidas ao contato direto com os compósitos, em seguida incubadas por 12 horas na estufa com CO₂ a 5% a 37°C. No dia seguinte, foi adicionado 5 µl de resazurina e feito a leitura da placa no leitor de fluorescência EnSpire® (Perkin Elmer, Alemanha) com excitação à 550nm e emissão à 590nm. Realizamos três leituras com o intervalo de 20 min entre elas. Os dados foram plotados no Graphpad Prism® 8 (versão 8.0.2) onde obtivemos os valores aqui descritos.

5.8 Cultivo celular da *L.major*

Foram utilizadas cepas de *Leishmania major* da linhagem LT252 mantidas em meio Schneider suplementado com 20% de SFB (Schneider 20%), cultivadas em garrafas de 25mm³ e armazenadas a 28°C em estufa BOD. Para experimentação, utilizou-se os parasitos na fase estacionária de crescimento, compreendida no quinto dia. As formas promastigotas metacíclicas de *L. major* foram primeiramente filtradas com uma seringa de insulina para desfazer rosetas e, logo após, foram isoladas da cultura em fase estacionária por centrifugação de 150 G por 1 minuto, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação, de 2000 G por 30 minutos, também a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células formado dessa centrifugação foi resuspendido em 10mL de RPMI 10%.

5.9 Avaliação da taxa de crescimento em formas promastigotas de *L.major*

Em uma placa de 96 poços, utilizamos uma concentração inicial de 1x10⁵ de formas promastigotas de *L.major* cultivadas em meio Schneider suplementado com 20%

de Soro Fetal Bovino. Submetemos as células em contato direto aos compósitos (HNT, HNT+Nb50% e HNT+Nb75%) os quais foram diluídos em meio Schineider incompleto em três concentrações diferentes (100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL) e acompanhamos a curva de crescimento por 6 dias através da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. O ensaio foi realizado em triplicata e os dados foram plotados no programa Graphpad Prism® 8 (versão 8.0.2) gerando a curva de crescimento.

5.9.1 Cultivo celular de monócito THP-1

Para a manutenção, foram utilizados monócitos THP-1, em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (RPMI 10%) e 20µg/mL de gentamicina. Eles foram cultivados em garrafas de cultivo de 25mm³ e mantidos na estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂).

5.9.2 Infecção de macrófagos THP-1 com *L. major*

THP-1 em cultivo foram plaqueadas em duas placas de 96 poços, nas concentrações de 5x10³ e 5x10⁴, respectivamente, para serem diferenciadas em macrófagos e aderirem ao fundo da placa. O volume final em cada poço foi 200 µl. A diferenciação foi realizada a partir da adição de Phorbol Myristate Acetate (PMA) a 185 ng/mL, durante 4 dias. A cultura de *L. major*, após 7 dias de crescimento, foi retirada da placa de 6 poços mantida com 5mL de meio M1.99 e 10% de SBF. Foi feita a centrifugação diferencial dos parasitos e posterior contagem na Câmara de Neubauer. Os parasitos foram ressuspensos em RPMI 1640 a 5% de SBF e a solução dos mesmos foi adicionada às placas de THP-1, já diferenciados, na quantidade de 1x10⁶ parasitos por poço. Para a adição dos parasitos, utilizando um MOI 20:1, foram retirados 100ul do volume final dos poços e adicionados 100µl da solução contendo os parasitos ressuspensos, completando 200 µl finais por poço. As placas foram incubadas *overnight* na estufa a 37°C com 5% de CO₂.

5.9.3 Tratamento das células infectadas com as nanoformulações

Após completar a infecção das células, as placas foram preparadas para receber os tratamentos. Todo o volume dos poços de ambas as placas foi retirado e adicionou-se 100

μl de meio RPMI 1640 a 5% de SBF. Em seguida, foram adicionados 100 μl dos tratamentos conforme a disposição dos mesmos no mapa experimental previamente desenhado. Cada tratamento foi adicionado em triplicata, nas concentrações de 100, 10 e 1 μg/mL. Os controles nas placas foram feitos com Anfotericina B e Glucantime®, ambos na concentração de 400 μg/mL, HNT e meio nas três concentrações (100, 10 e 1 μg/mL) e *L. major* infectada em THP-1 e meio. Após a adição dos tratamentos nas duas placas, ambas foram mantidas na estufa a 37°C e 5% CO₂, por 72 horas. Após as 72h, o sobrenadante da placa contendo 5x10³ macrófagos por poço foi retirado para o ensaio de imunofluorescência. Ao volume restante dos poços na placa de 5x10⁴, foi adicionado RNALater para conservação das células infectadas para futuros experimentos.

5.9.4 Determinação do parasitismo em THP-1

A placa infectada com THP-1 teve seu sobrenadante coletado e armazenado no congelador a - 20°C. Ao volume restante de cada poço foram adicionados 50 μL de metanol gelado para fazer a fixação das células. Após essa etapa, a placa foi deixada na geladeira a - 20°C por 1 hora. Transcorrido esse intervalo, os poços foram bloqueados com 50 μL de PBS 1x-Saponina 0,1% + soro de coelho a 10% por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-Saponina 0,1% e foram adicionados mais 50 μL dessa solução em cada poço, incubando por 30 minutos no ambiente. Passado esse período, foram adicionados 50 μL de PBS-Saponina 0,1% + anticorpo anti-leishmania (pool de soro de pacientes infectados) em uma diluição 1:10 e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Transcorrido esse tempo, novamente lavou-se os poços da placa com PBS-Saponina 0,1% quatro vezes e se fez a incubação, por 1 hora, com 50 μL de anticorpo anti-IgG-FITC (fluorescente) + PBS-Saponina 0,1% em uma diluição 1:100, adicionando, também, 1 μl de iodeto de propídio em cada poço; a placa foi envolvida em papel alumínio durante essa etapa. Por fim, passado o tempo, a placa foi lavada quatro vezes com PBS-Saponina 0,1% e se adicionou, ao final, 50 μL de PBS 1x em todos os poços após a última lavagem.

Após as marcações feitas com anticorpo anti-Leishmania seguido de anti-IgG-FITC – cora as células em verde – e Iodeto – cora núcleos celulares em vermelho, a placa foi levada ao microscópio de fluorescência EVOS® para fazer as fotografias. Para prosseguir com a etapa de contagem dos parasitos, respeitando o MOI de infecção, foram

contadas 200 células por poço, referente a cada tratamento segundo o mapa experimental. A contagem de células foi registrada em uma planilha de cálculos no Excel. Após a contagem de todos os poços da placa corada, a tabela do Excel contabiliza, em média, os valores obtidos para, enfim, quantificar a infectividade dos parasitos nas células.

5.9.5 Produção de citocinas em THP-1 infectados e tratados

O teste foi realizado através do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o sobrenadante da placa previamente infectada e tratada com as nanoformulações na concentração de 5×10^4 células por poço. O sobrenadante foi retirado e armazenado na geladeira a -20°C para posterior quantificação de TNF- α , IL-4, IL-1 e IL-6.

5.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Graphpad Prism® 8 (versão 8.0.2). Foram testadas a distribuição e variância em todas as variáveis. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea foi utilizado o teste paramétrico ANOVA. Quando a distribuição foi não gaussiana, utilizou-se não paramétrico ANOVA Kruskal Wallis. Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$ (5%).

6. RESULTADOS

6.1 Síntese dos compósitos de haloisita e nióbio com drogas antileishmania

Após a síntese e preparo da amostra, obtivemos um pó branco homogêneo correspondente a síntese com o Glucantime, já com a Anfotericina B, o pó resultante apresentou-se de coloração amarelada, típica da Anfotericina B comercial (Figura 9). As soluções após a síntese estavam em pH neutro conforme descrito na tabela 1.

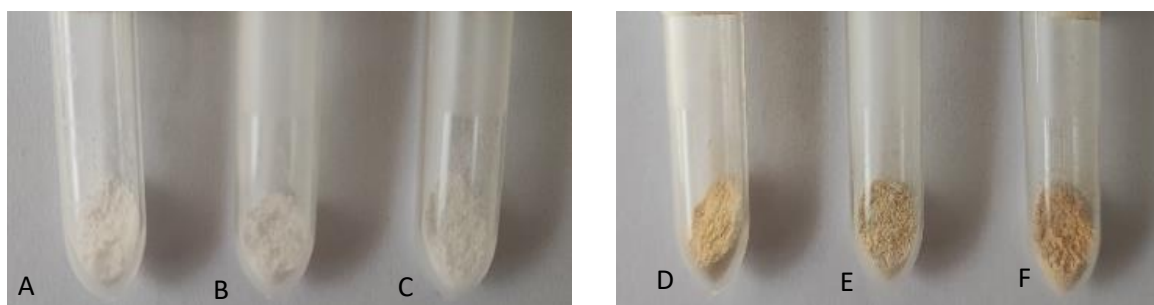


Figura 9. Compósitos contendo glucantime e anfotericina B. A) HNT+Glu; B) HNT+Nb75% + Glu; C) HNT+Nb50% + Glu; D) HNT+Anf; E) HNT+Nb75%+Anf; F) HNT+Nb50%+Anf.

Tabela 1. Valores do pH das soluções obtidos após a síntese

| Compósitos | pH após a síntese |
|-----------------|-------------------|
| HNT+Glu | 6,17 |
| HNT+Nb 50%+ Glu | 6,25 |
| HNT+Nb 75%+ Glu | 7,05 |
| HNT+Anf | 7,15 |
| HNT+Nb 50% +Anf | 7,15 |
| HNT+Nb 75% +Anf | 6,54 |

Fonte: autor, 2022.

6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da haloisita bruta

De acordo com as imagens obtidas do MEV (Figura 10) a haloisita utilizada no trabalho possui estrutura tubular e encontra-se na faixa nanométrica devido ao seu tamanho na faixa de 44 nm a 126 nm e circunferência interna variando na faixa de 14 a 16 nm. Entretanto, com essa técnica não foi possível observar o tubo oco característico da haloisita.

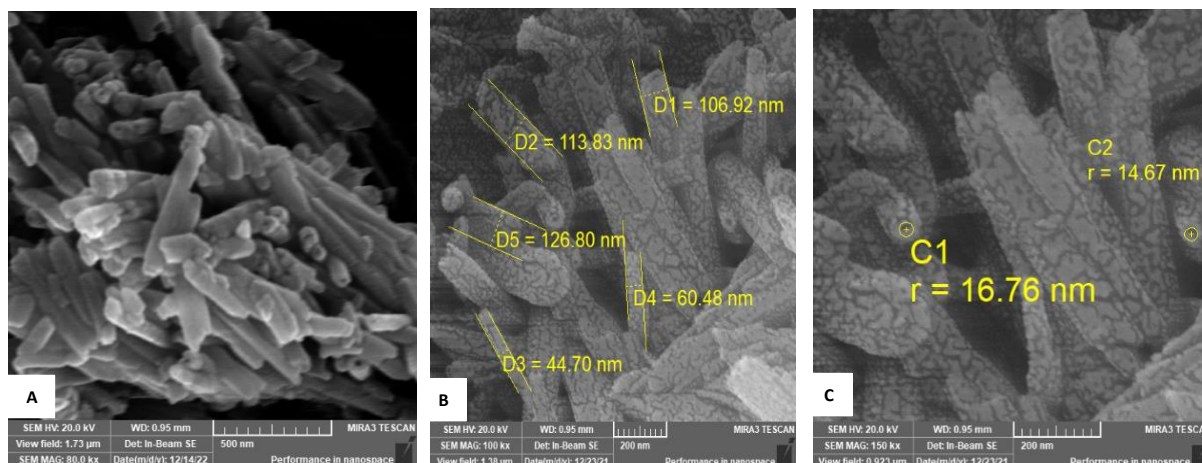


Figura 10. Imagens de MEV da haloisita bruta utilizada no trabalho. A) aumento de 80kx evidenciando a estrutura tubular da haloisita. B) aumento de 100kx, é possível observar os tamanhos variados dos nanotubos. C) aumento de 150 kx mostrando a circunferência da abertura do nanotubo.

6.3 Microscopia eletrônica de transmissão das nanoformulações

Através da análise de microscopia eletrônica de transmissão, observamos a estrutura oca característica dos nanotubos de haloisita brutos (Figura 11.A). Após a síntese com as drogas, não observamos a estrutura oca conforme figura 11-B, referente a HNT+Anfotericina B, onde observamos aumento da opacidade no nanotubo, assim como com a síntese de HNT+Glucantime e HNT+Nb50% +Anfotericina B (Figura 11.C,D).

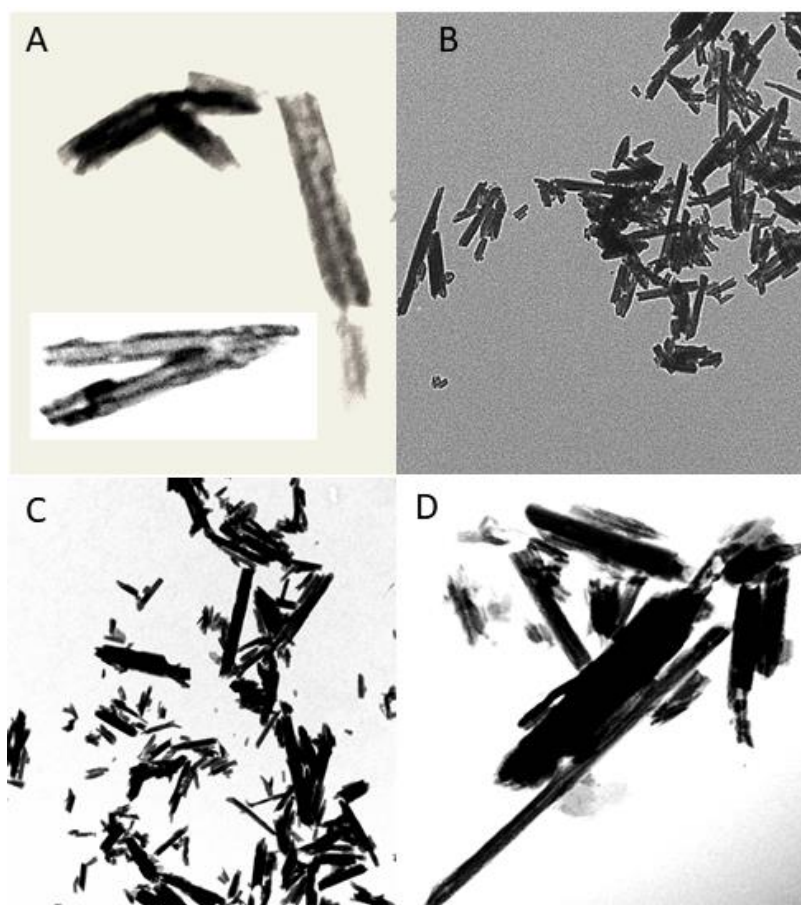


Figura 11. Imagens TEM de (A) HNT bruta; (B) HNT+Anf; (C) HNT+Glu; (D) HNT+Nb50%+Anf. Fonte: autor, 2022.

6.4 Difração de raio-x da haloisita bruta e com nióbio

O difratograma de raios-X da haloisita bruta (Figura 12) apresentam reflexos fracos e amplos, principalmente em razão ao seu pequeno tamanho de cristal, alto grau de desordem e interstratificação de camadas com diversos estados de hidratação. Os padrões XRD para HNT bruto indicaram a presença de parcialmente forma hidratada indicada pela ampla reflexão (001) em 2θ de $8,87^\circ$ e $11,50^\circ$ que estão associados a distâncias interplanares de 0,76 e 1,00 nm, respectivamente (OUYANG *et al.*, 2018).

Nos padrões de DRX dos compósitos HNT+Nb 50% e HNT+Nb 75%, não foram observados deslocamentos no plano principal da HNT. Contudo, as reflexões da haloisita apresentaram picos mais intensos e definidos neste plano à medida que foi adicionado nióbio, indicando uma interação entre a HNT e o nióbio.

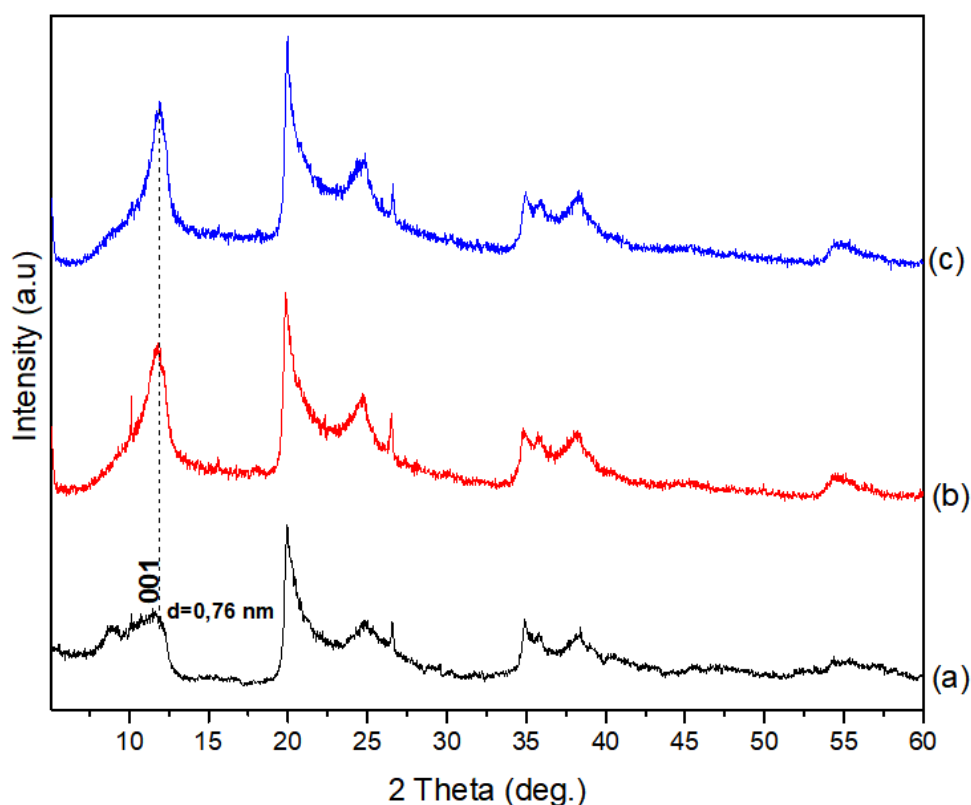


Figura 12. Difratograma da haloisita bruta (a) e dos compósitos HNT-Nb 50% (b) e HNT-Nb 75% (c).

6.5 Análise de infravermelho (FTIR) dos compósitos

O espectro FTIR para HNT bruto exibiu duas bandas típicas em 3697 e 3620 cm^{-1} atribuídas ao alongamento OH dos grupos hidroxila da superfície interna com um momento de transição quase perpendicular ao plano 001 e situado no plano 001, respectivamente (YUAN, P., 2016). A banda em 1633 cm^{-1} corresponde à deformação OH da água adsorvida. Absorções em 1091 e 1030 cm^{-1} foram atribuídas ao alongamento apical Si-O antisimétrico e simétrico, respectivamente. A banda observada em 912 cm^{-1} corresponde à deformação Al-O-H dos grupos hidroxila internos e as bandas na faixa de 694 e 754 cm^{-1} foram atribuídas a esticamentos perpendiculares de Si-O, provavelmente envolvendo superfícies hidroxiladas (KLOPROGGE, J. T., 2016). Duas bandas em torno de 539 e 472 cm^{-1} foram atribuídas a flexões Al-OSi e Si-O-Si, respectivamente (OUYANG *et al.*, 2018). Além disso, a pequena banda em 430 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação Si-O (LUO *et al.*, 2020., THARMAVARAM; PANDEY; RAWTANI, 2018).

Os espectros referentes aos compósitos de HNT+Anf, HNT+Nb50%+Anf e HNT+Nb75%+Anf (Figura 13. b, c, d) mostraram o aparecimento de novas bandas em 3437 e 1114 cm^{-1} que foram atribuídas a O-H (álcool) e C-O os alongamentos, respectivamente, da estrutura da Anfotericina B (GAGOŚ; ARCZEWSKA, 2012., (GHOSH *et al.*, 2017). A curvatura OH da água mudou de 1633 cm^{-1} para 1641 cm^{-1} observada nos espectros dos compósitos (Figura 13- (b-d) e figura 14- (b-d)).

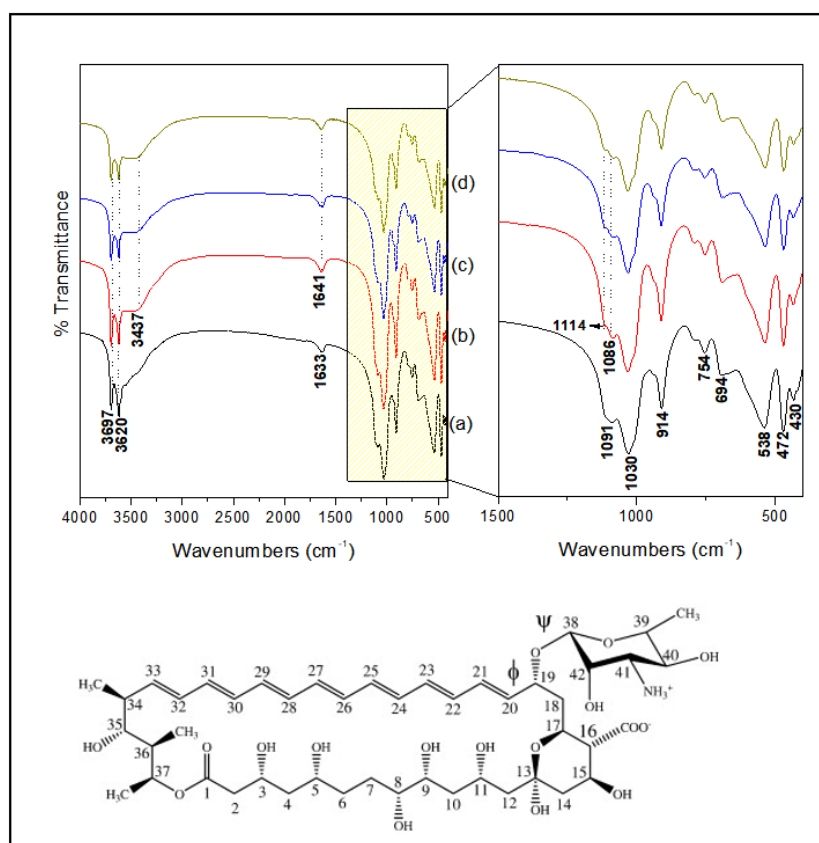


Figura 13: Espectros de FTIR da haloisita bruta (a) e dos compósitos HNT+Anf (b), HNT+Nb50%+Anf (c) e HNT+Nb75%+Anf (d) e representação química da molécula da Anfotericina B

Os espectros dos compósitos de Glucantime (Figura 14) apresentaram uma ampla banda de absorção na região de 3436 cm^{-1} que pode ser atribuído ao alongamento da amina secundária presente na molécula do fármaco (HE *et al.*, 2022). Além disso, a formação dos compósitos obtidos foi acompanhada pelo deslocamento da banda de alongamento do Si-O (1091 cm^{-1}) para números de onda menores (1086 cm^{-1} e 1084 cm^{-1} , respectivamente para HNT+Nb+Anf e HNT+Nb+Glu) que é atribuído às interações entre a haloisita e as drogas por meio de pontes de hidrogênio (ALISHAHI *et al.*, 2020). O mesmo comportamento também foi observado em HNT+Glu, HNT+Nb50%+Glu e HNT+Nb75%+Glu com deslocamento de 694 cm^{-1} a 690 cm^{-1} e 539 cm^{-1} a 536 cm^{-1}

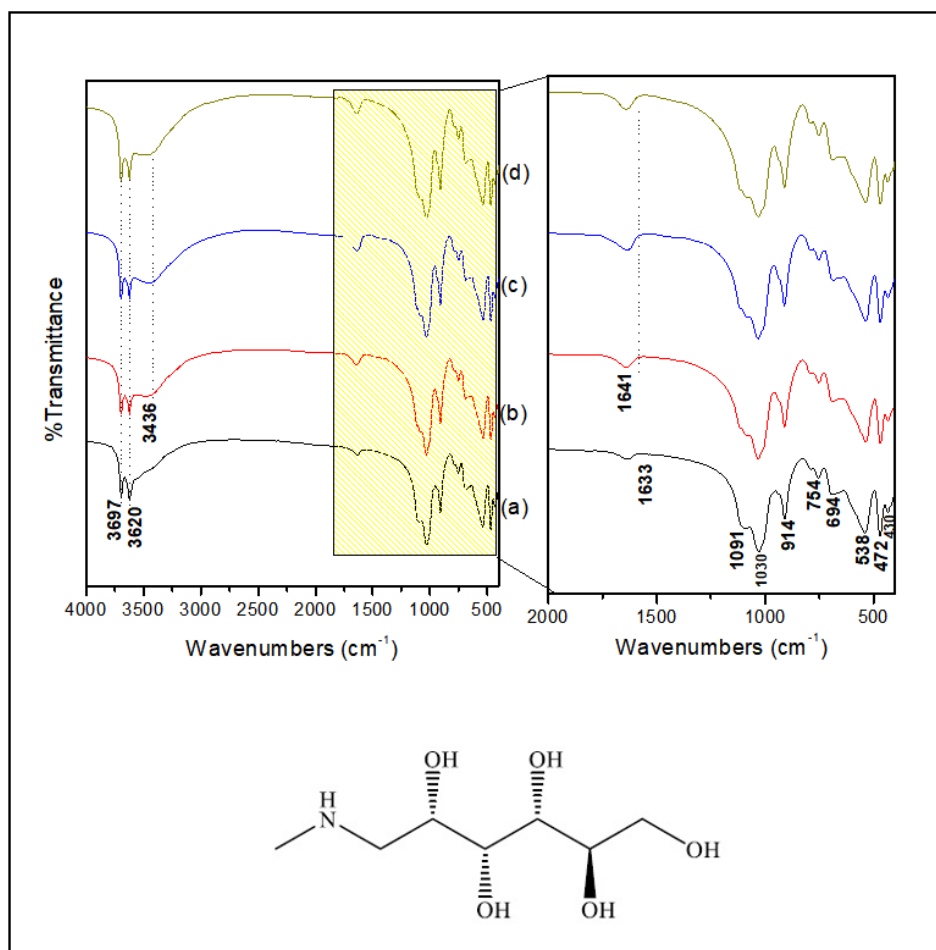


Figura 14: Espectros de FTIR da haloisita bruta (a) e dos compósitos HNT+Glu (b), HNT+Nb50%+Glu (c) e HNT+Nb75%+Glu (d) e representação química da molécula do Glucantime.

6.6 Determinação da IC₅₀ em células VERO

Para a HNT bruta, o IC₅₀ obtido foi de aproximadamente de 3.084 mg/mL, para o nióbio, identificamos um IC₅₀ no valor de 5.680 mg/mL, já as conjugações de HNT+Nb75% o IC₅₀ foi de 21.79 mg/mL e 104.0 mg/mL para a HNT+Nb50%.

Além disso, as células VERO foram tratadas com três concentrações de nanotubos de haloisita conjugados com Glucantime e Anfotericina B (100, 10 e 1 µg/mL). Todas as nanoformulações testadas foram biocompatíveis com células VERO com viabilidade média >88% (Figura 15).

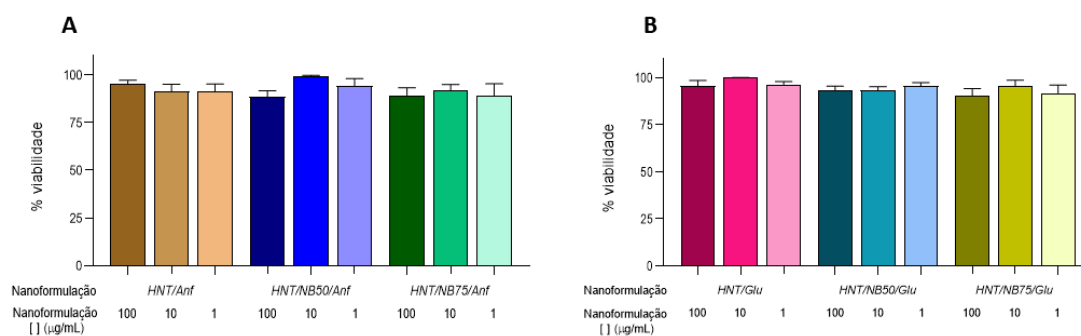


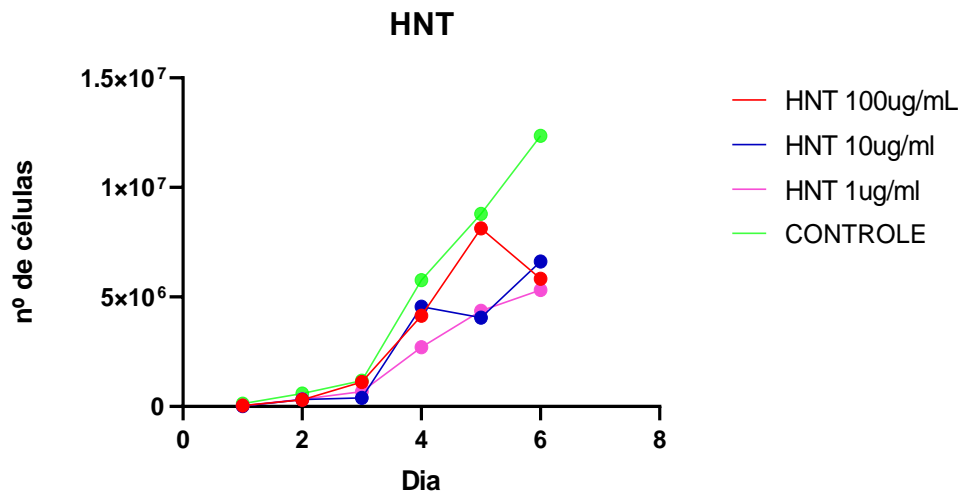
Figura 15. Viabilidade celular em células VERO submetidas ao contato com as nanofomulações. A) Nanofomulações a base de Anfotericina B. B) Nanofomulações a base de Glucantime.

6.7 Avaliação da taxa de crescimento em formas promastigotas de *L.major*

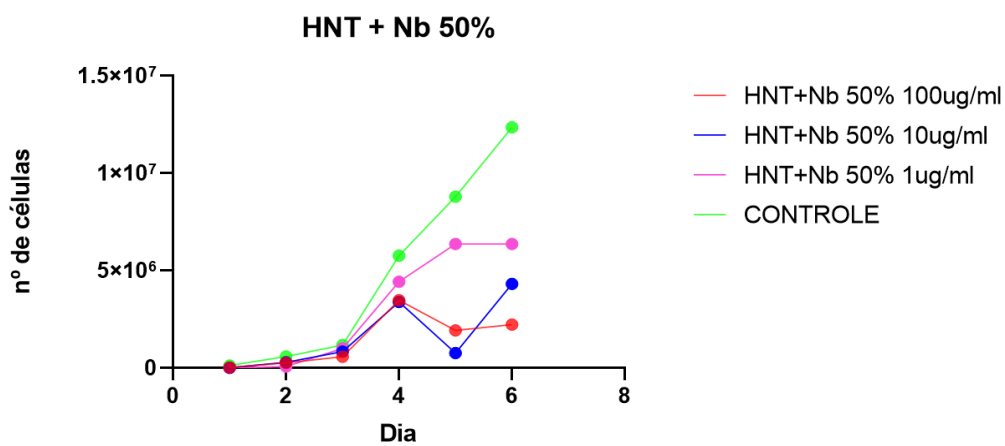
A haloisita bruta na concentração de 10µg/ml induziu a partir do quarto dia uma redução do crescimento celular da *L.major*, seguida por um novo pico de crescimento observado no quinto dia, diferentemente da concentração de 100 µg/mL que reduziu o crescimento do parasito a partir do quinto dia. Na concentração de 1 µg/mL não houve uma redução significativa da curva de crescimento, entretanto é possível observar um baixo crescimento celular comparado ao grupo controle (Figura 16.A). Com as nanoformulações de HNT+Nb50% foi possível observar que a partir do quarto dia houve inibição do crescimento celular nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, seguida por um pico de crescimento no quinto dia na concentração de 10 µg/mL, efeito semelhante com a haloisita bruta. Na concentração de 1 µg/mL não houve inibição significativa da curva de crescimento em relação as outras concentrações, entretanto, em relação ao grupo controle, observa-se um crescimento inferior e uma estabilização a partir do quinto (Figura 16.B). Para as amostras de HNT+Nb75% na concentração de 100 µg/mL observamos uma redução do crescimento parasitário iniciada no quinto dia, semelhante a

dose de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve uma estabilização do crescimento durante o quarto ao quinto dia seguida por um pico de crescimento (Figura 16.C).

A



B



C

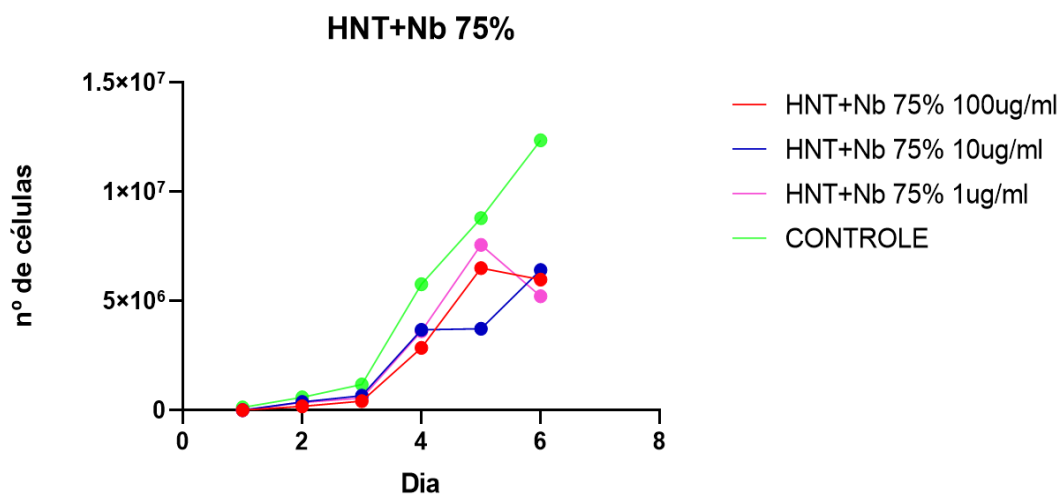


Figura 16. Crescimento celular de *L. major* submetidas aos compósitos em diferentes concentrações. A) Nanotubos de haloisita bruta. B) HNT+Nb50%. C) HNT+Nb75%. Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

6.8 Infecção de macrófagos THP-1 e tratamento com as nanoformulações

Após o tratamento dos dados, obtivemos o índice de infecção a média de *L.major* por macrófago e a porcentagem de macrófagos infectados, todos descritos na figura 17. Todas as nanoformulações nas suas diferentes concentrações apresentaram um valor menor que o grupo controle (THP-1 e *L.major*).

Como mostrado na figura 17. A, o índice de infecção de macrófagos infectados por *L.major*, e tratados com nanoformulações a base de HNT e Glucantime mostrou-se inferior em relação ao grupo controle em todas as nanoformulações utilizadas, sendo HNT+Nb50%+Glu a 10 µg/mL a que menos reduziu o índice de infecção. As nanoformulações a base de Anfotericina B (figura 17.B) apresentaram redução do índice de infecção dos macrófagos na concentração de 10 µg/mL em todos os grupos testados.

Ainda avaliando a média de parasito por macrófago, (Figura 17.C) o tratamento usando as nanoformulações a base de Glucantime evidenciou que a nanoformulação de HNT+Glu na concentração de 1 µg/mL foi significativa quando comparada com as demais desse grupo. Já a concentração de 10 µg/mL da solução de HNT+Nb50%+Glu mostrou uma maior redução na média de *L.major* por macrófago em detrimento das outras concentrações desse grupo e das nanoformulações de HNT+Nb75%+Glu e HNT+Glu nas três concentrações. Nas nanoformulações de HNT+Anf sem o nióbio, destacamos a concentração de 10 µg/mL a qual em comparação com as outras obteve uma menor média de parasito por macrófago, assim como foi observado com as nanoformulações de HNT+Nb75%+Anf na concentração de 10 µg/mL. Diferente das demais concentrações, a nanoformulação de HNT+Nb75%+Anf a 1 µg/mL foi a menos efetiva na redução da porcentagem de parasito no macrófago. HNT+Nb50%+Anf a 10 µg/mL foi mais efetiva em comparação com a concentração de 100 µg/mL, entretanto não houve diferença estatística nesse grupo (Figura 17.D).

Quanto a porcentagem de macrófagos infectados após o tratamento com as nanoformulações a base de Glucantime (Figura 17.E) observamos que houve redução da porcentagem em relação ao grupo controle (células infectadas sem tratamento), entretanto não houve diferença estatística entre os grupos, bem como observado nas nanoformulações a base de Anfotericina B (Figura 17.F).

As imagens de microscopia de fluorescência (Figura 18) ilustram os principais grupos que apresentaram atividade significativa na redução do índice de infecção dos macrófagos infectados.

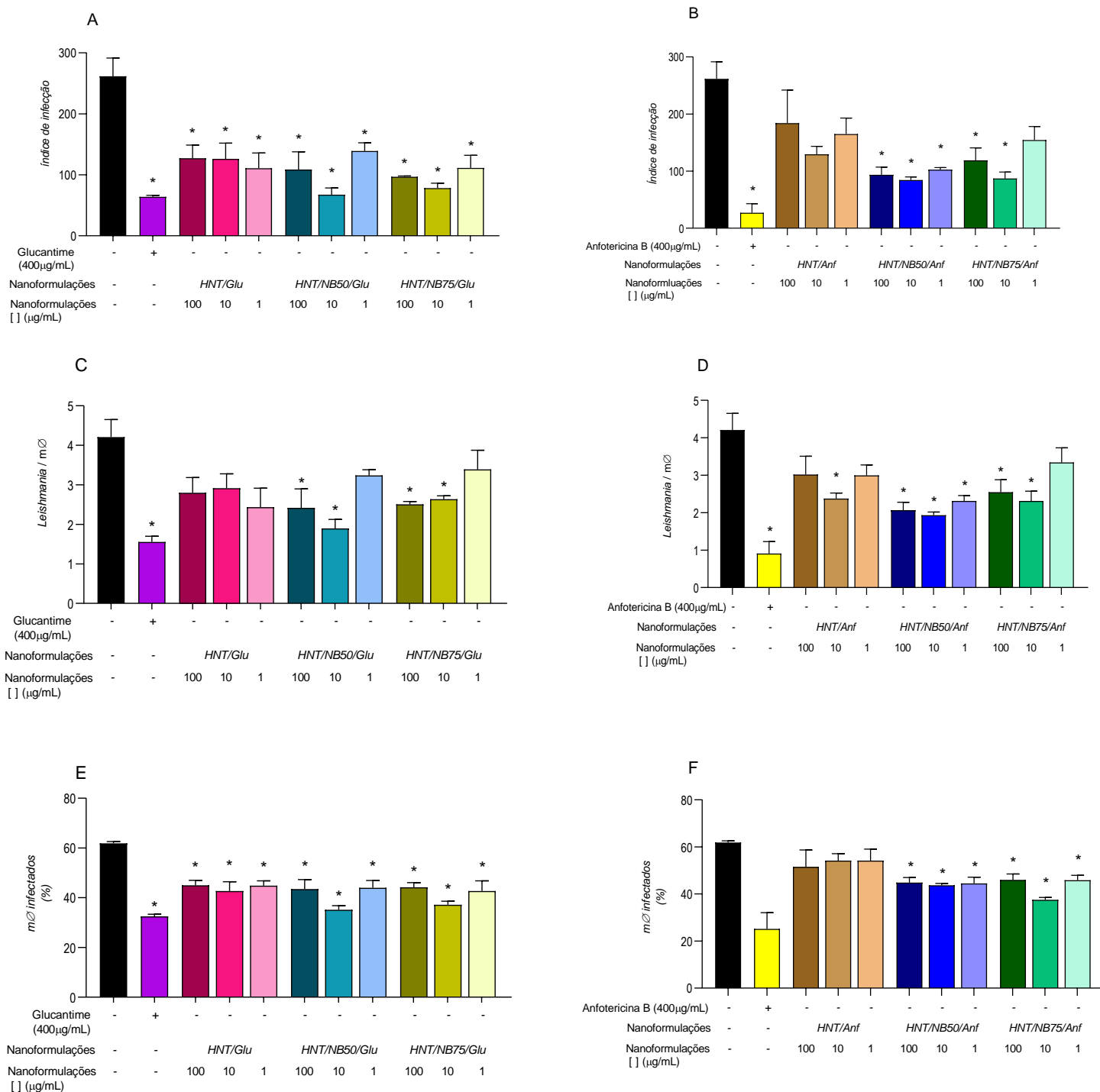


Figura 17. A-B) Índice de infecção de macrófagos infectados por *L. major*. C-D) Média de *L. major* por macrófago tratados. E-F) porcentagem de macrófagos infectados. Fonte, autor 2022.

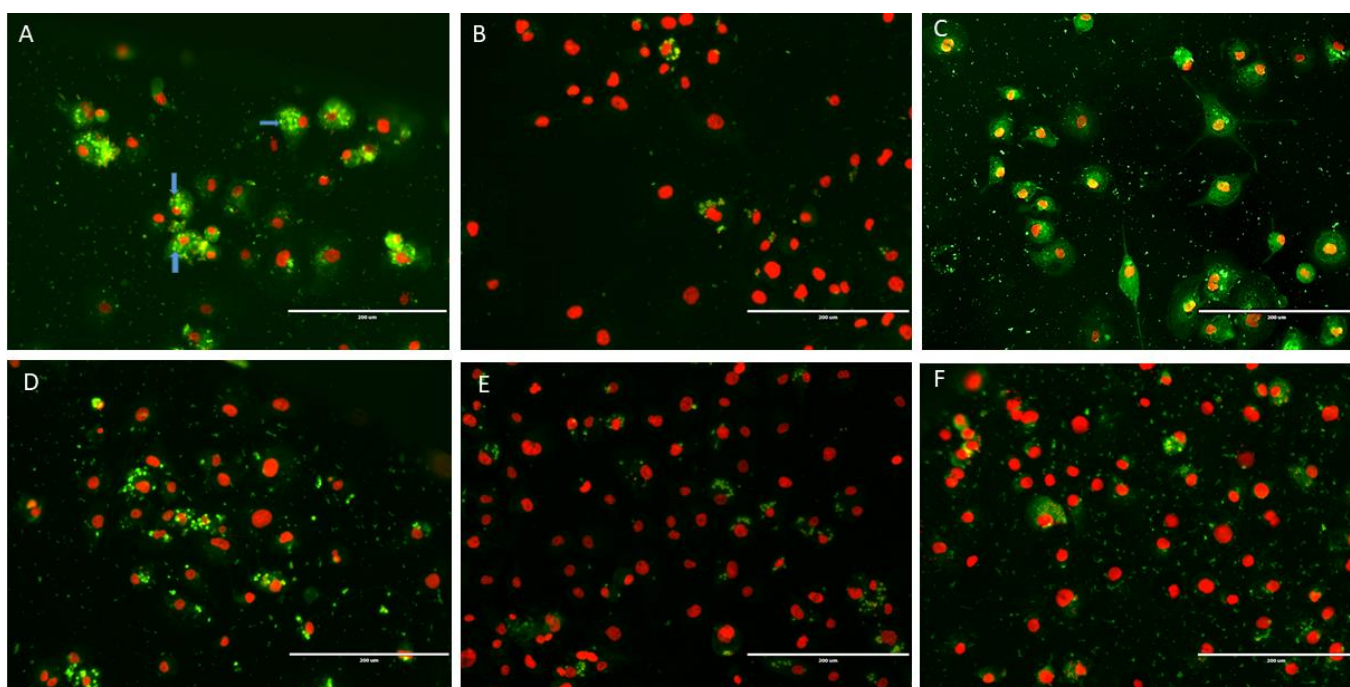


Figura 18. Microscopia de fluorescência do ensaio de infecção e tratamento com as nanoformulações. A) THP-1 infectados com *L.major* sem tratamento, setas em azul. B) células infectadas e tratadas apenas com Glucantime. C) células tratadas com HNT+Nb50%+Anf 10 µg/mL. D) células tratadas com HNT+Nb50%+Glu 100 µg/mL. E) células tratadas com HNT+Nb75%+Glu 100 µg/mL. F) células tratadas com HNT+Nb75%+Anf 100 µg/mL. Escala de 200 µm.

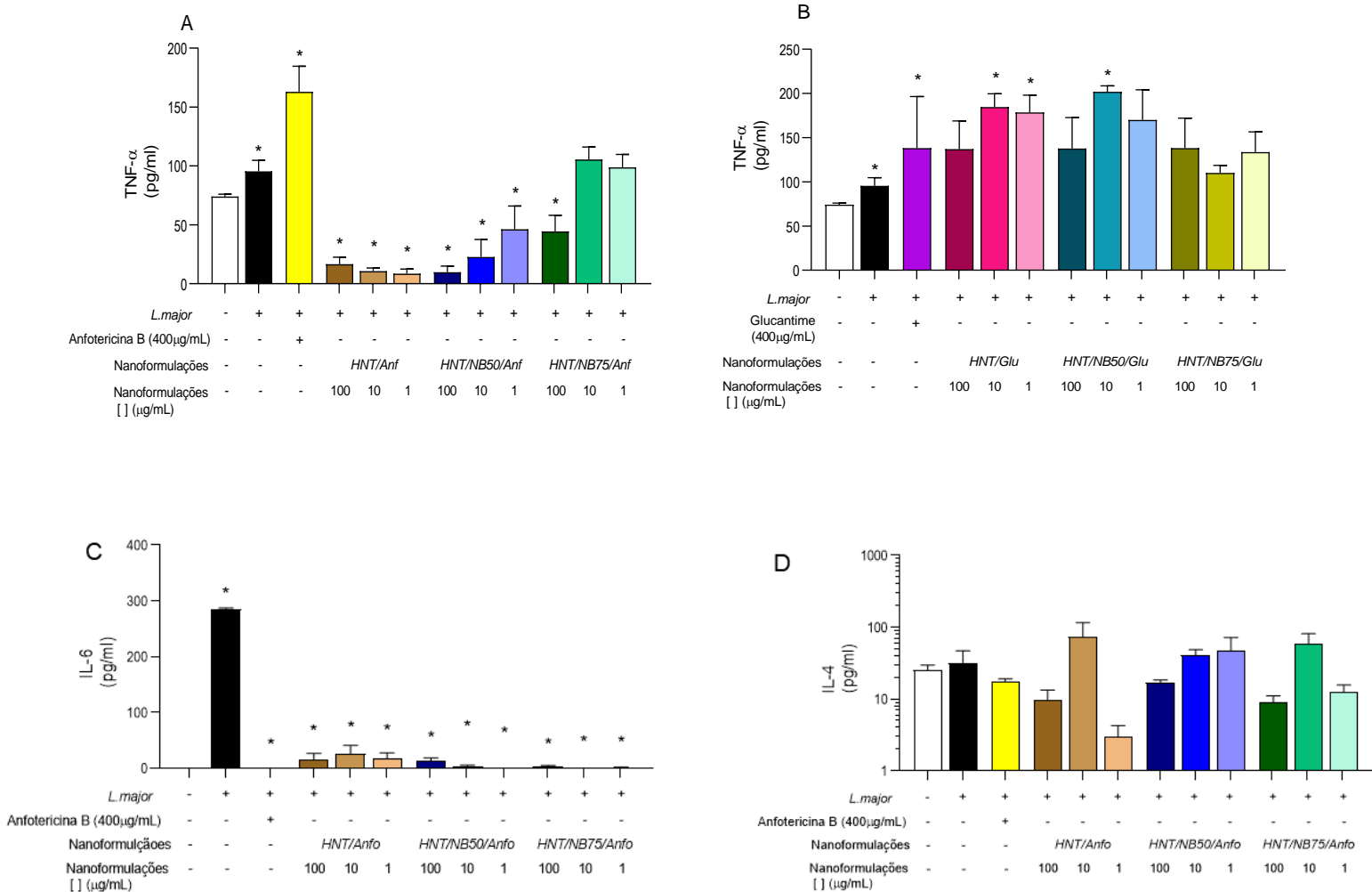
6.9 Secreção de citocinas em macrófagos infectados submetidos ao tratamento com as nanoformulações

As nanoformulações de HNT+Anf nas três concentrações tiveram o melhor desempenho na inibição da secreção de TNF- α . Essa inibição também foi observada com a concentração de 100 µg/mL da nanoformulação de HNT+Nb50%+Anf. Já para as nanoformulações de HNT+Nb75%+Anf a concentração de 100 µg/mL foi a mais efetiva na secreção da citocina em comparação as outras do mesmo grupo. (Figura 19.A). Diferente do que foi observado com as nanoformulações contendo Anfotericina B, as sintetizadas com Glucantime induziu uma produção mais acentuada de TNF- α em todas as concentrações utilizadas (Figura 19.B).

A produção de IL-6 foi significativamente inibida quando as células infectadas foram submetidas ao tratamento com as nanoformulações a base de Anfotericina B principalmente as nanoformulações contendo HNT+Nb75%+Anf (Figura 19.C). Em relação as nanoformulações a base de Glucantime, a inibição da produção de IL-6 foi mais efetiva com HNT+Glu e HNT+Nb50%+Glu na concentração de 100 e 10 µg/mL (Figura 19.G).

Observamos a inibição da secreção de IL-1 em relação ao grupo controle em todas as nanoformulações contendo Anfotericina B (Figura 19. E) diferentemente do que foi observado com a HNT+Nb75%+Glu a 100 µg/mL a qual foi a única a aumentar a produção de IL-1. As demais nanoformulações contendo Glucantime também reduziram a produção dessa citocina nas diferentes concentrações (Figura 19.H).

A produção da citocina anti-inflamatória IL-4 foi aumentada com as nanoformulações de HNT+Anf a 10 µg/mL, HNT+Nb50%+Anf a 10 e 1 µg/mL e HNT+Nb75%+Anf a 10 µg/mL (Figura 19. D). Esse resultado encontrado foi similar quando se utilizou as nanoformulações de HNT+Glu a 100 e 10 µg/mL, entretanto, HNT+Nb75%+Glu nas concentrações de 10 e 1 µg/mL diminuiu a síntese de IL-4 (Figura 19 F).



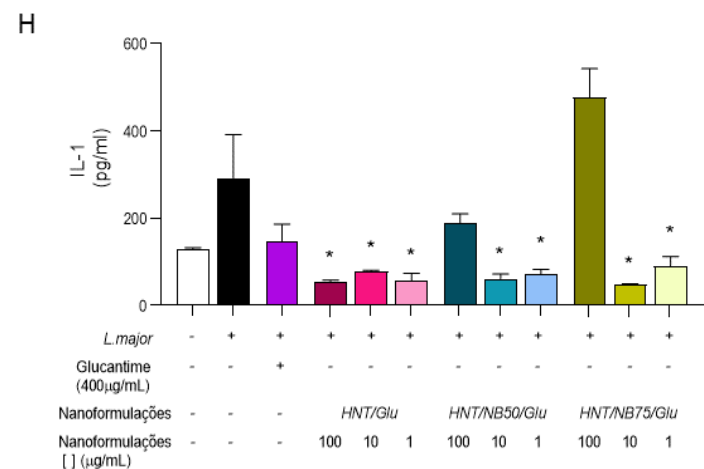
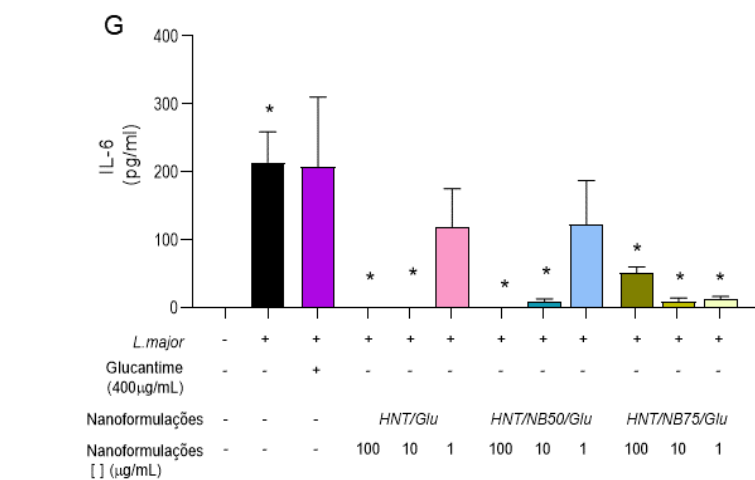
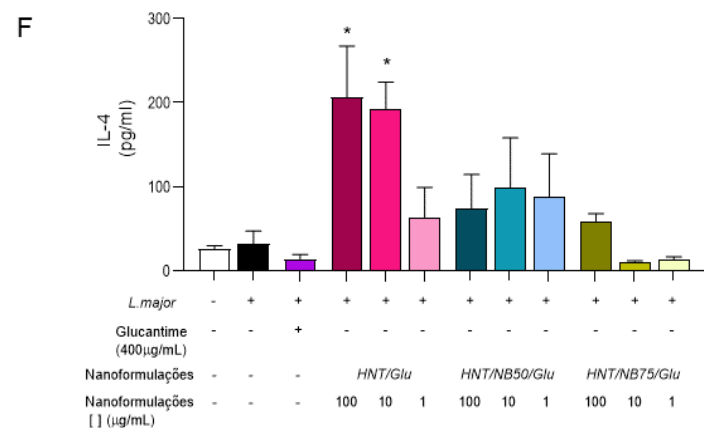
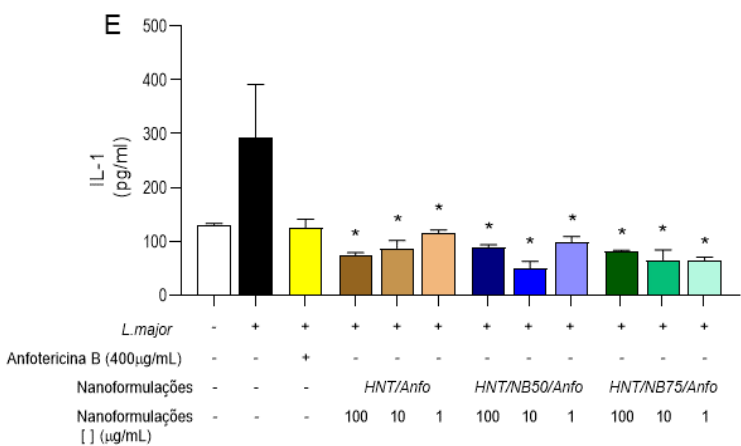


Figura 19. Produção de citocinas em macrófagos THP-1 infectados e tratados com as nanoformulações em diferentes concentrações.

7. DISCUSSÃO

7.1 Síntese e caracterização

Com as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) determinamos a forma tubular da haloisita bruta utilizada no trabalho a qual encontra-se na escala nanométrica. Pumchan e colaboradores 2021, ao modificar a superfície dos HNTs com aminosilano e quitosana utilizaram previamente o MEV para determinar a estrutura dos HNTs e observaram que ambas exibiram uma estrutura nanotubular oca característica dos HNTs (PUMCHAN, *et al.*, 2021). Outros autores também evidenciaram a estrutura tubular dos HNTs possuindo um diâmetro na faixa de 80-120 nm, e com um diâmetro interno cerca de 25nm (XING, *et al.*, 2012; ANDRINI, *et al.*, 2019).

Após a síntese e preparo da amostra, obteve-se um pó branco homogêneo correspondente à síntese com Glucantime, já com a Anfotericina B o pó apresentou coloração amarelada, típica da Anfotericina B, sugerindo que o fármaco foi adsorvido na solução. Esse efeito na coloração final também foi observado por Fakrullina e colaboradores (2019) na síntese da HNT com a curcumina, obtendo um produto final de aspecto semelhante a cor amarela da curcumina (FAKHRULLINA *et al.*, 2019).

A adsorção em haloisita e o carregamento de agentes funcionais dentro dos nanotubos podem ser alcançados por sua agitação em soluções de drogas, auxiliadas por sonicação e vácuo, já a eficiência do carregamento depende do procedimento utilizado, da carga e tamanho da molécula, podendo ser funcionalizada e adaptada para se ligar a determinadas moléculas específicas (STAVITSKAYA *et al.*, 2019).

Alguns fármacos usualmente utilizados como a amoxicilina, vancomicina, clavulanato de potássio, sulfato de gentamicina e tetraciclina foram carregados dentro da haloisita usando sonicação e vácuo (PATEL *et al.*, 2015). A haloisita carregada de drogas como a tetraciclina (TCH) e o sulfato de gentamicina foi aplicada para produzir compósitos antibacterianos utilizados na regeneração óssea, engenharia de tecidos, curativos, dentre outros. A incorporação de HNTs carregados com TCH dentro das nanofibras de PLGA foi capaz de melhorar a resistência à tração e manter a estrutura tridimensional das mantas nanofibrosas sintetizadas, além de liberar a TCH de maneira sustentada por 42 dias e exibir atividade antimicrobiana associada exclusivamente ao medicamento TCH encapsulado (PIERCHALA *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2013).

Não foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo o uso dos nanotubos de haloisita com as drogas (Anfotericina B e Glucantime) utilizadas nesta pesquisa. Entretanto, a polimixina B, um antibiótico que possui estrutura molecular e mecanismo de ação semelhante a Anfotericina B foi carregada em nanotubos de haloisita para síntese de um sistema de entrega de droga baseado em nanocompósito antibacteriano combinado com ciprofloxacina. A haloisita carregada com a droga diminuiu a taxa de liberação do sulfato de polimixina B que é altamente solúvel (SHI *et al.*, 2018).

Luo *et al* 2020 desenvolveram uma nanoplataforma utilizando nanotubos de haloisita associados ao ferro, o quimioterápico doxorrubicina (DOX) e um agente fototérmico para entrega direcionada e tratamento local de câncer de mama em ratos administrados via intravenosa. Os resultados foram extremamente satisfatórios, uma vez que conseguiram reduzir significativamente o tumor (LUO *et al.*, 2020).

Até o momento não foram encontrados trabalhos utilizando os nanotubos de haloisita carregando o Glucantime. Entretanto, nanofibras híbridas encapsuladas com o Glucantime estão sendo testadas para o tratamento tópico de feridas causadas pela leishmaniose e estas apresentaram atividade leishmanicida dose-dependente e sem efeitos tóxicos para as células fibroblásticas humanas. Esses resultados demonstram que a associação do Glucantime em sistemas de entrega de drogas é possível, podendo ser direcionado para o tratamento de feridas causadas pela leishmaniose (ALISHAHI *et al.*, 2020).

Quanto as caracterizações físico-químicas afim de determinar o sucesso da síntese das nanoformulações, o difratograma de raios-X do HNT bruto indicou a presença da forma parcialmente hidratada indicada pela ampla reflexão (001) em 2θ de $8,87^\circ$ e $11,50^\circ$ que estão associados a distâncias interplanares de 0,76 e 1,00 nm, respectivamente (YUAN, P., 2016). Todas as reflexões foram mantidas após a incorporação do Nb, sugerindo que a ordem de longo alcance foi preservada após a reação. O mesmo comportamento foi observado para a dopagem de rutênio modelada na superfície de HNTs (GHOSH *et al.*, 2017). No entanto, a reflexão do 001 foi menos ampla após a incorporação do Nb e sugere que o Nb pode interagir com grupos dispostos na superfície interna e externa dos nanotubos.

Não foram observadas outras alterações nas bandas associadas à estrutura inorgânica dos espectros de FTIR dos HTNs. No entanto, com base nos deslocamentos e aparecimento de novas bandas, as interações entre as drogas e os HNTs ocorreram na

superfície externa. Porém, a quantidade de Anfotericina B (pKa 5,7 e 10) e Antimoniato de Meglumina (pka = 9,52, nitrogênio carregado positivamente) nas superfícies dos HNTs pode ter sido fortemente influenciada principalmente pelo pH. Em pH 7, os grupos carboxila são parcialmente protonados e o grupo amino é parcialmente desprotonado na Anfotericina (ALISHAHI *et al.*, 2020., HE *et al.*, 2022) e o Antimoniato de Meglumina é completamente carregado positivamente (DEGOT *et al.*, 2021). Esse comportamento foi demonstrado no trabalho de Gagós e Arczewska (2012) que em pH igual ou próximo de 7, o qual foi utilizado neste estudo, a maioria dos grupos carboxilas são parcialmente protonados e o grupo amino é parcialmente desprotonado. Neste estudo a análise dos espectros de FTIR em diferentes pH revelou diferenças substanciais, dependendo do estado iônico, para diferentes orientações das moléculas de Anfotericina B. Comportamento semelhante acontece com a molécula do Antimoniato de Meglumina. Portanto, outros estudos utilizando diferentes pH devem ser investigados.

7.2 Atividade biológica

Inicialmente, realizamos o ensaio da IC₅₀, utilizando as células VERO. Este ensaio visa determinar qual a concentração da substância em questão é capaz de inibir 50% do crescimento celular afim de determinamos uma concentração segura para os demais experimentos, bem como avaliar a citotoxicidade. Os valores encontrados para a haloisita bruta foi de aproximadamente 3.084 mg/mL, para o oxalato amoniacal de nióbio usado na síntese dos compostos, foi de 5.680 mg/ml, enquanto para conjugações HNT+Nb75%, a IC₅₀ foi de 21,79 mg/mL e 104,0 mg/ml para HNT+Nb50%.

Toledano *et al* (2021) avaliou a viabilidade de macrófagos humanos e murinos em relação a nanotubos de haloisita funcionalizados (FHNTs), HNTs bruto e como controle, utilizou o talco nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/mL. Os autores observaram que houve uma diminuição mínima na viabilidade (menos de 5%) independentemente do tempo de exposição com concentrações na faixa de 0,01-10 µg/mL (TOLEDANO-MAGAÑA *et al.*, 2021). Vergaro *et al.*, 2010, observaram que a viabilidade celular utilizando células de carcinoma cervical humano (HeLa) e em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) diminuiu para 80% em relação ao controle após exposição a 500 µg/mL de haloisita. Já as nanopartículas de HNTs/Fe₃O₄ híbridas foram

biocompatíveis com células VERO porém, apresentou citotoxicidade específica em linhagens celulares A-549 (VERGARO *et al.*, 2010.; ABHINAYAA *et al.*, 2018).

A citotoxicidade dos HNTs foi determinada em outros modelos celulares cancerígenos. Em células endoteliais da veia umbilical (HUVECs) e células MCF-7 em um intervalo de tempo de 72h não houve apoptose até a dose de 200 µg/mL. Em linhagens de HeLa no intervalo de tempo de 24-72h nenhum efeito tóxico até 75 µg/mL foi observado. Em carcinoma hepatocelular (HepG2), e células de carcinoma colorretal (HCT116) em 24-72h observou-se efeito citostático em 500 µg/mL e efeito citotóxico em 1000 µg/mL. Já em linfócitos do sangue periférico humano ocorreu toxicidade citogenética em apenas 1000 µg/mL num intervalo de 24-72h, bloqueando a passagem do ciclo celular (PRINZ SETTER; SEGAL, 2020).

Um estudo investigativo da absorção e toxicidade de diferentes concentrações de nanotubos de haloisita usando células epiteliais de adenocarcinoma humano (A-549) através de ensaios de viabilidade mostrou que a haloisita teve um efeito dose-dependente nas células em concentrações de 5-900 µg por 10⁵ células no ensaio MTT. Observando uma toxicidade reduzida de HNTs em concentrações mais baixas (5-75 µg por 10⁵ células). As células A549 foram escolhidas como um modelo popular de células cancerosas amplamente estudadas em nanotoxicidade e pesquisa de entrega de drogas (KAMALIEVA, *et al.*, 2018).

Pesquisas avaliando a ação de nanotubos de haloisita contra a *leishmania* ainda são escassas, entretanto, alguns trabalhos utilizando outros organismos foram realizados podendo esclarecer os resultados encontrados neste trabalho, tendo em vista que este é o primeiro trabalho que utiliza nanotubos de haloisita e o potencial leishmanicida.

Os efeitos dos HNTs nas bactérias variam de bacteriostáticos a proliferativos. Os HNTs foram utilizados para estabilizar emulsões de petróleo bruto na água do mar e mostraram compatibilidade na concentração de 5–10 mg mL⁻¹ de HNTs com a bactéria degradadora de óleo *Alcanivorax borkumensis* (PANCHAL, *et al.*, 2018). A concentração inibitória mínima (CIM) de HNTs bruta para bactérias fitopatogênicas foi determinada em ~2,5 mg mL⁻¹. Por outro lado, concentrações mais baixas de HNTs (>0,6 mg mL⁻¹) inibiram até certo ponto a taxa de crescimento das bactérias, prejudicando a integridade da membrana celular, devido ao efeito dos grupos siloxano presente na superfície dos

HNTs na combinação com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ABHINAYAA, *et al.*, 2018).

HNTs são levemente tóxicos para *Escherichia coli* em uma faixa de concentração de 0,01 a 1,0 mg mL⁻¹, após 8 h de incubação na presença de 1,0 mg mL⁻¹ diminuindo sua viabilidade para 85%. Observou-se que a atividade metabólica, replicação de plasmídeos e expressão de proteínas foram ainda mais prejudicadas em concentrações mais baixas de HNTs sendo atribuído esse comportamento à geração ROS (CHOI; STAZAK; MONTEMAGNO, 2013).

Fakhrullina *et al.* 2019, determinaram pela primeira vez o efeito tóxico da haloisita sobre o nematódeo *caenorhabditis elegans* e observaram que os nanotubos de haloisita não induziram um efeito tóxico grave apesar da haloisita ter sido encontrada no intestino do nematoide (FAKHRULLINA *et al.*, 2019).

A imunotoxicidade *in vivo* dos HNTs em ratos foi avaliada pela administração de diferentes doses de haloisita por gavagem por dois meses. Após os meses, três citocinas (TNF- α , IL-1 e IFN- γ) foram medidas e observou-se que os efeitos de diferentes doses de HNTs sobre as citocinas TNF- α e IL-1 não foram significativamente diferentes das citocinas TNF- α e IL-1 do grupo controle, sugerindo que os HNTs quase não tiveram efeito significativo na resposta inflamatória (TOLEDANO-MAGAÑA *et al.*, 2021.; PAN *et al.*, 2017).

Macrófagos cultivados tratados com FHNTs (nanotubos funcionalizados com poliestireno) ou HNT bruto não apresentam um padrão de citocinas. Não induziram a liberação das citocinas inflamatórias IL-1 α e IL-6 em nenhum dos momentos avaliados, mantendo-se em níveis basais. A indução da citocina reguladora IL-10 e IL-4 ao longo do tempo sugere um possível papel anti-inflamatório. Assim, a secreção de IL-10 está relacionada à regulação de processos inflamatórios e biocompatibilidade, contribuindo para a inibição ou resolução da inflamação associada ao uso de nanoargilas. FHNTs e HNTs são maus indutores de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos humanos e de camundongos em culturas, o que, em associação com a indução de IL-10, sugere que as nanoargilas de haloisita são bem toleradas pelos macrófagos (TOLEDANO-MAGAÑA *et al.*, 2021; LAI *et al.*, 2013).

A literatura a respeito do uso do nióbio na medicina ainda é escassa, poucos trabalhos a respeito de sua atividade biológica estão disponíveis, sendo geralmente encontrados em

associação com outros materiais, como por exemplo, uma pesquisa que visou observar as características da liga porosa de titânio associada ao nióbio (Ti-25Nb) e sua biocompatibilidade *in vitro*, através do ensaio MTT, demonstraram que a liga não causou reação adversa às células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelho, com nível de toxicidade de 0 a 1. Ao medir os níveis de IL-6, a liga à base de nióbio não causou nenhuma resposta inflamatória importante, Além de que o material testado apresentou biocompatibilidade (XU *et al.*, 2013; FALANGA *et al.*, 2019).

Osteoblastos e fibroblastos humanos foram cultivados em diferentes espécimes de nióbio (Nb Amperit, Nb Ampertec) em folhas de Nb e Ti-42Nb, em três concentrações (0,1/0,2/0,5mg/ml) por quatro e sete dias e observaram-se resultados excelentes e semelhantes para ambos os tipos celulares em termos de viabilidade celular. Além disso, a produção de IL-8 e IL-6 aumentou ligeiramente para todos os pós utilizados, não demonstrando um efeito citotóxico importante (MARKHOFF *et al.*, 2017).

O oxalato amoniacal de nióbio foi utilizado na reação para síntese do complexo fotossensível de peroxoniobium, que quando sofre irradiação de luz é ativado e induz a formação de espécies radicais capaz de interagir com o DNA e reduzir o crescimento celular. Nessa pesquisa, o complexo inibiu o crescimento de células de leucemia mielóide crônica com valor de IC₅₀ de 30 mM, no escuro. No entanto, após a exposição à luz (365 nm), houve um aumento de cinco vezes na citotoxicidade celular (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2018).

8. CONCLUSÃO

As caracterizações físico-químicas do HNT bruto utilizado comprovam a forma tubular do HNT em questão. As análises do DRX das amostras de HNT e Nb indicaram a interação entre esses materiais. Já os resultados provenientes da análise do infravermelho mostraram que houve interação dos fármacos Anfotericina B e Glucantime com a haloisita na síntese realizada.

A haloisita bruta e as nanoformulações com os fármacos não apresentou efeito citotóxico direto nas células VERO. A concentração de 10 µg/mL de HNT, HNT+Nb50% e HNT+Nb75% reduziu o crescimento celular das formas promastigotas de *L. major* a partir do quinto dia na curva de crescimento. Já o tratamento com as nanoformulações das células infectadas mostrou-se efetivo na redução do índice de parasito por célula bem como a média de macrófago infectados, principalmente na concentração de 10 µg/mL da HNT+Anf e HNT+Nb75%+Anf em contrapartida, a concentração de 1 µg/mL foi a que apresentou menor eficácia.

As nanoformulações de HNT+Glucantime na concentração de 1µg/mL e HNT+Nb50%+Glu 10 µg/mL foram mais eficaz redução na média de *L.major* por macrófago em comparação com as demais concentrações. As nanoformulações a base de Anfotericina B mostrou-se induzir uma resposta anti-inflamatória nos macrófagos THP-1 infectados, em contrapartida, as nanoformulações a base de Glucantime não mostrou um padrão no perfil imunológico, apesar da expressão das citocinas pró-inflamatória TNF- α e IL-1.

Concluimos que as sínteses de HNT com nióbio e as drogas antileishmania mostraram-se viáveis e biocompatíveis e que a concentração de 10 µg/mL foi a mais efetiva nos testes realizados. De acordo com esses resultados, os nanotubos de haloisita conjugados com nióbio, mostrou ser uma alternativa no desenvolvimento de um sistema híbrido capaz de carrear drogas anti-leishmania, abrindo assim um leque de possibilidades para sínteses com outras classes de drogas, proporcionando, futuramente, possibilidades terapêuticas.

Outros estudos são necessários para determinar a proporção ideal entre esses materiais, além de definir mecanismos de interação, sinergismo, compatibilidade e sobre tudo como essas nanoformulações a base de haloisita e nióbio se comportaria em sistemas orgânicos.

9. REFERÊNCIAS

- ADRIAENSEN, Wim *et al.* Immunomodulatory therapy of visceral leishmaniasis in HIV coinfecting patients. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1943, 2018.
- AZIZI, M.H, et al. A history of leishmaniasis in Iran from 19th century onward. **Arch Ira Med**, v. 19, n.2, p. 153-162, 2016.
- ANDERSON, C. F. et al. CD4 + CD25 – Foxp3 – Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 285– 297, 19 fev. 2007.
- ANDRINI, L. et al. Halloysite nanotube and its firing products: Structural characterization of halloysite, meta-halloysite, spinel type silicoaluminate and mullite. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 234, p. 19–26, jul. 2019.
- ALISHAHI, M. et al. Glucantime-loaded electrospun core-shell nanofibers composed of poly(ethylene oxide)/gelatin-poly(vinyl alcohol)/chitosan as dressing for cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 288–297, nov. 2020.
- ABHINAYAA, R. et al. Cytotoxic consequences of Halloysite nanotube/iron oxide nanocomposite and iron oxide nanoparticles upon interaction with bacterial, non-cancerous and cancerous cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 395–403, set. 2018.
- BAÑULS, A.L, HIDE, M. PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol**; 64:1-109. 2007.
- BORGHI, SERGIO M. et al. Leishmania infection: painful or painless? **Parasitology research**, v. 116, n. 2, p. 465-475, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BARBOSA, R. M. et al. Development of Ag-ZnO/AgO Nanocomposites Effective for Leishmania braziliensis Treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2642, 29 nov. 2022.
- BRASIL. MME (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA). DESENVOLVIMENTO DE ESTUDOS PARA ELABORAÇÃO DO PLANO DUODECENAL (2010 - 2030) – **Relatório técnico 20. 2010. Disponível em:** http://antigo.mme.gov.br/documents/36108/448620/P11_RT20_Perfil_da_Mineralogia_do_Nixbio.pdf/b89b4cbf-daff-a26e-189c-9b016583a32a?version=1.0. Acessado em 17/05/2022.
- BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**. Brasília, 2ª edição, p. 180, 2007.

- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.
- BIDDECI, G. et al. Study of Uptake Mechanisms of Halloysite Nanotubes in Different Cell Lines. **International Journal of Nanomedicine**. v16 4755–4768. 2021.
- BRUZIQUESI, C. G. O, *et al.* Nióbio: um elemento químico estratégico para o Brasil. **Quím. Nova** 42 (10). 2019.
- COELHO A. C. V, *et al.* Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 1, 146-152, 2007.
- CARVALHO, S.H, *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**; 24(4): 380–391. 2019.
- CAVALLARO GIUSEPPE, STEFANA MILIOTO, AND GIUSEPPE LAZZARA Halloysite Nanotubes: Interfacial Properties and Applications in Cultural Heritage. **Langmuir** 36 (14), 3677-3689. 2020.
- COX, F.E.G. The golden age os parasitology – 1875-1925: The Scottish contributions. **Parasitology**, v. 144, n. 12, p. 1567-1581, 2017.
- CHARMOY M, *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **J Biomed Biotechnol.**;2010:719361. 2010.
- CHOI, H.-J.; STAZAK, T. J.; MONTEMAGNO, C. D. Surface-dependent cytotoxicity on bacteria as a model for environmental stress of halloysite nanotubes. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 10, p. 2008, out. 2013.
- CHANG, K.-P., REED, S. G., MCGWIRE, B. S., & SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, 85(3), 375–390. 2003.
- CHAGAS, E, *et al.* Leishmaniose Visceral Americana (nova entidade morbida do homem na América do Sul): relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n.3, p. 321-389, 1937.
- CBMM – COMPAINHA BRASILEIRA DE METALURGICA E MINERAÇÃO. Nióbio.2016. Disponível em: <https://cbmm.com/pt/Niobio>. Acessado em: 16/05/2022.
- DE OLIVEIRA, J.M. *et al.* Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 188-193, 2010.
- DEGRAZIA, F.W. *et al.* Evaluation of na antibacterial orthodontic adhesive incorporated with niobium-based bioglas: an in situ study. Original Research. **Dental Materials**. V. 33.e010. 2018.
- DEGOT, P. *et al.* Extraction of curcumin from *Curcuma longa* using meglumine and pyroglutamic acid, respectively, as solubilizer and hydrotrope. **Journal of Molecular Liquids**, v. 334, p. 116478, jul. 2021.

FALANGA, A. et al. Niobium-Treated Titanium Implants with Improved Cellular and Molecular Activities at the Tissue–Implant Interface. **Materials**, v. 12, n. 23, p. 3861, 22 nov. 2019.

FAKHRULLINA, G. et al. Selective Antimicrobial Effects of Curcumin@Halloysite Nanoformulation: A *Caenorhabditis elegans* Study. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 11, n. 26, p. 23050–23064, 3 jul. 2019.

FIGUEIREDO, B. Q. DE et al. Uso do grafeno e nióbio na prática médica: uma revisão narrativa de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e57911125526, 16 jan. 2022.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO A. C., Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clin Biomed Res**;35(2). 2015.

GUERRA, R. O. et al. Metallic Nanoparticles: A New Frontier in the Fight Against Leishmaniasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 26, p. 4547–4573, ago. 2022.

GOTO H, LAULETTA LINDOSO JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am**. 2012 Jun;26(2):293-307.

GAGOŚ, M.; ARCZEWSKA, M. FTIR spectroscopic study of molecular organization of the antibiotic amphotericin B in aqueous solution and in DPPC lipid monolayers containing the sterols cholesterol and ergosterol. *European Biophysics Journal*, v. 41, n. 8, p. 663-673, 2012.

GHOSH, Santanu et al. Amphotericin B-loaded mannose modified poly (d, l-lactide-co-glycolide) polymeric nanoparticles for the treatment of visceral leishmaniasis: in vitro and in vivo approaches. *RSC advances*, v. 7, n. 47, p. 29575-29590, 2017.

GRIMALDI, G., SCHOTTELIUS, J. Leishmaniasis – Their relationships to monoxenous and dixenous trypanosomatids. *Med Microbiol Immunol* 190, 3–8 (2001).

HE, X. et al. Improved Pharmaceutical Properties of Honokiol via Salification with Meglumine: an Exception to Oft-quoted Δ pKa Rule. *Pharmaceutical Research*, v. 39, n. 9, p. 2263-2276, 2022.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

JOO YONGHO, et al. Opening and blocking the inner-pores of halloysite. **Chem. Commun.** 4, 4519., 2013.

JOUSSEIN, E.; et al. Halloysite Clay Minerals — a Review. *Clay Miner.*, 40 (4), 383–426. 2005.

KHURANA, I. S., et al. Multifaceted role of clay minerals in pharmaceuticals. **Future science OA**, 1(3), FSO6, 2015.

- KERVIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New world and old world Leishmania infections: a practical review. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015.
- KAMHAWI S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**; 22(9):439-45. Epub 2006.
- KAUFER, A., ELLIS, J., STARK, D. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites Vectors** 10, 287. 2017.
- KAMALIEVA, R. F. et al. Uptake of halloysite clay nanotubes by human cells: Colourimetric viability tests and microscopy study. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 15, p. 54–60, jul. 2018
- KRAEVA N, Catalase in Leishmaniinae: With me or against me? **Infect Genet Evol.**;50:121-127. 2017.
- KATO H, et al. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **Int J Environ Res Public Health**. Mar;7(3):814-26. 2010.
- KAYE P, SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**. Jul 11;9(8):604-15.2011.
- KLOPROGGE, J. T. Characterisation of halloysite by spectroscopy. In **Nanosized tubular clay minerals**. 1st ed: Elsevier, 2016. cap 6, 115-136.
- KUMAR, A. Leishmania and Leishmaniasis. New York, NY: **Springer New York**, v. 3. 2013.
- LANIADO-LABORÍN, R. CABRALES-VARGAS, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol.**;26(4):223-7. 2009.
- LAI, X. et al. Proteomic profiling of halloysite clay nanotube exposure in intestinal cell co-culture: Intestinal cell proteomics after exposure to halloysite nanoclay. **Journal of Applied Toxicology**, p. n/a-n/a, abr. 2013.
- LIESE, J; SCHLEICHER, U; BOGDAN, C. The innate immune response against Leishmania parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3-4, p. 377-387, 2008.
- LI, K. et al. Enhanced antitumor efficacy of doxorubicin-encapsulated halloysite nanotubes. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 13, p. 19–30, dez. 2017.
- LEMKE, A., KIDERLEN, A.F. KAYSER, O. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol**. 68, 151-162. 2005.
- LUO, X. et al. Multifunctional HNT@Fe₃O₄@PPy@DOX Nanoplatfrom for Effective Chemo-Photothermal Combination Therapy of Breast Cancer with MR Imaging. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 6, p. 3361–3374, 8 jun. 2020.
- LEISHMAN, W.B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**. I, 1252-1254, 1903.

- MOUSA, M. et al. Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: A review of clay bioactivity. **Biomaterials** V.159. Pg 204-214. 2018.
- MARTINEZ ROBERTO. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras. Pneumol.**; 32(5): 449-60. 2006.
- MESA-ARANGO A. C, SCORZONI L, ZARAGOZA O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front Microbiol.**;3(286):1-10. 2012.
- MADEJOVÁ, J.; GATES, W. P.; PETIT, S. "Spectra of Clay Minerals.". *Developments in Clay Science*, v. 8, pp. 107–149, 2017.
- MARKHOFF, J. et al. Influence of different grained powders and pellets made of Niobium and Ti-42Nb on human cell viability. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 756–766, abr. 2017
- NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.
- NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. Immunology of Leishmaniasis. In: **Encyclopedia of Immunobiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, v. 4p. 114–124. 2016
- NEVES JUNIOR, Luiz Ferreira. Evaluation of photocatalytic activity of Nb2O5 nanoparticles for pesticide degradation. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento de leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**, 86(6):1092-101. 2011.
- OUYANG, J. et al. Selective Fabrication of Barium Carbonate Nanoparticles in the Lumen of Halloysite Nanotubes. **Minerals**, v. 8, n. 7, p. 296, 11 jul. 2018.
- OUYANG, J. ,MU, D. ,ZHANG, Y. ,et al. "Mineralogy and Physico-Chemical Data of Two Newly Discovered Halloysite in China and Their Contrasts with Some Typical Minerals". *Minerals*, v. 8, n. 3, pp. 108, 2018.
- PANDEY, L. M. "Applied Clay Science Enhanced adsorption capacity of designed bentonite and alginate beads for the effective removal of methylene blue". *Applied Clay Science*, v. 169, n. December 2018, pp. 102–111, 2019.
- PEREIRA-MAIA, E. C. et al. Peroxonioobium inhibits leukemia cell growth. **RSC Advances**, v. 8, n. 19, p. 10310–10313, 2018.
- PEREZ, A. P. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** S0927-7765(15)30351-9 2015.
- PIRES, E. G. et al. Silver-doped 58S Bioactive Glass as an AntiLeishmania Agent. **International Journal of Applied Glass Science**, v.9, p. 52–61, 2018.
- PUMCHAN, A. et al. An oral biologics carrier from modified halloysite nanotubes. **New Journal of Chemistry**, v. 45, n. 20, p. 9130–9136, 2021.

PARVEZ, S. et al. Modified solid lipid nanoparticles encapsulated with Amphotericin B and Paromomycin: an effective oral combination against experimental murine visceral leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12243, 22 jul. 2020.

PATEL, S. et al. Sustained Release of Antibacterial Agents from Doped Halloysite Nanotubes. **Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 1, 23 dez. 2015.

PIERCHALA, M. K. et al. Nanotubes in nanofibers: Antibacterial multilayered polylactic acid/halloysite/gentamicin membranes for bone regeneration application. **Applied Clay Science**, v. 160, p. 95–105, ago. 2018.

PAN, Q. et al. Halloysite clay nanotubes as effective nanocarriers for the adsorption and loading of vancomycin for sustained release. **RSC Advances**, v. 7, n. 34, p. 21352–21359, 2017.

PIMENTA, P. F. P, et al. A interação do protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. Capítulo 12. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. 2012.

PADRÓN-NIEVES M, et al. Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in *Leishmania major*. **Exp Parasitol**. Apr;121(4):331-7. 2009.

PRINZ SETTER, O.; SEGAL, E. Halloysite nanotubes – the nano-bio interface. **Nanoscale**, v. 12, n. 46, p. 23444–23460, 2020.

QI, R. et al. Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 148–155, out. 2013.

SATISH, SWATHI MAITHRI THARMAVARAM, AND DEEPAK RAWTANI. Halloysite nanotubes as a nature's boon for biomedical applications. **Nanobiomedicine** V. 6: 1–16. 2019.

SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 1–6. 2016.

STAVITSKAYA, A. et al. Antimicrobial Applications of Clay Nanotube-Based Composites. **Nanomaterials**, v. 9, n. 5, p. 708, 7 maio 2019.

STAVITSKAYA, A. et al. CdS Quantum Dots in Hierarchical Mesoporous Silica Templated on Clay Nanotubes: Implications for Photocatalytic Hydrogen Production. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 1, p. 605-614, 2021.

SHI, R. et al. Antimicrobial gelatin-based elastomer nanocomposite membrane loaded with ciprofloxacin and polymyxin B sulfate in halloysite nanotubes for wound dressing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 87, p. 128–138, jun. 2018.

SZCZEPANIK, B. et al. The effect of chemical modification on the physico-chemical characteristics of halloysite: FTIR, XRF, and XRD studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1084, p. 16–22, mar. 2015.

SILVA-CARVALHO, R. et al. Covalent Conjugation of Amphotericin B to Hyaluronic Acid: An Injectable Water-Soluble Conjugate with Reduced Toxicity and Anti-Leishmanial Potential. *Biomacromolecules*, v. 23, n. 3, p. 1169-1182, 2022.

SANTIAGO, A. S., PITA, S. S. D. R., & GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, 10(7). 2021.

STRAZZULLA, Alessio *et al.* Mucosal leishmaniasis: na underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

STEVERDING D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*.;10(1):82. 2017.

SEER. H. MORAES L.C. Nióbio. Disponível em: <http://recursomineralmg.codemge.com.br/substancias-minerais/niobio/>. Acessado em 16/05/2022.

TOLEDANO-MAGAÑA, Y. et al. Toxicological Evaluations in Macrophages and Mice Acutely and Chronically Exposed to Halloysite Clay Nanotubes Functionalized with Polystyrene. **ACS Omega**, v. 6, n. 44, p. 29882–29892, 9 nov. 2021.

THARMAVARAM, M.; PANDEY, G.; RAWTANI, D. Surface modified halloysite nanotubes: A flexible interface for biological, environmental and catalytic applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 261, p. 82–101, nov. 2018.

VARLAM, D. E. SIDDIQ, M.M. PARTON, L. A. RÜSSMANN, H. Apoptosis contributes to amphotericin B-induced nephrotoxicity. **Antimicrob Agents Chemother**.;45(3):679-85. 2001.

VASCONCELOS, J. M., et al. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**. 50, 221-7. 2018.

VERGARO, V. et al. Cytocompatibility and Uptake of Halloysite Clay Nanotubes. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 3, p. 820–826, 8 mar. 2010.

WORTMANN G, et al., Liposomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 83(5): 1028–1033. 2010.

WEI, P. et al. Combination therapy with amphotericin B and doxorubicin encapsulated in mannosylated nanomicelles for visceral leishmaniasis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 598, p. 124804, ago. 2020.

WYREPKOWSKI, C. D. C. et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. Vol.12(8). 2020.

XING, W. et al. Preparation high photocatalytic activity of CdS/halloysite nanotubes (HNTs) nanocomposites with hydrothermal method. **Applied Surface Science**, v. 259, p. 698–704, out. 2012.

XU, J. et al. Potential Use of Porous Titanium–Niobium Alloy in Orthopedic Implants: Preparation and Experimental Study of Its Biocompatibility In Vitro. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79289, 19 nov. 2013.

YUAN,P. TAN,D.;ANNABI-BERGAYA,F. Properties and applications of halloysite nanotubes: recent research advances and future prospects. **Applied Clay Science**. Vol.112– 113. 75–93.2015.

YUAN,P. THILL,A.;BERGAYA,F. Nanosized Tubular Clay Minerals. Halloysite and Imogolite. **Development in Clay Science**.. 754p. 2016.

YUAN, P. Thermal-Treatment-Induced Deformations and Modifications of Halloysite. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., v. 7. 2016.

ZHANG, J. et al. 2019. Rod in tube: A Novel Nanoplatfrom for Highly Effective ChemoPhotothermal Combination Therapy toward Breast Cancer. **ACS Appl. Mater. Interfaces** , 11, 3690–3703 2019.