

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES DE USO TÓPICO**  
**CONTENDO ANFOTERICINA B E CLORITO DE SÓDIO PARA LEISHMANIOSE**  
**TEGUMENTAR**

**CARLA PIRES MAGALHÃES**

**Salvador - Bahia**

**2019**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina**  
**Investigativa**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES DE USO TÓPICO**  
**CONTENDO ANFOTERICINA B E CLORITO DE SÓDIO PARA LEISHMANIOSE**  
**TEGUMENTAR**

**CARLA PIRES MAGALHÃES**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Fabio Rocha Formiga

**Salvador – Bahia**

**2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M118d Magalhães, Carla Pires.  
Desenvolvimento de nanoformulações de uso tópico contendo Anfotericina B e Clorito de sódio para Leishmaniose Tegumentar. / Carla Pires Magalhães. - 2018.  
102 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rocha Formiga, Laboratório de Enfermidades Infecciosas Transmitidas por Vetores.  
Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Anfotericina B. 3. Cloreto de Sódio.  
4. Nanotecnologia. I. Título.

CDU 616.928.5

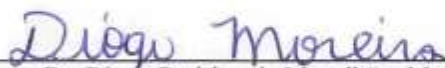
"DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÕES DE USO TÓPICO CONTENDO ANFOTERICINA B  
E CLORITO DE SÓDIO PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR."

CARLA PIRES MAGALHÃES

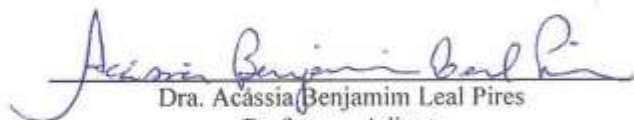
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de fevereiro de 2019.

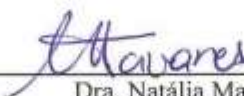
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Acássia Benjamim Leal Pires  
Professora Adjunta  
UNEB



Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que ao longo da minha vida me concedeu força, sabedoria e determinação para alcançar meus objetivos, fé e resiliência para lidar com as dificuldades;

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos, que sempre me forneceram apoio, estímulo, confiança e amor nos momentos de dificuldade e nunca me deixaram desistir, a eles toda gratidão;

A minhas irmãs, Renata e Érica, pela companhia diária e momentos de alegria compartilhados, pelas quais dedico também todas as minhas conquistas;

À minha família e todos meus amigos que sempre acreditaram em mim e foram presenças fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e sentimental;

Ao meu namorado, Marcelo, que me deu toda atenção, suporte e carinho necessários no final desta etapa, não me deixando abater diante as dificuldades e me incentivando a dar o meu melhor em qualquer circunstância;

Ao Dr. Fabio Rocha Formiga, que me concedeu a oportunidade de ingressar numa instituição de pesquisa renomada, a Fiocruz, desde a iniciação científica ao mestrado, obrigada pela confiança e orientação;

À Fiocruz e ao Instituto Gonçalo Moniz (IGM), pelo apoio financeiro que me permitiu desenvolvimento profissional e intelectual ao participar dos seus programas e eventos científicos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (PgBSMI) e professores pelo suporte das disciplinas e cursos extracurriculares;

À Coordenação de Ensino do IGM, em especial à Noélia e Simone, por toda atenção e paciência com as minhas dúvidas e solicitações;

Ao GT-Nano, pelo companheirismo, em especial a: Vinícius Pires, que esteve comigo desde a iniciação científica, um exemplo pra mim de dedicação, inteligência e paciência; Helenita Quadros, por todo suporte técnico, intelectual e emocional, sempre disposta a me ajudar; Pedro Borba, por todos os momentos de descontração, agradeço imensamente ao super apoio nesta etapa final com os ensaios de liberação, por compartilharmos juntos todas as dificuldades;

Ao LEITV, por todo suporte ao longo destes 3 anos, ao espaço concedido, sou grata a todos aqueles que me ajudaram, em especial à Francys Rangel e ao Dr. Rohit Sharma, que estiveram sempre dispostos a pensar comigo como enfrentar os desafios com a *Leishmania*, principalmente;

À equipe do LETI, por também me conceder, sempre que precisava, o seu espaço, materiais e equipamentos, em especial aos Drs. Cássio Santana, Diogo Magalhães e Ivan Pimenta por toda paciência, conselhos e momentos de confraternização;

À equipe do Serviço de Microscopia Eletrônica do IGM: Drs. Adriana, Cláudio e Lúcia, Arlene e Márcio pelo apoio técnico que me fez obter excelentes imagens de microscopia, por serem dedicados em ajudar quem precisa de seus conhecimentos e por trazer leveza ao nosso trabalho;

Ao Dr. Antônio Petersen e à Jéssica Rebouças que me acolheram no início deste trabalho, que me ensinaram as técnicas de manejo nos ensaios com *Leishmania* e células, bem como analisar os resultados;

Ao Dr. Cleber Schmidt, que me orientou no TCC e agora me concedeu espaço e disponibilidade com os ensaios de citotoxicidade sobre bactérias;

À Dra. Juliana Perrone por disponibilizar parte de seu tempo em me ajudar na análise das imagens de microscopia eletrônica;

À Maraine Tadini e Franciane Oliveira da Apis flora pelo suporte com as nanopartículas.

MAGALHAES, Carla Pires. Desenvolvimento de nanoformulações de uso tópico contendo Anfotericina B e Clorito de sódio para Leishmaniose tegumentar. 2018. 101 f. il. Mestrado (Dissertação em Biotecnologia Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO.** A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas provocada pelo parasito do gênero *Leishmania*. As opções de tratamento apresentam limitações, sobretudo toxicidade e resistência aos fármacos, comprometendo a segurança e a eficácia da terapêutica. A busca por um tratamento tópico é recomendado pela OMS. Anfotericina B (Anf-B) é um antibiótico poliênico, já utilizado na terapêutica da LTA na forma de preparações lipídicas intravenosas, incluindo lipossomas. O clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) tem sido investigado pelo seu potencial oxidativo e ação cicatrizante em lesões causadas por *L. tropica*. **OBJETIVO.** O presente trabalho busca investigar o potencial da associação Anf-B/ $\text{NaClO}_2$  como base para um novo tratamento da LTA a partir de nanoformulações de uso tópico contendo esses agentes. **MATERIAL E MÉTODOS.** Foram realizados ensaios de citotoxicidade do  $\text{NaClO}_2$  e da Anf-B frente a formas promastigotas axênicas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) para determinação do  $\text{IC}_{50}$  destes compostos. Para avaliar o efeito combinado,  $\text{NaClO}_2$  e Anf-B foram testados de acordo com o método de proporções fixas modificado (1:1; 1:5; 5:1). Por outro lado, a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e queratinócitos humanos (HaCaT) foi avaliada na presença de cada tratamento individual e a  $\text{CC}_{50}$  foi calculada. Estes ensaios foram realizados utilizando o método colorimétrico de Alamar blue®. Avaliou-se a atividade de  $\text{NaClO}_2$  isolado e em combinação com Anf-B sobre macrófagos infectados com *L. braziliensis*. A atividade do  $\text{NaClO}_2$  foi avaliada sobre formas amastigotas axênicas de *L. braziliensis*, utilizando o método colorimétrico de Alamar blue®. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) das formas promastigotas e amastigotas axênicas tratadas com  $14 \mu\text{M}$  de  $\text{NaClO}_2$  foram obtidas. Por outro lado, formulações semi-sólidas contendo Anf-B em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas. Ensaios de liberação da Anf-B a partir destas formulações foram conduzidos em células de Franz por um período de 12 horas (0, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 12 h). Por fim, estudos de estabilidade das formulações foram realizados em um período de 14 dias. **RESULTADOS.** Os resultados demonstram que  $\text{NaClO}_2$  e Anf-B apresentaram  $\text{IC}_{50}$  médio de  $9,66 \mu\text{M}$  e  $0,11 \mu\text{M}$ , respectivamente, sobre a forma promastigota após 72 h de cultivo. Imagens de MEV e MET indicando dano celular às formas promastigotas sugerem um mecanismo de ação relacionado ao estresse oxidativo causado pelo  $\text{NaClO}_2$  nestes parasitos. A associação dos dois compostos resultou em efeito aditivo com índice de combinação médio de  $0,98 \pm 0,09$ . Com relação aos ensaios de viabilidade celular,  $\text{NaClO}_2$  e Anf-B apresentaram valores de  $\text{CC}_{50}$  de  $856,3 \mu\text{M}$  e  $>50 \mu\text{M}$ , respectivamente. O índice de seletividade do  $\text{NaClO}_2$  foi estimado em 88,6 e da Anf-B  $>454,5$ . O  $\text{NaClO}_2$  não apresentou atividade sobre a viabilidade de amastigotas intracelulares e extracelulares, o que foi corroborado por imagens de MEV e MET. Os ensaios de liberação demonstraram que Anf-B foi liberada de forma mais lenta e gradual a partir de um sistema nanoestruturado disperso na base semi-sólida. Todas as formulações mantiveram-se estáveis ao longo de 14 dias. **CONCLUSÃO.** Pela primeira vez, este trabalho demonstrou a atividade do  $\text{NaClO}_2$  em uma espécie de *Leishmania* do Novo Mundo. Adicionalmente, apresentou o potencial farmacotécnico de nanoformulações contendo Anf-B para a terapêutica da LTA. **Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea, Anfotericina B, Clorito de Sódio, Formulação tópica, Nanotecnologia.



MAGALHAES, Carla Pires. Desenvolvimento de nanoformulações de uso tópico contendo Anfotericina B e Clorito de sódio para leishmaniose tegumentar. 2018. 101 f. il. Mestrado (Dissertação em Biotecnologia Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –Institutos Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Salvador, 2018. Topical treatment of localized cutaneous leishmaniasis.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a polymorphic disease of the skin and mucosa caused by the parasite of the genus *Leishmania*. Treatment options have limitations, especially toxicity and drug resistance, compromising the safety and efficacy of the therapy. The search for a topical treatment is recommended by the WHO. Amphotericin B (Anf-B) is a polyene antibiotic, already used in the treatment of ACL in the form of intravenous lipid preparations, including liposomes. Sodium chlorite ( $\text{NaClO}_2$ ) has been investigated for its oxidative potential and healing action on lesions caused by *L. tropica*. **OBJECTIVE.** The present work investigates the potential of the Anf-B /  $\text{NaClO}_2$  association as a basis for a new treatment of LTA from topical nanoformulations containing these agents. **MATERIAL AND METHODS.** The  $\text{NaClO}_2$  and Anf-B cytotoxicity assays were performed against axenic promastigotes of *L. braziliensis* (MHOM / BR / 01 / BA788) for  $\text{IC}_{50}$  determination of these compounds. To evaluate the combined effect,  $\text{NaClO}_2$  and Anf-B were tested according to the modified fixed ratio method (1: 1, 1: 5, 5: 1). In addition, the cell viability of peritoneal macrophages of BALB / c mice and human keratinocytes (HaCaT) was evaluated in the presence of each individual treatment and  $\text{CC}_{50}$  was calculated. These tests were performed using Alamar blue® colorimetric method.  $\text{NaClO}_2$  activity was evaluated alone and in combination with Anf-B on *L.braziliensis*-infected macrophages. The activity of  $\text{NaClO}_2$  was evaluated on the viability of axenic amastigotes of *L.braziliensis*, using the colorimetric method of Alamar blue®. SEM and TEM images were obtained from promastigotes and axenic amastigotes treated with 14  $\mu\text{M}$   $\text{NaClO}_2$ . Semisolid formulations were developed containing Anf-B in solid lipid nanoparticles (NLS) and free. *In vitro* release study of the drug in Franz cells was performed for a period of 12 hours (0, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h and 12h). Stability studies of these formulations were performed over a period of 14 days. **RESULTS.** The results demonstrate that  $\text{NaClO}_2$  and Anf-B presented a mean  $\text{IC}_{50}$  of 9.66  $\mu\text{M}$  and 0.11  $\mu\text{M}$ , respectively, on the promastigote forms after 72 h of culture. SEM and TEM images suggest an activity on the increase of oxidative stress of  $\text{NaClO}_2$  on promastigotes. The combination of the two compounds resulted in an additive effect with an average combination index of  $0.98 \pm 0.09$ . Regarding cell viability assays,  $\text{NaClO}_2$  and Anf-B presented  $\text{CC}_{50}$  values of 856.3  $\mu\text{M}$  and  $> 50 \mu\text{M}$ , respectively. The selectivity index of  $\text{NaClO}_2$  was estimated at 88.6 and Anf-B  $> 454.5$ .  $\text{NaClO}_2$  showed no activity on the viability of intracellular and extracellular amastigotes, which was reinforced by SEM and TEM images. *In vitro* release studies on Franz cells demonstrated that Anf-B was released more slowly and gradually when in a nanostructured system and all formulations remained stable over 14 days. **CONCLUSIONS.** For the first time, this work demonstrated the activity of  $\text{NaClO}_2$  in New World *Leishmania*. Additionally, it presented the pharmacotechnical potential of nanoformulations containing Anf-B for the treatment of ACL. **Keywords:** Cutaneous leishmaniasis; Amphotericin B; Sodium chlorite; Topical formulation; Nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Lesões decorrentes da leishmaniose cutânea localizada. A: Lesão cutânea localizada em estágio inicial (ausência de ulceração); B: Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; C: Lesão cutânea múltipla, ulceradas. Adaptado de Brasil (2007). 24
- Figura 2.** Lesões decorrentes da leishmaniose cutânea difusa. A: Polimorfismo lesional (tempo de doença 3 anos); B: Lesões infiltradas com exulcerações em bordas (tempo de doença 12 anos); C: Lesão infiltrada com áreas descamativas na orelha (tempo de doença 12 anos). Adaptado de Brasil (2007). 25
- Figura 3.** Lesões decorrentes da leishmaniose cutânea disseminada. A: paciente apresentando múltiplas lesões papulares, algumas com ulceração superficial; B: Paciente com acometimento mucoso, envolvendo nariz e mucosa oral; C: Paciente com lesões em placa infiltrada extensa com crostas no local e nódulo infiltrativo. Adaptado de Brasil (2007) 25
- Figura 4.** Lesões decorrentes da leishmaniose mucocutânea ou mucosa. A: Edema nasal com infiltração em asa e base do nariz; B: Lesões ulceradas em palato, infiltração do lábil e lesão ulcerada em asa do nariz esquerdo; C: Lesões ulceradas francas, com bordas elevadas, infiltradas fundo granuloso, localizadas no pênis e bolsa escrotal. Adaptado de Brasil (2007). 26
- Figura 5.** Formas evolutivas dos parasitos de *Leishmania*. A: Forma flagelada, extracelular ou promastigotas B: Forma aflagela, intracelular ou amastigota. Fonte: Nascimento (2011). 27
- Figura 6.** Ciclo biológico de *Leishmania* no inseto vetor e processo de fagocitose por células de defesa no hospedeiro humano. Fonte Nascimento (2011). 29
- Figura 7.** Equipamento contendo células do tipo Franz. I: compartimento doador; II: compartimento receptor; III: compartimento utilizado para adicionar e retirar o meio do compartimento receptor. 56
- Figura 8.** Efeito da solução de NaClO<sub>2</sub> sobre formas promastigota de *Leishmania braziliensis* cultivadas durante 72 h nas concentrações de 0,49 µM até 1000 µM. O resultado médio do IC<sub>50</sub> (9,66 µM) foi obtido de 3 experimentos independentes. 57
- Figura 9.** Efeito do Fungizone sobre formas promastigota de *Leishmania braziliensis* cultivadas durante 72 h nas concentrações de 0,005µM a 10µM. O resultado médio do IC<sub>50</sub> (0,11 µM) foi obtido de 3 experimentos independentes. 57
- Figura 10.** NaClO<sub>2</sub> e Anf-B são citocompatíveis com Macrófagos murinos. Macrófagos peritoneais foram tratados com NaClO<sub>2</sub> e Fungizone por 72h. A viabilidade celular foi observada pelo percentual de redução de Alamar Blue. Barras representam ± SEM de dois experimentos independentes. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\*\*p < 0.001 \*p < 0.05). 59
- Figura 11.** CC<sub>50</sub> de NaClO<sub>2</sub> sobre macrófagos murinos. Resultado da citotoxicidade do clorito de sódio sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c cultivados durante 72 h nas concentrações de 2,44 µM a 5.000 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata e representam a média de 2 experimentos independentes. 60
- Figura 12.** NaClO<sub>2</sub> e Anf-B são citocompatíveis com queratinócitos humanos. HaCaT foram tratados com NaClO<sub>2</sub> por 72h. A viabilidade celular foi observada pelo percentual de redução de Alamar Blue. Barras representam ± SEM de dois experimentos independentes. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle (\*\*\*p < 0.0001). 61
- Figura 13.** CC<sub>50</sub> de NaClO<sub>2</sub> sobre queratinócitos humanos. Resultado da citotoxicidade do NaClO<sub>2</sub> sobre linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados durante 72 h nas concentrações de 2,44 µM a 5.000 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata e representam a média de 2 experimentos. 61
- Figura 14.** Microscopia eletrônica de varredura de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* em cultura axênica tratada com clorito de sódio. Os promastigotas foram tratados com NaClO<sub>2</sub> (14 µM) durante 24, 48 e 72 horas. (A) Promastigotas sem tratamento, controle 24 h. (B) Promastigotas tratadas por 24 h, observar descontinuidade da superfície celular. (C) Promastigotas tratadas por 24 h, observar encolhimento de superfície celular. (D) Promastigotas sem tratamento, controle 48 h. (E) Promastigotas tratadas por 48 h, notar alteração na forma e multiplicidade do flagelo. (F) Promastigotas tratadas por 48 h, notar achatamento e multiplicidade do flagelo. (G) Promastigotas sem tratamento, controle 72 h. (H) Promastigotas tratadas por 72 h, observar alteração no formato do corpo celular e multiplicidade dos flagelos. (I) Promastigotas tratadas por 72 h, observar alteração e multiplicidade do flagelo. 63

- Figura 15.** Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* em cultura axênica tratada com NaClO<sub>2</sub> (14μM) durante 24, 48 e 72 horas. (A) Promastigotas sem tratamento, controle 24 h. (B) Promastigotas tratadas por 24 h, observar perda da densidade eletrônica do citoplasma (seta branca), inchaço mitocondrial e desorganização das cristas mitocondriais (seta preta). (C) Promastigotas tratadas por 24 h, observar vacuolização difusa (\*). (D) Promastigotas sem tratamento, controle 48 h. (E) Promastigotas tratadas por 48 h, notar vacuolização difusa (\*). (F) Promastigotas tratadas por 48 h, notar comprimento aumentado da mitocôndria (seta preta) e vacuolização (\*). (G) Promastigotas sem tratamento, controle 72 h. (H) Promastigotas tratadas por 72 h, observar perda da densidade eletrônica do citoplasma (seta branca), vacuolização (\*) e inchaço da mitocôndria, perda da densidade eletrônica e cristas com formato circular (seta preta). (I) Promastigotas tratadas por 72 h, observar vacuolização (\*), comprimento aumentado da mitocôndria (seta preta), perda da densidade eletrônica do citoplasma (seta branca) e formato circular do parasito. 65
- Figura 16.** Efeito de Anf-B sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Fungizone (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle (\*\*\* p < 0,0001, \*\*p < 0.01). 66
- Figura 17.** Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com NaClO<sub>2</sub> (3,5; 7,0; 14; 28 e 42 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle. 67
- Figura 18.** Efeito de Anf-B sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Fungizone (0,001; 0,01; 0,1; e 0,2 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle (\*\*\* p < 0.0001, \* p = 0.0363). 67
- Figura 19.** Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com NaClO<sub>2</sub> (50; 100; 300 e 600 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle. 68
- Figura 20.** Efeito de Anf-B sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Fungizone (0,01 e 0,05 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle (\*\* p < 0.01). 68
- Figura 21.** Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com NaClO<sub>2</sub> (400 e 600 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle. 69
- Figura 22.** Efeito da combinação entre Anf-B e NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Anf-B/NaClO<sub>2</sub> (0,01/400; 0,05/600; 0,01/600 μM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 69

	células. Barras representam médias $\pm$ DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle.	
<b>Figura 23.</b>	Efeito de NaClO <sub>2</sub> sobre amastigota axênica de <i>L.braziliensis</i> . Amastigotas axênicas foram tratadas com NaClO <sub>2</sub> (50; 100; 200 e 400 $\mu$ M) por 24 h. Meio Schneider pH 5,5 suplementado foi utilizado como controle. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida por Alamar Blue. Barras representam médias $\pm$ DP de dois experimentos independentes em triplicata. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle.	70
<b>Figura 24.</b>	Imagens de Microscopia eletrônica de varredura de amastigotas axênicas tratadas com NaClO <sub>2</sub> . Amastigotas axênicas de <i>L.braziliensis</i> . A, B, C e D: amastigotas axênicas controle, obtidas a partir de promastigotas em fase log final. E, F, G e H: amastigotas axênicas após tratamento de 24 h com NaClO <sub>2</sub> (14 $\mu$ M).	71
<b>Figura 25.</b>	Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão de amastigotas axênicas tratadas com NaClO <sub>2</sub> . Amastigotas axênicas de <i>L.braziliensis</i> . A, B, C e D: amastigotas axênicas controle, obtidas a partir de promastigotas em fase log final. E, F, G e H: amastigotas axênicas após tratamento de 24 h com NaClO <sub>2</sub> (14 $\mu$ M). (n) núcleo (bf) bolso flagelar (k) cinetoplasto (cl) corpúsculo lipídico (mt) mitocôndria.	72
<b>Figura 26.</b>	Nanoformulações contendo 0,01% de anfotericina B. Nanoformulações obtidas a partir de uma suspensão de nanopartículas contendo anfotericina B a 0,84 mg/mL. A e B: Gel hidrofilico de carbopol contendo 0,01% de anfotericina; C e D: Creme não iônico contendo 0,01% de anfotericina; D e F: Pomada hidrofilica contendo 0,01% de anfotericina.	73
<b>Figura 27.</b>	Formulações contendo 0,01% de anfotericina B livre. Formulações obtidas a partir de uma solução de anfotericina B em DMSO a 0,84 mg/mL. A e B: Gel hidrofilico de carbopol contendo 0,01% de anfotericina; C e D: pomada hidrofilica contendo 0,01% de anfotericina; E e F: Creme não iônico contendo 0,01% de anfotericina.	73
<b>Figura 28.</b>	Formulações de referência. Duplicatas das formulações em branco contendo 10 g das bases. A e B: Gel base de carbopol; C e D: Creme base não-iônico; E e F: Pomada base hidrofilica (Carbowax).	74
<b>Figura 29.</b>	Formulações após teste de centrifuga. Aspecto das formulações 24 h após produção, antes de serem submetidas ao teste de centrifuga. 1 (A e B): Gel hidrofilico; 1 (C e D): Pomada Hidrofilica; 1 (E e F): Creme não-iônico. 2 (A e B): Formulação GHAB; 2 (C e D): Formulação PHAB; 3 (E e F): Formulação CAB. 3 (A e B): Formulação GHNLS; 3 (C e D): Formulação GHNLS; 3 (E e F): Formulação CNLS.	82
<b>Figura 30.</b>	Formulações após teste de centrifuga. Uma alíquota de 5g de cada formulação foi submetida ao teste de centrifuga a 3000 rpm/30 min a 25°C.	82
<b>Figura 31.</b>	Formulações após teste de centrifuga (d <sub>14</sub> ). Uma alíquota de 5g de cada formulação foi submetida ao teste de centrifuga a 3000 rpm/30 min a 25°C, após 14 dias de preparo.	82
<b>Figura 32.</b>	Perfil de liberação da Anf-B a partir das nanoformulações semissólidas (Gel hidrofilico - GHNLS, Pomada hidrofilica - PHNLS e creme não-iônico- CNLS).	84
<b>Figura 33.</b>	Perfil de liberação da Anf-B livre a partir das formulações semissólidas (Gel hidrofilico - GHAB, Pomada hidrofilica - PHAB e creme não-iônico- CAB).	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Principais aspectos relacionados à distinção entre os subgêneros, <i>Viannia</i> e <i>Leishmania</i> , de parasitos pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i> .	21
<b>Tabela 2.</b>	Espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas identificadas no Brasil, regiões e estados onde estão distribuídas, reservatórios e vetores envolvidos.	22
<b>Tabela 3.</b>	Medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose cutânea, mecanismos de ação, via de administração e suas limitações.	33
<b>Tabela 4.</b>	Proporções de clorito de sódio e anfotericina B utilizadas no experimento de combinação in vitro – Método de proporções fixas adaptado.	45
<b>Tabela 5.</b>	Composição do GHNLS e do GHAB.	52
<b>Tabela 6.</b>	Composição do CNLS e do CAB.	52
<b>Tabela 7.</b>	Composição da PHNLS e da PHAB.	53
<b>Tabela 8.</b>	Índices de combinação para atividade antileishmania por clorito de sódio e Fungizone® em promastigotas de <i>Leishmania V. braziliensis</i> .	59
<b>Tabela 9.</b>	Valores de CC50 para macrófagos peritoneais e IC50 para formas promastigota de <i>Leishmania V. braziliensis</i> e os respectivos índices de seletividade (IS) do NaClO <sub>2</sub> e Fungizone.	50
<b>Tabela 10.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico das amostras de referência.	75
<b>Tabela 11.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica das amostras de referência.	75
<b>Tabela 12.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do creme não-iônico das amostras de referência.	75
<b>Tabela 13.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B em nanopartículas.	76
<b>Tabela 14.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B em nanopartículas.	76
<b>Tabela 15.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B em nanopartículas.	76
<b>Tabela 16.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B livre.	77
<b>Tabela 17.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B livre.	77
<b>Tabela 18.</b>	Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B livre.	77
<b>Tabela 19.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico das amostras de referência.	78
<b>Tabela 20.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica das amostras de referência.	79
<b>Tabela 21.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico das amostras de referência.	79
<b>Tabela 22.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B em nanopartículas.	79
<b>Tabela 23.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B em nanopartículas.	79
<b>Tabela 24.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B em nanopartículas.	80
<b>Tabela 25.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B livre.	80
<b>Tabela 26.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B livre.	80
<b>Tabela 27.</b>	Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B livre.	80
<b>Tabela 28.</b>	Concentração, quantidade e porcentagem de Anf-B a partir das nanoformulações (GHNLS, PHNLS e CNLS) e das formulações (GHAB, PHAB, CAB) semissólidas.	83

## LISTA DE ABREVIATURA

<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentração citotóxica do composto que inibe 50% da viabilidade de macrófagos
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTN</b>	Doença Tropical Negligenciada
<b>ERRO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração que inibe o crescimento de 50% das formas promastigotas
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>NLS</b>	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SSG</b>	Estibogluconato de sódio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1	LEISHMANIOSE.....	21
2.1.1	<i>Manifestações clínicas e agentes etiológicos das leishmanioses</i> .....	21
2.1.2	<i>Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)</i> .....	22
2.1.2.1	<b>Leishmaniose cutânea localizada</b> .....	23
2.1.2.2	<b>Leishmaniose cutânea difusa</b> .....	25
2.1.2.3	<b>Leishmaniose cutânea disseminada</b> .....	26
2.1.2.4	<b>Leishmaniose mucocutânea ou mucosa</b> .....	27
2.1.3	<i>Morfologia e ciclo biológico do parasito</i> .....	26
2.1.4	<i>Epidemiologia</i> .....	29
2.1.4.1	<b>Epidemiologia Global</b> .....	30
2.1.4.2	<b>Epidemiologia Nacional</b> .....	32
2.2	TRATAMENTOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZA.....	31
2.2.1	<i>Tratamentos convencionais</i> .....	31
2.2.2	<i>Formulações Tópicas no tratamento da Leishmaniose cutânea localizada</i> .....	34
2.3	NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	35
2.3.1	<i>Nanotecnologia e tratamento tópico da leishmaniose cutânea</i> .....	36
2.4	COMBINAÇÕES DE DROGAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	38
2.4.1	Clorito de Sódio (NaClO <sub>2</sub> ).....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
4.1	MATERIAL E REAGENTES.....	43
4.2	PARASITOS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS .....	43
4.3	DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DO CLORITO DE SÓDIO (NaClO <sub>2</sub> ) E DO FUNGIZONE® (ANF-B) SOBRE A VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> .....	43
4.4	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAS INDUZIDAS PELO NaClO <sub>2</sub> EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> .....	44
4.4.1	<i>Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	44

4.4.2	<i>Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão</i> .....	44
4.5	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE COMBINAÇÃO ENTRE ANF-B/ NaClO <sub>2</sub> SOBRE PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> .....	44
4.6	AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NaClO <sub>2</sub> E ANF-B SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEIAS MURINOS E CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) .....	46
4.7	AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DE NaClO <sub>2</sub> E ANF-B SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) .....	46
4.8	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO DO NaClO <sub>2</sub> E DA ANF-B – EM MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA – SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> .....	49
4.9	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO DO NaClO <sub>2</sub> SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> .	50
4.9.1	<i>Padronização do cultivo de amastigotas axênicas de Leishmania (V.) braziliensis</i> ..	50
4.9.2	<i>Ensaio de citotoxicidade do clorito de sódio sobre amastigotas axênicas de Leishmania (V.) braziliensis</i> .....	50
4.10	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES TÓPICAS.....	51
4.10.1	<i>Preparo das suspensões contendo Anf-B em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)</i> .....	51
4.10.2	<i>Preparo das formulações semissólidas</i> .....	51
4.11	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES .....	53
4.11.1	<i>Ensaio organolépticos</i> .....	53
4.11.1.1	<b>Aspecto</b> .....	55
4.11.1.2	<b>Cor</b> .....	55
4.11.1.3	<b>Odor</b> .....	55
4.11.2	<i>Ensaio físico-químicos</i> .....	54
4.11.2.1	<b>Determinação de pH</b> .....	55
4.11.2.2	<b>Condutividade elétrica</b> .....	55
4.11.2.3	<b>Determinação de densidade</b> .....	56
4.11.2.4	<b>Teste de centrífuga</b> .....	56
4.12	ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DA ANF-B A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	55
4.12.1	<i>Padronização de curva para quantificação de Anf-B por espectrofotometria</i> .....	55
4.12.2	<i>Estudo de liberação in vitro</i> .....	55
4.13	ANIMAIS .....	56
5	<b>PROPOSTA DE ANÁLISE</b> .....	57



<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	57
6.1	ATIVIDADE DO CLORITO DE SÓDIO (NaClO <sub>2</sub> ) E FUNGIZONE® (ANF-B) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	57
6.2	ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS DE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> APÓS TRATAMENTO COM CLORITO DE SÓDIO .....	58
6.2.1	<i>Alterações morfológicas sobre promastigotas de L.braziliensis induzidas pelo tratamento com NaClO<sub>2</sub> observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	63
6.2.2	<i>Alterações ultraestruturais sobre promastigotas de L.braziliensis induzidas pelo tratamento com NaClO<sub>2</sub> observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	64
6.2.3	<i>Morfologia de amastigotas de L.braziliensis tratadas com NaClO<sub>2</sub> observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	67
6.2.4	<i>Ultraestruturas de amastigotas de L.braziliensis tratadas com NaClO<sub>2</sub> observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	72
6.3	EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE ANFOTERICINA B (FUNGIZONE®) E CLORITO DE SÓDIO .....	58
6.4	CITOCOMPATIBILIDADE DO NaClO <sub>2</sub> E FUNGIZONE SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DE SELETIVIDADE .....	59
6.5	CITOTOXICIDADE DO NaClO <sub>2</sub> E FUNGIZONE SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HACAT) .....	61
6.6	EFEITO DE ANF-B E NaClO <sub>2</sub> , EM MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA, SOBRE A VIABILIDADE DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> .....	67
6.7	EFEITO DO NaClO <sub>2</sub> SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i> .....	71
6.8	FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO ANF-B A 0,01 % .....	73
6.9	CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	75
6.9.1	<i>Ensaio Organolépticos</i> .....	75
6.9.2	<i>Ensaio Físico-Químicos</i> .....	79
6.9.3	<i>Liberção in vitro de Anf-B das formulações semissólidas desenvolvidas</i> .....	84
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	86
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	93
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é um conjunto de doenças causada por tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003). Endêmica em 98 países, com 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões sob-risco de infecção, a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis doenças tropicais mais importantes do mundo (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; PAHO, 2017; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; WHO, 2017a). Apesar deste cenário, é classificada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) como uma doença tropical negligenciada (PAHO, 2017).

Diversas são as formas de manifestações clínicas da leishmaniose: cutânea localizada, mucocutânea, cutânea difusa, cutânea disseminada e visceral, que são agrupadas em duas grandes classes – Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral, cada espécie de *Leishmania* está diretamente associada a um quadro clínico diferente (BRUNI *et al.*, 2017; TEIXEIRA, 2013). Globalmente, a forma mais comum de leishmaniose é a cutânea, onde 2/3 de sua incidência anual se concentra em seis países, dentre eles o Brasil (WHO, 2017a). No Brasil, a região Nordeste apresenta o segundo maior número de casos registrados no país (BRASIL, 2013; GOVERNO DO BRASIL, 2017).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas fases distintas em seu ciclo de vida, a forma de promastigota (extracelular) encontrada no vetor (*Lutzomyia* – nas Américas; *Phlebotomus* – no continente europeu, africano e asiático) e a forma de amastigota (intracelular) presente em vacúolos parasitóforos da célula infectada no hospedeiro (SUNTER; GULL, 2017; TEIXEIRA, 2013). As espécies de *Leishmania* desenvolveram mecanismos de defesa que as capacitaram sobreviver neste ambiente altamente tóxico, a multiplicarem-se, até rompimento da célula, quando são então liberadas para infectar outros macrófagos (AFONSO, 2008; COSTA, 2011; NASCIMENTO, 2011).

O ciclo de transmissão da doença começa quando fêmeas do vetor ingerem formas amastigotas do protozoário, livres na circulação ou no interior de macrófagos, a partir de um hospedeiro mamífero infectado (NASCIMENTO, 2011). Em muitas regiões do mundo, a leishmaniose é zoonótica com grandes reservatórios de infecção em animais domésticos e silvestres, entretanto a infecção também é transmitida entre humanos (leishmaniose

antroponótica) – principal forma de propagação de cepas de *Leishmania* resistentes (ROBERTS, 2006; TRINCONI *et al.*, 2014).

Atualmente, não existe um único tratamento efetivo para todas as espécies e síndromes causadas pelos parasitos de *Leishmania*. Contudo, existem várias terapias para as diversas formas de leishmaniose (COPELAND; ARONSON, 2015; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Dentre estas opções, os antimonias pentavalentes dominam o mercado há cerca de nove décadas (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Entretanto, o surgimento de espécies resistentes vem diminuindo sua eficácia e limitando a sua aplicação (PETERSEN *et al.*, 2012).

Outros fármacos são empregados como segunda linha de tratamento na leishmaniose cutânea, os principais disponíveis são Anfotericina B, Paromomicina, Pentamidina, Miltefosina e Anfotericina B lipossomal (BRASIL, 2013; SBMT, 2014). No entanto, assim como os antimoniais, estes medicamentos são de aplicação parenteral e apresentam limitações relativas à toxicidade, casos de resistência e custo (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PETERSEN *et al.*, 2012; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

A maioria dos relatórios publicados de morte em pacientes com leishmaniose cutânea está relacionada à terapia sistêmica, desta forma a OMS recomenda tratamento simples de feridas ou terapia local como tratamento de primeira linha (MORIZOT *et al.*, 2013). Contudo, apesar do seu potencial, baixo custo e facilidade de administração, formulações tópicas que empregam fármacos convencionais apresentam como principal dificuldade a permeação cutânea, tendo em vista que os macrófagos infectados se encontram profundamente na camada dérmica (FERREIRA *et al.*, 2004; JAAFARI *et al.*, 2009; KALANTARI *et al.*, 2014).

Ademais, estudos comprovam que o uso de fármacos isolados no tratamento tópico da leishmaniose nem sempre conduzem à cicatrização completa das feridas na leishmaniose cutânea (EL-ON *et al.*, 1984; GROGL *et al.*, 1999; NEAL *et al.*, 1995). Estes achados são geralmente associados ao peso molecular e às características de solubilidade de cada substância, pois além das características da formulação interferir na permeação cutânea de formulações tópicas, as características físicas e químicas dos fármacos também influenciam (FORTENBACH; MODJTAHEDI; MAIBACH, 2008).

Dessa forma, a fim de superar estas limitações, nanocarreadores têm se mostrado capazes de aumentar a permeação de fármacos através da pele, principalmente

nanopartículas de caráter lipídico, devido à sua maior semelhança com a membrana natural das células, e as de menor tamanho, que contribuem para permeação do fármaco através dos anexos cutâneos (JAAFARI *et al.*, 2009). Outro ganho com as nanopartículas é que seu tamanho reduzido conduz à melhor captação dos fármacos pelos macrófagos e melhora sua permeação através das membranas destas células, atingindo melhores concentrações no fagolisossoma, local onde estão presentes os amastigotas de *Leishmania* (BRUNI *et al.*, 2017; SURI; FENNIRI; SINGH, 2007).

Além do problema de permeação cutânea das formulações tradicionais no tratamento tópico da leishmaniose, a resistência dos parasitos aos tratamentos convencionais já vem sendo relatada (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Neste contexto, a propagação de resistência a drogas levou à tendência atual de utilizar a terapia combinada de fármacos no tratamento de doenças infecciosas (TRINCONI *et al.*, 2014). Contudo, cepas resistentes à modalidade de terapia combinada, multialvo já é uma realidade (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017, 2017; TRINCONI *et al.*, 2014).

Assim, a busca por novas drogas alternativas, úteis para tratar a leishmaniose cutânea se faz necessária para superar problemas de resistência (TRINCONI *et al.*, 2014). Neste cenário, encontram-se preparações farmacêuticas a base de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) que vêm mostrando *in vitro* e *in vivo* atividades antileishmania, antimicrobiana e cicatrizante (JEBRAN *et al.*, 2014). Foi demonstrado que o principal mecanismo de ação do clorito de sódio está relacionado com a síntese de espécies reativas de oxigênio (STAHL *et al.*, 2014). Contudo, a avaliação da atividade antileishmania de preparações farmacêuticas, a base de clorito de sódio, foi avaliada apenas em espécies prevalentes no Velho Mundo, como *L. major* e *L. tropica* (JEBRAN *et al.*, 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho se propôs a realizar uma avaliação do efeito leishmanicida do clorito de sódio frente a espécie de *Leishmania braziliensis*, bem como o seu sinergismo com anfotericina B (Fungizone®). Iremos também avaliar a capacidade de permeação cutânea da anfotericina B encapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas, de forma a combinar estas nanopartículas com o clorito de sódio em formulações para o tratamento tópico em modelo de leishmaniose cutânea e avaliar suas vantagens frente a formulações convencionais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LEISHMANIOSE

#### 2.1.1 Manifestações clínicas e agentes etiológicos das leishmanioses

Os parasitos do gênero *Leishmania* são os agentes causais da leishmaniose. Estes protozoários pertencem à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida e podem ser subdivididos em dois subgêneros, o *Viannia* e o *Leishmania*. Esta subdivisão está relacionada a dois aspectos principais: localização de desenvolvimento da forma promastigota no inseto vetor, bem como o tamanho da forma amastigota nas lesões (Tabela 1) (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003).

**Tabela 1.** Principais aspectos relacionados à distinção entre os subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*.

Subgênero	Localização de desenvolvimento da promastigota	Tamanho da amastigota
<i>Leishmania</i>	Intestinos anterior, médio e posterior	3 a 6 µm e as lesões são densamente parasitadas.
<i>Viannia</i>	Intestinos anterior e médio	2 a 4 µm e as lesões apresentam poucos parasitos.

Tendo diferentes características de tropismo, estes parasitos podem infectar células superficiais ou viscerais (BRUNI *et al.*, 2017), desta forma cada espécie de *Leishmania* está diretamente associada a um quadro clínico diferente, dentre as principais espécies brasileiras (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*) seis formas clínicas diferentes são observadas: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa, cutânea disseminada, visceral (ou Calazar) e lesões dérmicas pós-calazar. Estas formas podem ser agrupadas em duas grandes classes: Leishmaniose Tegumentar Americana, que engloba as formas cutâneas e mucocutânea da doença e a Leishmaniose Visceral, que pode ser fatal (TEIXEIRA, 2013)

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e 8 espécies descritas somente em animais. No Brasil, já foram identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgênero *Viannia* e 1 do subgênero

*Leishmania*. Na tabela abaixo (Tabela 2) estão listadas estas espécies, regiões de maior ocorrência, principais reservatórios e vetores envolvidos (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARQUES; MASUR, 1998).

**Tabela 2.** Espécies de *Leishmania* dermatrópicas identificadas no Brasil, regiões e estados onde estão distribuídas, reservatórios e vetores envolvidos.

Espécies	Regiões e Estados	Reservatórios Naturais	Vetores
<i>Leishmania</i> ( <i>Viannia</i> ) <i>braziliensis</i>	Ampla distribuição, encontrada do norte ao sul do Brasil.	Animais domésticos	<i>Lutzomyia</i> <i>whitmani</i> , <i>Lu.</i> <i>wellcomei</i> e <i>Lu.</i> <i>intermedia</i> , dentre outras.
<i>Leishmania</i> ( <i>V.</i> ) <i>guyanensis</i>	Margem norte do Rio Amazonas.	Desdentados e marsupiais	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> e <i>Lu.</i> <i>Whitmani</i> .
<i>Leishmania</i> ( <i>V.</i> ) <i>naiffi</i>	PA, AM, Amazônia	Tatu	<i>Lu. Ubiquitalis</i>
<i>Leishmania</i> ( <i>V.</i> ) <i>shawi</i>	AM e PA	Animais silvestres como macacos, preguiças e procionídeos	<i>Lu. Whitmani</i>
<i>Leishmania</i> ( <i>V.</i> ) <i>lainsoni</i>	AM, PA	Paca	<i>Lu. Ubiquitalis</i>
<i>L. (V.)</i> <i>lindenberg</i>	PA	-	-
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>amazonensis</i>	AM, PA, RO, TO e sudoeste do Maranhão, BA, MG e SP, GO.	Roedores e marsupiais	<i>Lu.</i> <i>flaviscutellata</i> e <i>Lu.</i> <i>Olmei</i>

### 2.1.2 *Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)*

#### 2.1.2.1 **Leishmaniose cutânea localizada**

São várias as espécies causadoras de leishmaniose cutânea no Brasil, com destaque para *L. (V.) guyanensis*, *L.(L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Geralmente não é fatal, mas pode ser desfigurante e socialmente estigmatizante, principalmente se houver atraso no

diagnóstico, acarretando demora no início do tratamento. No local da picada do inseto vetor, ou seja, em áreas expostas, desenvolve-se uma lesão cutânea indolor, cerca de 2-8 semanas após a picada, de formato arredondado, tamanho variado (de milímetros a centímetros), podendo ser ulcerosa ou não (MERINO-ESPINOSA *et al.*, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; TEIXEIRA, 2013).

Após a picada do inseto vetor, ocorre um aumento local de temperatura e inchaço. Uma pápula assintomática eritematosa aparece no local da mordida, embora o prurido possa estar presente. O tamanho varia entre 1 e 10 mm de diâmetro. Após dois dias, ela se transforma em vesícula e depois em uma pústula, e quando se rompe, espontaneamente ou por trauma, resulta em uma úlcera arredondada com bordas elevadas. O fundo da lesão mostra o tecido de granulação e uma periferia rosa, às vezes coberto por uma pseudomembrana esbranquiçada (Figura 1B). A lesão não é dolorosa, caso não apresente infecções secundárias por bactérias e/ou fungos. A úlcera pode ser única ou múltipla (frequentemente causada por *L. (V.) guyanensis*) (Figura 1C) e o quadro clínico é geralmente afebril com adenopatia regional (BRASIL, 2007; GOVERNO DO BRASIL, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; TEIXEIRA, 2013).

No entanto, a lesão inicial pode não ulcerar e decorrer com quadro assintomático. Além disso, a úlcera pode curar espontaneamente, porém o tempo é variável de acordo com a espécie envolvida, onde: 6-15 meses no caso de *L. braziliensis*, *L. tropica* ou *L. panamensis*; 3-9 meses e 2-6 meses nos casos de *L. mexicana* e *L. major*, respectivamente. Contudo, a cicatrização espontânea deixa um aspecto inóspito, com pigmentação irregular, periferia hiperpigmentada, telangiectasia, bem como deformidade local devido à grande destruição tecidual (MERINO-ESPINOSA *et al.*, 2017).

Ademais, a resolução de lesão não corresponde a uma cura estéril, pois os parasitos ou DNA parasito podem ser encontrados nas cicatrizes de pacientes curados, anos após tratamento bem sucedido com cura clínica (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).



**Figura 1.** Lesões decorrentes da leishmaniose cutânea localizada. **A:** Lesão cutânea localizada em estágio inicial (ausência de ulceração); **B:** Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso; **C:** Lesão cutânea múltipla, ulceradas. Adaptado de Brasil (2007).

### 2.1.2.2 Leishmaniose cutânea difusa

É uma doença de evolução lenta e sem tratamento eficaz, que no Brasil é causada pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, de natureza grave, caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplas lesões que podem se unir em placas cobrindo grandes áreas da pele (Figura 2). As lesões são predominantemente de natureza nodular ou papular, tendem a exulcerar, mas não ulceram, contêm uma abundância de amastigotas (BRASIL, 2007; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; TEIXEIRA, 2013).

A leishmaniose cutânea difusa é tratada de modo convencional, via de regra, não cicatrizam espontaneamente, são classicamente resistentes ao tratamento medicamentoso e os pacientes tendem a apresentar recaídas. As quimioterapias convencionais que afetam o crescimento do parasito têm efeitos limitados nesses pacientes, sugere-se o fato de não corrigirem defeitos imunes, pois afeta pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. (BRASIL, 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; TEIXEIRA, 2013).



**Figura 2.** Lesões decorrentes da leishmaniose cutânea difusa. **A:** Polimorfismo lesional (tempo de doença 3 anos); **B:** Lesões infiltradas com exulcerações em bordas (tempo de doença 12 anos); **C:** Lesão infiltrada com áreas descamativas na orelha (tempo de doença 12 anos). Adaptado de Brasil (2007).



### 2.1.2.3 Leishmaniose cutânea disseminada

Esta forma clínica é, também, caracterizada por lesões múltiplas de formas variadas, podendo ser acneiformes, papulares, nodulares e ulceradas. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis* (BRASIL, 2007). Ademais, podem ocorrer lesões na mucosa nasal semelhantes às lesões da forma mucocutânea. Diferentemente do que ocorre na cutânea localizada, as lesões estão distantes do sítio de inoculação primário e distribuídas por diversas áreas do tegumento (Figura 3) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).



**Figura 3.** Lesões decorrentes da leishmaniose cutânea disseminada. **A:** paciente apresentando múltiplas lesões papulares, algumas com ulceração superficial; **B:** Paciente com acometimento mucoso, envolvendo nariz e mucosa oral; **C:** Paciente com lesões em placa infiltrada extensa com crostas no local e nódulo infiltrativo. Adaptado de Brasil (2007).

Apesar das lesões serem numerosas, os pacientes tendem a responder bem ao tratamento medicamentoso habitual, mas sob regimes de tratamento múltiplos ou ligeiramente mais longos do que as recomendações de tratamento na forma cutânea localizada (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Quanto a sua ocorrência, a forma disseminada está se tornando mais comum na América do Sul. Na Bahia, esta forma superou a leishmaniose mucocutânea em termos de incidência. Contudo, em outras regiões do Brasil, a ocorrência da leishmaniose disseminada é relativamente rara (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

#### 2.1.2.4 Leishmaniose mucocutânea ou mucosa

A leishmaniose mucosa apresenta-se como uma destruição lenta, mas progressiva dos tecidos mucoso e submucoso no nariz e na boca e ainda faringe, laringe, lábios ou bochechas, e raramente a traqueia ou genitália (Figura 4), com achados raros de amastigotas (MACHADO-COELHO *et al.*, 2005; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).



**Figura 4.** Lesões decorrentes da leishmaniose mucocutânea ou mucosa. **A:** Edema nasal com infiltração em asa e base do nariz; **B:** Lesões ulceradas em palato, infiltração do lábil e lesão ulcerada em asa do nariz esquerdo; **C:** Lesões ulceradas francas, com bordas elevadas, infiltradas fundo granuloso, localizadas no pênis e bolsa escrotal. Adaptado de Brasil (2007).

Esta forma pode ocorrer como uma complicação da leishmaniose cutânea localizada, aproximadamente 1-10% dos pacientes, causada por espécies de *Leishmania* pertencentes ao subgênero *Viannia*. A maioria dos casos é devido à infecção por *Leishmania (V.) braziliensis* ou, com menor frequência, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (MACHADO-COELHO *et al.*, 2005; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Os fatores de risco conhecidos incluem sexo (masculino > feminino), aumento da idade, desnutrição, tamanho e número de lesões na leishmaniose cutânea localizada (LCL), lesões acima da cintura e terapia inadequada (MACHADO-COELHO *et al.*, 2005). A forma mucocutânea pode ocorrer simultaneamente ou meses/anos após a resolução das lesões primárias de LCL, sugerindo a persistência de organismos latentes (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

#### 2.1.3 Morfologia e ciclo biológico do parasito

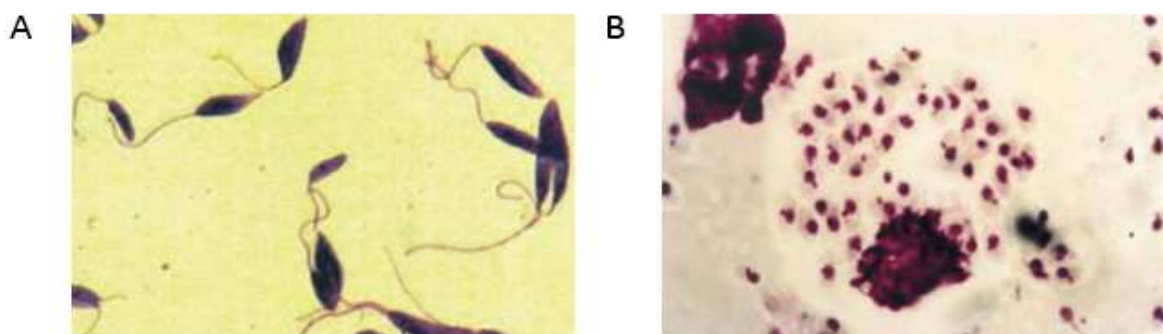
A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório e com ciclo de vida heteroxênico (digenético), ou seja, apresenta seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados mamíferos e insetos dípteros (Flebotomíneos). Independente da espécie de *Leishmania*, os estágios do

desenvolvimento são semelhantes morfológicamente. Os dois principais estágios de desenvolvimento da *Leishmania* são: promastigota (encontrada no trato digestório dos dípteros) e amastigotas (observada apenas no interior da célula hospedeira dos vertebrados) (Figura 5) (SUNTER; GULL, 2017; TEIXEIRA, 2013).

Apesar da arquitetura celular básica ser conservada nas formas previamente citadas, esta variedade na morfologia celular, bem como as diferentes formas de desenvolvimento, possibilita a adaptação dos parasitos de *Leishmania* ao hospedeiro ou ao vetor.

A morfologia celular dos parasitos de *Leishmania* é muito precisamente definida pela forma da célula, comprimento do flagelo, posição do núcleo/cinetoplasto e características ultraestruturais e, portanto, tem sido tradicionalmente usado para definir as formas celulares observadas. Assim é feito para diferenciar as duas principais morfologias dos parasitos de

**Figura 5.** Formas evolutivas dos parasitos de *Leishmania*. **A:** Forma flagelada, extracelular ou promastigotas; **B:** Forma aflagelada, intracelular ou amastigota. Fonte: Nascimento (2011).



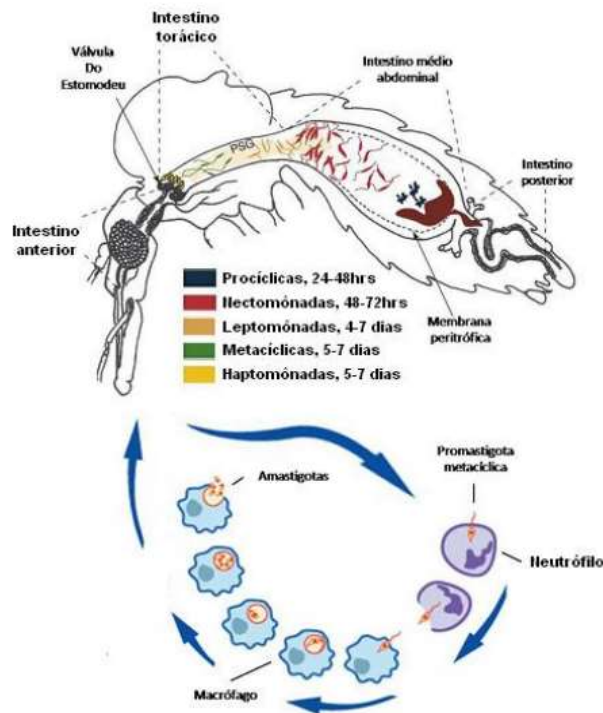
*Leishmania*, onde as formas amastigotas caracterizam-se pelo seu formato ovoide, com aproximadamente 2,5 a 5 $\mu$ m de diâmetro e flagelo não exteriorizado, enquanto que as formas promastigotas, por sua vez, caracterizam-se por apresentar corpo alongado, medindo entre 14 e 20 $\mu$ m e flagelo livre na sua porção anterior. Dentre as promastigotas, ainda com base na morfologia, é possível diferenciar a forma infectante da forma proliferativa. (NASCIMENTO, 2011; SUNTER; GULL, 2017; TEIXEIRA, 2013).

O ciclo de transmissão da doença começa quando fêmeas do vetor (flebotomíneos) ingerem formas amastigotas do protozoário, livres na circulação ou no interior de macrófagos, a partir de um hospedeiro mamífero infectado (NASCIMENTO, 2011). Nos macrófagos, os parasitos ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), organela derivada da fusão do fagossoma com os lisossomas. As *Leishmanias* desenvolveram mecanismos de defesa que as capacitaram sobreviver neste ambiente altamente tóxico, a

multiplicarem-se, até rompimento da célula, quando são então liberadas para infectar outros macrófagos (COSTA, 2011; MARTINS *et al.*, 2012; NASCIMENTO, 2011), 28, 29.

Dentro do inseto vetor, os parasitos de *Leishmania* irão sofrer etapas sucessivas de transformações (Figura 6), cada uma destas etapas é caracterizada por alterações morfológicas e funcionais. Inicialmente, o sangue contendo as amastigotas é levado para o intestino posterior do inseto, onde as amastigotas irão se diferenciar em promastigotas procíclicas e iniciam o primeiro ciclo de multiplicação. As procíclicas se desenvolvem em nectomônadas e migram para o intestino torácico, onde um segundo ciclo de multiplicação se inicia a partir de formas leptomônadas, oriundas das nectomônadas. Finalmente, duas formas são observadas na válvula do estomodeu, haptomônadas e metacíclicas, das quais, a forma metacíclica corresponde ao estágio infeccioso e são altamente adaptadas para transmissão ao hospedeiro mamífero (KAMHAWI, 2006).

Por fim, após a metaciclogênese (processo de expressão da virulência nas promastigotas), as promastigotas metacíclicas estão aptas a serem transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo (COSTA, 2011). Inicialmente, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por neutrófilos, desencadeiam a apoptose nos mesmos e são posteriormente fagocitadas por macrófagos (Figura 6). O aumento da temperatura e a diminuição do pH no interior do fagolisossomo fornecem os sinais necessários para a diferenciação das promastigotas em amastigotas (NASCIMENTO, 2011).



**Figura 6.** Ciclo biológico de *Leishmania* no inseto vetor e processo de fagocitose por células de defesa no hospedeiro humano. Fonte Nascimento (2011).

Em muitas regiões do mundo, a leishmaniose é zoonótica com grandes reservatórios de infecção em animais domésticos e silvestres, entretanto a infecção também é transmitida entre humanos (leishmaniose antroponótica). Devido ao processo de co-evolução, existe uma associação entre as espécies de *Leishmania*, o reservatório e as espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão (Tabela 2) (BASANO; CAMARGO, 2004).

#### 2.1.4 Epidemiologia

##### 2.1.4.1 Epidemiologia Global

Dentre as causas de morte causadas por doenças infecciosas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a Leishmaniose como uma doença emergente, não controlada e proeminente, por isso é uma das seis doenças tropicais mais importantes (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; PAHO, 2017; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; WHO, 2017a).

Endêmica em 98 países em desenvolvimento (regiões tropicais e subtropicais), a Leishmaniose é classificada pela OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde) como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), ou seja, afeta as pessoas mais pobres em sociedades

pobres - populações com pouca voz e representação. Como consequência, DTNs até recebem pouco financiamento e atenção internacional. Essas doenças geralmente causam mais incapacidade do que a morte. As suas características clínicas geralmente levam a estigmatização e isolamento social, o que pode aumentar ainda mais sua negligência (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; INSTITUTE OF MEDICINE (US) FORUM ON MICROBIAL THREATS, 2011; PAHO, 2017; WHO, 2017a).

Atualmente, estima-se que existem 12 milhões de pessoas infectadas (todas as formas), 350 milhões de pessoas estão em risco, 20.000 a 30.000 óbitos ocorrem anualmente e é prevista uma incidência anual de 700.000 a 1 milhão de novos casos. Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (GUTIÉRREZ-REBOLLEDO; DRIER-JONAS; JIMÉNEZ-ARELLANES, 2017; WHO, 2017b, 2017c).

A forma mais comum de Leishmaniose é a cutânea, estima-se que cerca de 0,6 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente, cerca de 95% dos casos ocorre nas Américas, na bacia do Mediterrâneo (sul da Europa, norte da África e zona mais ocidental da Ásia), Oriente Médio e Ásia Central. Seis países concentram mais de dois terços da incidência anual: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do) e República Árabe da Síria (WHO, 2017a).

Não menos importantes, as formas visceral e mucocutânea também apresentam consideráveis números de casos no Brasil, onde mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral se concentram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, bem como mais de 90% de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2017a).

#### **2.1.4.2 Epidemiologia Nacional**

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as suas regiões. Atualmente, a região Norte foi quem registrou o maior número de casos de LTA (8.939), seguida do Nordeste (5.152), Centro-Oeste (2.937), Sudeste (1.762) e Sul (493) (BRASIL, 2013; GOVERNO DO BRASIL, 2017).

O aumento no número de casos de LTA foi verificado a partir da década de 80 (3.000 casos) e em 1995 o Brasil registrou o maior número de casos (35.748), um aumento de aproximadamente onze vezes em 15 anos. Não destoante do cenário atual, em 2004 os maiores coeficientes de detecção da LTA estavam distribuídos em três regiões: Norte (Pará, Tocantins, Roraima, Acre, Amazonas); Nordeste (Maranhão); e Centro-Oeste (Mato Grosso) (BRASIL, 2013; GOVERNO DO BRASIL, 2017).

De maneira favorável, em dez anos o número de casos de LTA no Brasil reduziu 27%, passando de 26.685 casos em 2005 para 19.395 casos em 2015 (GOVERNO DO BRASIL, 2017).

## 2.2 TRATAMENTOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA

### 2.2.1 *Tratamentos convencionais*

As diversas síndromes clínicas (cutânea, visceral, mucosa), causadas pelos parasitos de *Leishmania*, são determinadas pelo equilíbrio do síncrono: fatores parasitários (tropismo, virulência, resistência, espécies) acrescido da resposta imune do hospedeiro (ex. as respostas Th2 estão associadas à persistência do parasito nas lesões (COPELAND; ARONSON, 2015; KUMAR *et al.*, 2017).

Assim sendo, a prioridade geral do tratamento varia de acordo com a síndrome desenvolvida, se Leishmaniose Visceral – o tratamento é dado para salvar vidas – se Leishmaniose Cutânea - para prevenir morbidades, como a desfiguração, a recaída e, em algumas espécies, a infecção metastática (COPELAND; ARONSON, 2015).

Atualmente, não existe um único tratamento efetivo para todas as espécies e síndromes causadas pelos parasitos de *Leishmania*. Contudo, existem várias terapias para as diversas formas de leishmaniose, as preferências para o tratamento de primeira ou segunda linha variam de acordo com o tipo de doença, a espécie envolvida e a prática de tratamento em cada região (COPELAND; ARONSON, 2015; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Antimoniais pentavalentes (stibogluconato de sódio - Pentostan® e antimoniato de meglumina – Glucantime®) são as principais drogas empregadas contra a leishmaniose desde a década de 1920. Este uso prolongado é explicado pelo fato destas drogas apresentarem eficácia para a maioria das formas clínicas, em termos de resultados clínicos e microbiológicos satisfatórios (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; TORRES-GUERRERO *et al.*,

2017). Entretanto, o surgimento de espécies resistentes vem diminuindo sua eficácia e limitando a sua aplicação (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). No subcontinente Indiano seu uso foi amplamente substituído, onde a resistência tornou-se generalizada (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). No Brasil, a droga de primeira escolha para a LTA é o antimoniato de meglumina (forma comercializada no Brasil) ao longo de 20 dias para a forma cutânea (BRASIL, 2013).

Além do problema de resistência, os antimoniais apresentam uma estreita janela terapêutica e efeitos colaterais são comuns no uso da terapia sistêmica (IV ou IM), tais quais cardiotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas e pancreáticas, pancitopenia e anormalidades eletrolíticas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Outros fármacos são empregados como segunda linha de tratamento da LCL, os principais disponíveis são Anfotericina B, Paromomicina, Pentamidina, Miltefosina e Amfotericina B lipossomal, que no Brasil está registrada na ANVISA para uso no tratamento da LV, entretanto em determinadas situações de LTA seu uso *off label* é permitido mediante justificativa médica (BRASIL, 2013; SBMT, 2014).

No entanto, assim como os antimoniais, os medicamentos de segunda linha apresentam limitações relativas à toxicidade, via de administração e custo. Estas limitações, seus respectivos mecanismos de ação e vias de administração estão listados na Tabela 3 (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PETERSEN *et al.*, 2012; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).



**Tabela 3.** Medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose cutânea, mecanismos de ação, via de administração e suas limitações.

Medicamentos	Mecanismo de ação	Via de administração	Limitações
Paromomicina	Antibiótico aminoglicosídeo – induz leitura equivocada do mRNA interferindo no complexo de formação peptídeos.	Tópica	Ototoxicidade, instabilidade vestibular e nefrotoxicidade.
Pentamidina	Diamidina aromática – inibe enzimas importantes para o parasito (ex. ornitina descarboxilase) e se ligam ao DNA.	Intravenosa	Anormalidades nas enzimas hepáticas e em hemograma, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e possível desenvolvimento de diabetes.
Miltefosina	Alquilfosfocolina – seu mecanismo de ação contra <i>Leishmania</i> ainda é controverso, mas é possível que induza à apoptose, altere vias de sinalização e iniba enzimas.	Oral	Afeta o trato gastrointestinal, eleva os níveis de transaminases, uremia e creatinemia, causa teratogenia e casos de resistência já são relatados pelo seu uso em longo prazo.
Anfotericina B lipossomal	Antibiótico poliênico encapsulado em lipossomas - sua ligação ao ergosterol, leva à alteração de permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasito.	Intravenosa	Formulação mais dispendiosa, o que limita seu uso generalizado.

Os problemas combinados de administração parenteral (maioria das opções), toxicidade e seleção de parasitos resistentes dificultam o sucesso da terapia na leishmaniose cutânea. Mesmo as terapias combinadas (ex. Antimonial e Paromomicina) não são imunes à

seleção de resistência, o que coloca desafios potenciais para a próxima geração de terapias combinadas (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017).

A maioria dos relatórios publicados de morte em pacientes com CL estão relacionados à terapia sistêmica, desta forma a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda tratamento simples de feridas ou terapia local como tratamento de primeira linha, seguido ou substituído por terapia sistêmica se a terapia local falhar ou não puder ser realizada (MORIZOT *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Formulações Tópicas no tratamento da Leishmaniose cutânea localizada

A terapia tópica para LCL foi recomendada devido ao seu potencial, baixo custo e facilidade de administração. Além disso, uma possível combinação de tratamento sistêmico com uma aplicação tópica leva à redução da dose e tempo do tratamento sistêmico (TRINCONI *et al.*, 2017).

O cuidado com as lesões na leishmaniose cutânea inclui desbridamento, controle de infecção e hidratação, exemplos já utilizados na prática clínica são: crioterapia, terapia de calor, paromomicina tópica e estibogluconato intra-lesional ( $Sb^{+5}$ -il) (COPELAND; ARONSON, 2015; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Contudo, a aplicação de um tratamento único local é logisticamente dependente de alguns fatores como: espécie infectante, topografia da lesão, e sua gravidade (relativo a uma possível desfiguração do local) (MORIZOT *et al.*, 2013).

Estudo conduzido no Centro de Referência de Leishmaniose Francês demonstrou sucesso ao selecionar o tipo de terapia (cuidado simples da ferida, terapia local ou sistêmica), para 109 pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, com base no tamanho da lesão cutânea (<4 cm ou >4 cm). Destes, dentro de um período de 42 a 60 dias, obtiveram resultados positivos, onde: 92% (cuidados simples), 79% (crioterapia +  $Sb^{+5}$ -il) e 60% (terapia sistêmica) (MORIZOT *et al.*, 2013).

Entretanto, a atividade de formulações tópicas contendo paromomicina, por exemplo, mostra-se eficaz em alguns estudos e não em outros. Geralmente, a atividade destas formulações na pele intacta e contendo apenas paromomicina é baixa e promove cicatrização incompleta (EL-ON *et al.*, 1984; GROGL *et al.*, 1999; NEAL *et al.*, 1995). Em contrapartida, quando a camada córnea da pele é removida, observa-se que a permeação cutânea de paromomicina é cerca de vinte vezes maior (GONÇALVES *et al.*, 2005). Estes achados são

associados ao tamanho molecular relativamente grande do fármaco e sua hidrofiliçidade, que conduzem a baixa penetração cutânea da droga (GONÇALVES *et al.*, 2005; KALANTARI *et al.*, 2014).

Ademais, o mesmo ocorre com anfotericina B, que é uma droga altamente ativa e lipofílica, porém ineficaz quando aplicada topicamente por também apresentar alto peso molecular (SANTOS *et al.*, 2012). Estudos de Perez *et al.* (2016) demonstraram que a acumulação total de Anfotericina B (AmB) na pele (estrato córneo e epiderme viável) foi 40 vezes maior quando aplicada em lipossomas ultradeformáveis contendo AmB, do que outras formulações de AmB lipossomal.

### 2.3 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

A nanotecnologia é a uma tecnologia emergente, mas que vem mostrando rápido desenvolvimento. Os nanocarreadores são uma crescente opção para a entrega de medicamentos devido às suas vantagens em relação às formulações convencionais (GUPTA *et al.*, 2013). Estes sistemas de partículas coloidais apresentam tamanho variado que vão de 10 a 1000 nm e são constituídos por diferentes materiais biodegradáveis, tais como polímeros naturais ou sintéticos, lipídeos ou metais. Para aplicações terapêuticas, as drogas podem ser integradas na matriz da partícula ou ligadas à sua superfície (GUPTA *et al.*, 2013; SURI; FENNIRI; SINGH, 2007).

Dentre as principais vantagens dos sistemas particulados estão: liberação controlada do fármaco, proteção de grupos lábeis contra degradação, e do próprio fármaco contra degradação nos fluidos biológicos, diminuição da toxicidade e aumento da adesividade da droga à pele (GUPTA *et al.*, 2013). Além disso, nanocarreadores são capazes de controlar o destino de uma droga no ambiente biológico, por isso nanopartículas podem ser usadas na entrega direcionada de fármacos, tanto numa aplicação local, quanto sistemicamente, direcionando fármacos para um sítio específico, de forma a melhorar sua biodisponibilidade (SURI; FENNIRI; SINGH, 2007).

Um dos principais desafios na utilização de fármacos na leishmaniose é a dificuldade de permitir a sua permeação dentro dos macrófagos, pois as membranas devem ser percorridas pelo agente terapêutico até atingir o fagolisossoma, onde os parasitos de *Leishmania* estão hospedados (BRUNI *et al.*, 2017). De certo, esta dificuldade pode ser superada ao utilizar nanocarreadores para veicular tais fármacos, pois devido ao seu reduzido

tamanho, são absorvidos por células de forma mais eficiente do que macromoléculas, podendo então ser utilizados como sistemas efetivos de transporte e entrega, com a finalidade de levar altas concentrações de fármaco para o interior das células infectadas (BRUNI *et al.*, 2017; SURI; FENNIRI; SINGH, 2007).

Sobretudo, os medicamentos atuais não apresentam especificidade pelos macrófagos infectados, por isso seu acúmulo em tecidos saudáveis acarreta em efeitos colaterais e toxicidade. Portanto, outra possibilidade é uma abordagem direcionada que implique a modificação da superfície de nanocarreadores aumentando a sua seletividade por macrófagos infectados (JAIN; JAIN, 2013). Desta forma, considerando o pequeno número de medicamentos inovadores antileishmania, em paralelo com a busca por drogas mais eficientes e menos tóxicas, a combinação de drogas antileishmania tradicionais com nanocarreadores é uma abordagem promissora (BRUNI *et al.*, 2017).

### 2.3.1 Nanotecnologia e tratamento tópico da leishmaniose cutânea

Os tratamentos atuais para a leishmaniose apresentam uma série de limitações, como toxicidade, alto custo, administração parenteral, hospitalização do paciente e desenvolvimento de resistência (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017). Assim sendo, o desenvolvimento da nanotecnologia, nos últimos anos, fornece novas abordagens no tratamento da leishmaniose, uma delas, e já disponível no mercado, é o emprego de nanocarreadores para os medicamentos convencionais (DE CARVALHO *et al.*, 2013). Por exemplo, o emprego de lipossomas, para veicular a anfotericina B lipossomal (AmBisome®), reduziu os seus problemas relacionados à toxicidade e biodisponibilidade (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017).

Apesar da vantagem previamente citada, a anfotericina B lipossomal ainda apresenta como via de administração a parenteral, que gera custos de hospitalização e desconforto aos pacientes. A fim de evitar tais inconvenientes, as vias de administração oral e tópica são grandes aliadas ao conforto do paciente. Todavia, é relatado por Bruni *et al.* (2017) que apesar de atraente, o tratamento da leishmaniose com formulações orais pode conduzir ao uso indevido pelos pacientes, devido à falta de supervisão. Por consequência, aumentando o risco de resistência e propagação destes parasitos resistentes.

Além disso, tratamentos sistêmicos vêm com potenciais efeitos colaterais e adversos. Portanto, a aplicação tópica é o modo preferido devido à maior adesão e satisfação

do paciente em patologias que envolvam a pele (GUPTA *et al.*, 2013). Apesar da abordagem tópica para o tratamento da leishmaniose cutânea localizada ser atrativa, uma das maiores dificuldades é que os amastigotas de *Leishmania* se encontram no fagolisossoma do macrófago infectado, que se encontra localizado profundamente na camada dérmica, fatores estes que dificultam a penetração e a concentração terapêutica local das drogas (FERREIRA *et al.*, 2004; JAAFARI *et al.*, 2009; KALANTARI *et al.*, 2014). Igualmente, a pele forma uma barreira para o ambiente externo e é impermeável às drogas devido à coesão das células epidérmicas (GLASGOW *et al.*, 1979; GUPTA *et al.*, 2013; MINAMI; MASUDA, 1968).

Logo, a nanotecnologia veio como um grande ganho para formulações tópicas, pois nanocarreadores são capazes de: i) modificar a permeação do fármaco através da pele; ii) aumentar o período de permanência do fármaco na pele; iii) proporcionar entrega direcionada; iv) proteger o fármaco contra instabilidade química ou física e v) liberar o fármaco de forma controlada (DU PLESSIS; WEINER; MÜLLER, 1994; FERREIRA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2013; HONZAK; SENTJURC; SWARTZ, 2000).

Ademais, o ganho ofertado pelos sistemas nanoparticulados estão relacionados às suas características, dentre eles o tipo de material empregado para a sua produção e o tamanho das partículas obtidas. No caso de formulações tópicas, nanocarreadores lipídicos são vantajosos devido à sua semelhança com a membrana natural das células (JAAFARI *et al.*, 2009). Da mesma forma que, partículas de menor tamanho são mais vantajosas, tendo em vista que os folículos pilosos e as glândulas sebáceas também possam desempenhar um papel no transporte através da pele (HONZAK; SENTJURC; SWARTZ, 2000).

Para avaliar o sucesso de uma terapia empregada no tratamento da leishmaniose cutânea são empregados parâmetros que avaliam desde a lesão local (diâmetro e carga parasitária) até possíveis envolvimentos sistêmicos (carga parasitária no baço, fígado e linfonodos) (LAGE *et al.*, 2016). Com base nestes parâmetros, pesquisadores demonstraram que uma formulação tópica lipossomal, contendo paromomicina encapsulada, mostrou efeito sobre o curso geral da infecção (diminuição de parasitos nos baços de camundongos tratados, quando comparados ao controle), este achado foi associado à possibilidade que nanocarreadores têm de atuarem como um veículo transdérmico, levando a paromomicina desde a superfície do estrato córneo até alcançar a corrente sanguínea na derme (JAAFARI *et al.*, 2009; KALANTARI *et al.*, 2014).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são transportadores coloidais, submicrométricos, que são compostos de lipídeos fisiológicos, dispersos em água ou em solução aquosa de surfactante. Estes transportadores surgem como uma nova geração de emulsões lipídicas de tamanho submicrométrico, onde o lipídeo líquido foi substituído por um lipídeo sólido (MUKHERJEE; RAY; THAKUR, 2009). As NLS foram desenvolvidas no início dos anos 90 como um sistema carreador alternativo às emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, pois reúnem em sua estrutura as principais vantagens encontradas nesses sistemas (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SCHAFERKORTING; MEHNERT; KORTING, 2007).

Similar às nanopartículas poliméricas, a matriz sólida das nanopartículas lipídicas sólidas protege os fármacos encapsulados contra degradação química, além de modular sua velocidade de liberação. E, da mesma forma que as emulsões e lipossomas, as NLS são compostas por substâncias fisiologicamente bem toleradas que já possuem aprovação para aplicação farmacológica em seres humanos (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; SCHAFERKORTING; MEHNERT; KORTING, 2007). Além disso, SLN oferecem propriedades únicas, como grande área de superfície, alta carga de drogas e seu tamanho pequeno faz com que apresentem potencial para aumentar a penetração cutânea de fármacos, devido às propriedades de adesividade e oclusão de partículas pequenas (MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000).

#### 2.4 COMBINAÇÕES DE DROGAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

As dificuldades no tratamento das várias formas clínicas de leishmaniose e a propagação da resistência às drogas levaram à tendência atual de utilizar a terapia combinada de fármacos, assim como ocorreu em outras doenças infecciosas (TRINCONI *et al.*, 2014). Na leishmaniose, diversas combinações foram testadas e se mostram vantajosas principalmente quando estes fármacos pertencem a diferentes classes químicas. Por exemplo, um esquema terapêutico mais curto combinando estibogluconato de sódio (SSG) e paromomicina foi testado na África e mostrou ser tão eficaz como um esquema mais longo de SSG sozinho (MUSA *et al.*, 2012). Outrossim, uma combinação multidroga pode não conduzir melhora na eficácia, mas traz outras vantagens como efeitos adversos menos frequentes e menor gravidade da patologia (SUNDAR *et al.*, 2011).

Outro estudo envolvendo 32 pacientes com leishmaniose cutânea recorrente, realizado no Irã, utilizou de terapia combinada (alopurinol e antimoniato de meglumina) e obteve uma taxa de cura de 87,5% (28 dos 32 pacientes). Além de altamente eficaz, a combinação foi bem tolerada pelos pacientes e efeitos clínicos adversos não foram observados (ESFANDIARPOUR; DABIRI, 2007). Desta forma, a combinação de fármacos se faz essencial no tratamento antimicrobiano e conduz a diversas vantagens para o sucesso da terapia, pois: aumenta a atividade através do uso de compostos com atividade sinérgica ou aditiva, pois aumenta o espectro de atividade; reduz as doses necessárias, de forma que reduz as chances de efeitos colaterais tóxicos e os custos da hospitalização (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; DE MENEZES *et al.*, 2015).

No entanto, a combinação de drogas na leishmaniose, apesar de vantajosa, pois os fármacos apresentam diferentes mecanismos de ação, ou seja, apresentam diferentes alvos nos parasitos, a preocupação com o surgimento de resistência já se faz presente (TRINCONI *et al.*, 2014). Um estudo realizado em 2012, utilizando um processo de adaptação gradual *in vitro*, mostrou que mesmo em um conjunto de terapias combinadas (anfotericina B / miltefosina, anfotericina B / paromomicina, anfotericina B / antimonial trivalente (Sb<sup>III</sup>), miltefosina/ paromomicina e Sb<sup>III</sup> / paromomicina) houve o surgimento de cepas (*L.donovani*) resistentes (um e quatro meses após a remoção da pressão dos medicamento) (GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Portanto, a busca de novas drogas alternativas úteis para tratar a leishmaniose ainda é necessária (TRINCONI *et al.*, 2014), principalmente quando estas substâncias podem ser utilizadas sem induzir resistência em microrganismos, como exemplo aquelas que induzem a síntese de espécies reativas de oxigênio (interagem com várias estruturas celulares, por múltiplos mecanismos) (BAPTISTA; WAINWRIGHT, 2011). Exemplo de combinação nesta linha é observado em estudos empregando paromomicina e cloreto de metilbenzetônio (substância com atividade antimicrobiana e antiprotozoário) (GONÇALVES *et al.*, 2005; KRAUSE; KROEGER, 1994; SANTOS *et al.*, 2008). Entretanto, cloreto de metilbenzetônio é tóxico e irritante provocando sensações ardentes que restringem seu uso em muitos casos, além disso é conhecido por causar de início aumento da lesão (GONÇALVES *et al.*, 2005; SOTO *et al.*, 1998).

#### 2.4.1 Clorito de Sódio ( $\text{NaClO}_2$ )

Lesões cutâneas estão sempre em risco de infecção microbiana, especialmente em casos crônicos, a exemplo da leishmaniose cutânea localizada. Dessa maneira, a cronicidade da úlcera associada a outros fatores como a constante exposição no ambiente hospitalar, a falta de higiene no local da lesão, a proximidade ao solo, em lesões localizadas nos membros inferiores (mais afetados), facilitam a colonização polimicrobiana (SALGADO *et al.*, 2016). Um estudo realizado no México documentou infecções secundárias em lesões de LCL, dentre os micro-organismos encontrados estavam *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii* e *Enterococcus durans* (ISAAC-MÁRQUEZ; LEZAMA-DÁVILA, 2003). A incidência de infecção secundária em lesões de LCL varia de 23,6 - 81% (ANTONIO *et al.*, 2017).

O grande problema da ocorrência de infecção secundária nas lesões de LCL é que além de demandarem o uso de antibióticos, este problema retarda o tempo de cicatrização da ferida, os quais associados conduzem a um tratamento ainda mais dispendioso (ISAAC-MÁRQUEZ; LEZAMA-DÁVILA, 2003; SALGADO *et al.*, 2016). Ademais, estudos mostram que pacientes com LCL, ao apresentarem infecção bacteriana secundária, apresentaram taxas de cura mais baixas para o tratamento sistêmico com antimoniais pentavalentes, em comparação a pacientes que não apresentaram contaminação (ISAAC-MÁRQUEZ; LEZAMA-DÁVILA, 2003; SADEGHIAN *et al.*, 2011).

De fato, a rápida cicatrização da úlcera na leishmaniose cutânea localizada é altamente desejável (STAHL *et al.*, 2014). Para isto, uma boa alternativa seria a associação de um tratamento sistêmico com um tratamento local. A propósito, as terapias tópicas devem ser conduzidas não apenas para eliminar o parasito, mas também para promover o cuidado e a reepitelização da ferida, sem formação de cicatrizes, bem como prevenir a super-infecção das lesões por outros microrganismos (bactérias, fungos – infecções secundárias) (HONZAK; SENTJURC; SWARTZ, 2000).

Diante destes problemas envolvidos no curso do tratamento das feridas de leishmaniose cutânea, uma terapia local que auxilie na rápida cicatrização, de forma geral, se faz necessária. Desta forma, preparações farmacêuticas à base de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) representam uma estratégia promissora, considerando os efeitos antimicrobianos deste composto bem como sua capacidade de promover regeneração tecidual e cicatrização de feridas (JEHRAN *et al.*, 2014).



Ensaios *in vivo* mostram que as reações de clorito com análogos da proteína heme bacteriana podem produzir hipoclorito, que por sua vez pode reagir com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para formar oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), ou que podem dismutar a  $\text{Cl}^-$  e  $^1\text{O}_2$  (STAHL *et al.*, 2014). Espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas na patologia e fisiologia da cicatrização de feridas (STAHL *et al.*, 2014), onde nas concentrações acima de  $10^{-4}$  M são citotóxicas. Contudo, EROs nas concentrações abaixo de  $10^{-5}$  promovem proliferação celular e reparo de tecidos (MIGDAL; SERRES, 2011).

Em 2014, um ensaio controlado randomizado mostrou que o grupo tratado com um creme, composto por um medicamento à base de clorito de sódio (DAC-N055), apresentou um tempo de fechamento da ferida significativamente mais curto do que o grupo que recebeu stibogluconato de sódio (SSG) intradérmico (STAHL *et al.*, 2014). Acrescenta-se também, que pacientes acometidos com leishmaniose lupóide cutânea (rara, desfigurante e resistente) tratados com DAC-N055 foram completamente curados e sem a formação de cicatrizes desfigurantes (STAHL; SAKHAYEEE, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial da associação entre Anfotericina B e Clorito de sódio (Anf-B/NaClO<sub>2</sub>) como base para um novo tratamento da LTA a partir de nanoformulações de uso tópico contendo esses agentes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade da Anf-B e do NaClO<sub>2</sub> sobre formas promastigotas axênicas de *L. braziliensis* para determinação do IC<sub>50</sub> destes compostos;
- Avaliar o efeito da combinação Anf-B/NaClO<sub>2</sub> sobre formas promastigotas axênicas de *L. braziliensis* pelo método de proporções fixas modificado;
- Avaliar o efeito da Anf-B e do NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) para a determinação da CC<sub>50</sub> dos compostos;
- Determinar o índice de seletividade da Anf-B e do NaClO<sub>2</sub> em promastigotas;
- Avaliar os efeitos da combinação destes agentes sobre formas amastigotas de *L. braziliensis* em macrófagos peritoneais;
- Desenvolver formulações tópicas contendo NaClO<sub>2</sub> e Anf-B, esta veiculada em nanopartículas lipídicas sólidas;
- Avaliar o perfil de liberação da Anf-B a partir das formulações desenvolvidas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL E REAGENTES

Meio de cultivo Schneider (LGC Biotecnologia), soro fetal bovino inativo (Cultilab), anfotericina B-Fungizone® (ThermoFischer), anfotericina B insumo (Valdequímica), Alamar Blue® (Invitrogen), DMSO (Serva); penicilina-estreptomicina, meio de cultivo DMEM, Tripsina – EDTA foram adquiridos da GIBCO (Carlsbad, EUA); tioglicolato, clorito de sódio e galato de propila foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (São Paulo, BR). Água purificada (Milli-Q) foi utilizada nos ensaios.

### 4.2 PARASITOS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As formas promastigotas de *Leishmania Viannia braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) utilizadas neste trabalho foram cultivadas, *in vitro*, em frasco de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Inc.), contendo meio líquido Schneider completo [suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico, penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL)]. As células foram incubadas a 26°C e repicadas semanalmente para manutenção da viabilidade celular. Para utilizações futuras, células ainda em fase logarítmica (log) de crescimento foram criopreservadas. Para isso, quantidade suficiente da cultura *in vitro* foi centrifugada em salina, de forma a obter 10<sup>7</sup> promastigotas/mL em solução de SFB contendo 10% de DMSO – agente crioprotetor, o volume de 1 mL da solução contendo os parasitos foi distribuído em criotubos. O material foi acondicionado em container contendo álcool isopropílico (Mr. Frosty Nalgene®) armazenado em freezer a – 80°C.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DO IC<sub>50</sub> DO CLORITO DE SÓDIO (NaClO<sub>2</sub>) E DO FUNGIZONE® (ANF-B) SOBRE A VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS*

Promastigotas em fase logarítmica de crescimento (4x10<sup>6</sup> parasitos/poço), semeadas em microplacas de cultura celular de 96 poços, em meio Schneider completo, foram tratadas com diferentes concentrações da solução aquosa de NaClO<sub>2</sub> (1.000µM a 0,49µM) e Anf-B (10µM a 0,005µM), a partir de diluição seriada, razão 2. As placas foram incubadas por 72 h a 26°C e após tratamento, o efeito destas drogas sobre o crescimento dos parasitos foi avaliado por solução de resazurina (Alamar Blue®), que foi adicionado aos poços na relação

de 10% v/v (volume final 200  $\mu$ L) para quantificar a viabilidade celular (mitocôndrias de células viáveis reduzem a resazurina - azul a resorufina - rosa), que foi mensurada por fluorimetria (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). As placas foram incubadas durante 4h a 26°C. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi determinada utilizando os seguintes comprimentos de ondas: 570 e 600nm. A intensidade de fluorescência foi utilizada para o cálculo da viabilidade celular. Foram realizados três experimentos independentes, com as amostras testadas em triplicata. A concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da intensidade de fluorescência em relação ao controle (parasitos não tratados, considerando 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão não-linear no GraphPad Prism 5.0.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE COMBINAÇÃO ENTRE ANF-B/ NaClO<sub>2</sub> SOBRE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS*

Os experimentos para avaliar o tipo de interação entre NaClO<sub>2</sub> e anfotericina B *in vitro* (promastigotas de *Leishmania braziliensis* em fase log de crescimento), foram realizados com base em uma adaptação do método do isoblograma de proporções fixas modificado (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos experimentos com cada fármaco, isoladamente, foram utilizados para determinar as concentrações iniciais de NaClO<sub>2</sub> e anfotericina B a serem usadas nos experimentos de combinação. A análise dos efeitos combinados foi realizada determinando o índice de combinação (IC), usado como ponto de corte (*cutoff*) para determinar possíveis efeitos de sinergismo, aditivo ou antagonismo utilizando o método de Chou-Talalay (CHOU; TALALAY, 1984). As concentrações iniciais de clorito de sódio e anfotericina B, definidas a partir do IC<sub>50</sub>, foram usadas para o preparo de soluções contendo ambos os fármacos, sempre em proporções fixas, numa razão de 5:1, 1:1 e 1:5 (tabela 4).

Os resultados foram analisados utilizando o método de FICs. Este método considera a IC-50 de cada fármaco isoladamente e sua proporção na combinação. A classificação da natureza da interação foi feita através do somatório das FICs; se  $\leq 0,5$  indicou sinergismo;  $>4$ , antagonismo, se entre 0,5 e 4, efeito aditivo.

**Tabela 4.** Proporções de clorito de sódio e anfotericina B utilizadas no experimento de combinação *in vitro* – Método de proporções fixas adaptado.

<b>Mistura 1</b> <b>(5A:1B)</b>	<b>Mistura 2</b> <b>(1A:1B)</b>	<b>Mistura 3</b> <b>(1A:5B)</b>
50 $\mu\text{M}$ A+	10 $\mu\text{M}$ A+	2 $\mu\text{M}$ A+
10 $\mu\text{M}$ B	10 $\mu\text{M}$ B	10 $\mu\text{M}$ B
25 $\mu\text{M}$ A+	5 $\mu\text{M}$ A+	1 $\mu\text{M}$ A+
5 $\mu\text{M}$ B	5 $\mu\text{M}$ B	5 $\mu\text{M}$ B
12,5 $\mu\text{M}$ A+	2,5 $\mu\text{M}$ A+	0,5 $\mu\text{M}$ A+
2,5 $\mu\text{M}$ B	2,5 $\mu\text{M}$ B	2,5 $\mu\text{M}$ B
6,25 $\mu\text{M}$ A+	1,25 $\mu\text{M}$ A+	0,25 $\mu\text{M}$ A+
1,25 $\mu\text{M}$ B	1,25 $\mu\text{M}$ B	1,25 $\mu\text{M}$ B
3,12 $\mu\text{M}$ A+	0,62 $\mu\text{M}$ A+	0,12 $\mu\text{M}$ A+
0,62 $\mu\text{M}$ B	0,62 $\mu\text{M}$ B	0,62 $\mu\text{M}$ B
1,56 $\mu\text{M}$ A+	0,31 $\mu\text{M}$ A+	0,062 $\mu\text{M}$ A+
0,31 $\mu\text{M}$ B	0,31 $\mu\text{M}$ B	0,31 $\mu\text{M}$ B
0,78 $\mu\text{M}$ A+	0,16 $\mu\text{M}$ A+	0,031 $\mu\text{M}$ A+
0,16 $\mu\text{M}$ B	0,16 $\mu\text{M}$ B	0,16 $\mu\text{M}$ B
0,39 $\mu\text{M}$ A+	0,08 $\mu\text{M}$ A+	0,015 $\mu\text{M}$ A+
0,08 $\mu\text{M}$ B	0,08 $\mu\text{M}$ B	0,08 $\mu\text{M}$ B

Para a utilização do modelo de proporções fixas foram realizados 8 pontos de diluições, em séries de 1:2. A: Clorito de sódio; B: Anfotericina B.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NaClO<sub>2</sub> E DA ANF-B SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEIAS MURINOS E CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

Os macrófagos foram obtidos por injeção intraperitoneal de 1 mL de tioglicolato 3% em camundongos BALB/c. Após 96 h, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada com 10 mL de meio DMEM gelado (ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008). O lavado peritoneal foi centrifugado (1200 rpm, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em meio DMEM completo [suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico, penicilina (10.000 U/mL) - estreptomicina (10.000 µg/mL)]. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer com o auxílio do corante azul de tripan. Após ajuste de concentração para  $5 \times 10^4$  macrófagos/poço, as células foram incubadas em placa de 96 poços a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, para aderência dos macrófagos aos poços. Em seguida, os poços foram lavados com salina estéril, para remover células não aderidas. Após lavagem dos poços, os macrófagos aderidos à placa foram incubados na presença da solução de clorito de sódio, em concentrações correspondentes a 5.000 µM até 2,44 µM, razão 2, diluídas em um volume final de 200 µL de meio DMEM completo. As concentrações de Anf-B foram de 50 µM a 0,024 µM, nas mesmas condições do NaClO<sub>2</sub>. Os macrófagos permaneceram expostos às drogas durante 72 h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após esse período, 10% de Alamar Blue ® foram adicionados aos poços de volume final 200 µL e as placas foram reincubadas por 6 h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após este período, a absorbância do reagente foi medida nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm usando espectrofotômetro. A concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de Alamar Blue®, calculada por análise de regressão. A citotoxicidade para macrófagos peritoneais e para promastigotas foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DO NaClO<sub>2</sub> E ANF-B SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)

Para investigar a citocompatibilidade das drogas em estudo sobre células da pele humana, a linhagem utilizada foi HaCaT (queratinócitos imortalizados humanos), cultivados em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, contendo meio DMEM completo e mantidos em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cada ensaio realizado, as garrafas utilizadas apresentavam aderência de aproximadamente 90% e eram tripsinizadas com 5 mL de tripsina-EDTA

(0,25%) por 5 minutos em estufa, em seguida 10 mL de DMEM era adicionado para neutralizar a ação da tripsina, essa suspensão de células foi levadas para centrifuga (1500 rpm/5min) e o pellet recuperado foi ressuspensão em 1000 µL de DMEM. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer com o auxílio do corante vital azul de tripan. Após ajuste de concentração para  $5 \times 10^4$  queratinócitos/poço, as células foram incubadas em placa de 96 poços a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h, para aderência dos queratinócitos aos poços. Em seguida, os poços foram lavados com salina estéril, para remover células não aderidas. Após lavagem dos poços, os queratinócitos aderidos à placa foram incubados na presença da solução de clorito de sódio, em concentrações correspondentes a 5.000 µM até 2,44 µM, razão 2, diluídas em um volume final de 200 µL de meio DMEM completo. As concentrações de Fungizone® foram de 50 µM a 0,024 µM, nas mesmas condições do NaClO<sub>2</sub>. Os queratinócitos permaneceram expostos às drogas durante 72 h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após esse período, 10% de Alamar Blue ® foram adicionados aos poços de volume final 200 µL e as placas foram reincubadas por 4 h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Após este período, a absorbância do reagente foi medida nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm usando espectrofotômetro. A concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de Alamar Blue®, calculada por análise de regressão.

#### 4.7 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS INDUZIDAS PELO NaClO<sub>2</sub> EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS*

As formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram coletadas a partir de uma cultura em fase logarítmica de crescimento, cultivadas e tratadas em placas de 6 poços, onde a concentração final de parasitos foi ajustada para  $1,0 \times 10^6$  leishmanias/mL em 5 mL, por poço. Para análise da ação da droga sobre os parasitos, o tratamento com o clorito de sódio foi feito na concentração de 14 µM, diluído em meio de cultura líquido Schneider completo. Cada grupo (24, 48 e 72 h de tratamento) tinha quatro poços, de forma que a concentração final de promastigotas para cada grupo fosse de aproximadamente  $2,0 \times 10^7$  (concentração que gera pellet visível da forma promastigota). Como controle, foram mantidas formas promastigotas não tratados na mesma concentração e condições de tempo e temperatura (26°C). As formas amastigotas axênicas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram coletadas, a partir de uma cultura a aproximadamente 30 h de incubação, cultivadas e tratadas

em placas de 6 poços, onde a concentração final de parasitos foi ajustada para  $2,0 \times 10^6$  leishmanias/mL em 5 mL, por poço. Para análise da ação da droga sobre os parasitos, o tratamento com o  $\text{NaClO}_2$  foi feito na concentração de  $14 \mu\text{M}$ , diluído em meio de cultura líquido Schneider completo, pH 5,5. Cada grupo (controle e 24 h de tratamento) tinha quatro poços, de forma que a concentração final de amastigotas para cada grupo fosse de aproximadamente  $4,0 \times 10^7$  (concentração que gera pellet visível da forma amastigota). Como controle, foram mantidas formas amastigotas não tratadas na mesma concentração e condições de tempo e temperatura ( $37^\circ\text{C}$ ). As amostras foram coletadas para análise, nos tempos pré-determinados de tratamento, em tubos Falcon e foram centrifugadas a 3000 rpm/10 min/  $4^\circ\text{C}$  (promastigotas) e a 2000 g/10 min/  $25^\circ\text{C}$  (amastigotas axênicas), o pellet foi ressuspensão em salina estéril (2x) e novamente centrifugado, nas mesmas condições e, por fim, o pellet formado foi ressuspensão em  $1500 \mu\text{L}$  de fixador Karnovsky. Posteriormente as amostras foram processadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

#### 4.7.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para microscopia eletrônica de varredura, as formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania (V.) braziliensis* foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  e 2000 g por 10 min a  $25^\circ\text{C}$ , respectivamente. O sobrenadante foi descartado, e em seguida o material foi lavado por 2 vezes com PBS. Após a retirada do sobrenadante, as células foram fixadas por 1 h, a temperatura ambiente, em solução de glutaraldeído a 2,5% e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 3 vezes, em temperatura ambiente. As amostras foram então adicionadas em lamínulas de vidro (18 x 18 mm) previamente recobertas com poli-L-lisina para adesão dos parasitos. As amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 30 min à temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi realizada desidratação em série com etanol absoluto em concentrações crescentes a 30%, 50%, 70%, 90% e 100% (3 vezes), por 10 min cada etapa. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico, montadas em stubs, metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol® JSM -6390LV.



#### 4.7.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min a 4°C e 2000 g por 10 min a 25°C, respectivamente. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes em PBS e fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,5 %, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4 °C por 24 h. As amostras foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas por 1 h, protegidas da luz, em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio a 5mM em tampão cacodilato a 0,2 M, pH 7,4. As amostras foram lavadas por 3 vezes, em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 e em seguida, submetidas à desidratação em série de acetona em concentrações crescentes a 30%, 50%, 70%, 90%, 100% (duas vezes) e super-seca, por 10 min cada etapa. Após a desidratação as células foram lentamente embebidas em resina PolyBed 812®, em TA e agitação lenta constante, por 24 horas, diluídas em acetona super-seca na seguinte proporção 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 (resina: acetona super-seca). Em seguida, o material foi colocado em resina pura 24 h e depois em formas de silicone para polimerização a 60 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram realizados no ultramicrotomo Leica® EM UC7 e posteriormente contrastados com acetato de uranila a 6,0% e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas e as imagens adquiridas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® JEM-1230 operando a 80 kV.

#### 4.8 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DO NaClO<sub>2</sub> E DA ANF-B – EM MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA – SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS*

Os macrófagos peritoneais obtidos conforme descrito no item 4.4 foram cultivados na proporção de  $2 \times 10^5$  células por poço, em um volume de 500 µL de meio DMEM completo, em placas de 24 poços contendo lamínulas de cultura de tecidos de 13 mm estéreis. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C para adesão das células aos poços. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes com salina estéril e os macrófagos aderidos foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* na fase estacionária de crescimento (previamente lavadas três vezes com salina estéril), na proporção de 10 parasitos para cada macrófago em um volume final de 500 µL de meio DMEM completo. As placas foram, então, incubadas por 24 horas em

estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas duas vezes com salina estéril a fim de retirar as formas promastigotas livres e os macrófagos infectados foram incubados com meio contendo os tratamentos em diferentes concentrações, em volume final de 1000 µL: NaClO<sub>2</sub> (3,5; 7,0; 14; 28; 42; 50; 100; 300; 400; 600 µM) ou Anf-B (0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 µM) por 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Ademais, foi avaliado também o efeito combinado de ambas as drogas, por 72 h, nas seguintes concentrações clorito de sódio/Anfotericina B, respectivamente: 400/0,01µM; 600/0,05µM; 600/0,01µM. Como controle, foram mantidos macrófagos infectados não tratados. Após os tempos de incubação, o sobrenadante foi retirado, os poços foram lavados duas vezes com salina estéril e fixados com 400 µL de paraformaldeído 4% por 20 minutos. Posteriormente, as lamínulas de cada poço foram retiradas e coradas em lâminas contendo 15 µL de meio de montagem *homemade* (18 mL de glicerol; 2 mL de PBS; 0,424 g de *Propyl gallate*) contendo DAPI a 2,5 %. Foi realizada a contagem de 200 macrófagos por poço para calcular a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago, a partir dos quais a atividade das drogas foi determinada em relação a culturas não tratadas.

#### 4.9 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DO NaClO<sub>2</sub> SOBRE A VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS*

##### 4.9.1 *Padronização do cultivo de amastigotas axênicas de Leishmania (V.) braziliensis*

A cultura de amastigotas axênicas foi obtida à partir de uma cultura em fase logarítmica final de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* de modo que a concentração final da cultura fosse de 2,0 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL. O cultivo foi feito em meio Schneider, pH 5,5 e suplementado com 20% SFB, e mantidas a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C. O segundo dia da cultura foi escolhido para ser realizado o ensaio de citotoxicidade, uma vez que apresentava já apresentava toda *leishmania* na forma amastigotas.

##### 4.9.2 *Ensaio de citotoxicidade do clorito de sódio sobre amastigotas axênicas de Leishmania (V.) braziliensis*

As formas amastigotas axênicas foram semeadas em placas de 24 poços, em concentração de 10<sup>6</sup> amastigotas/poço, em meio definido para sua manutenção, e incubadas por 24 horas na presença de diferentes concentrações (50µM; 100 µM; 200 µM; 400 µM; 600 µM) do composto a ser testado a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, amastigotas em meio Schneider, pH

5,5, foram utilizadas como controle. O efeito da droga sobre a viabilidade dos parasitos foi avaliado por solução de resazurina (Alamar Blue®), que foi adicionado aos poços na relação de 10% v/v (volume final 1000 µL) para quantificar a viabilidade celular, que foi mensurada por fluorimetria (SpectraMax® 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### 4.10 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES TÓPICAS

##### 4.10.1 *Preparo das suspensões contendo Anf-B em nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)*

O sistema nanoparticulado foi preparado pelo método de microdiluição à quente do tensoativo, co-tensoativos e fase oleosa (composto por um blend de lipídeo líquido e sólido). Utilizou-se como ativo o insumo farmacêutico Anfotericina B (North China Pharmaceutical Huasheng (Hong Kong, China) na proporção de 0,1%. O teor de anfotericina B foi de  $0,84 \pm 0,02$  mg/mL. O sistema nanoparticulado apresentou tamanho médio de  $129 \pm 8$  nm, índice de polidispersão de  $0,44 \pm 0,02$  nm e potencial zeta de  $-42 \pm 2$  mV. As NLS foram fornecidas pela Apis Flora Industrial e Comercial Ltda (Ribeirão Preto/SP).

##### 4.10.2 *Preparo das formulações semissólidas*

Três formas farmacêuticas foram produzidas: Gel hidrofílico contendo NLS de anfotericina B (GHNLS), gel hidrofílico de anfotericina B (GHAB), creme não-iônico contendo NLS de anfotericina B (CNLS), creme não-iônico de anfotericina B (CAB), pomada hidrofílica (CARBOWAX) contendo NLS de anfotericina B (PHNLS) e pomada hidrofílica (CARBOWAX) de anfotericina B (PHAB). O gel hidrofílico, o creme não-iônico e a pomada hidrofílica (CARBOWAX) foram preparados conforme adaptação da metodologia descrita por BOCHI (2010), e a dispersão das NLS de anfotericina B, bem como a solução de anfotericina B, as bases foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente por (FRANCO; BOCHI, 2013)). Os componentes das formulações (GHNLS / GHAB, CNLS / CAB e PHNLS / PHAB) encontram-se descritos nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

**Tabela 5.** Composição do GHNLS e do GHAB

Componentes	Quantidade	
	GHNLS	GHAB
Carbopol 940	0,75 g	0,75 g

<b>EDTA</b>	0,075 g	0,075 g
<b>Trietanolamina</b>	0,9 g	0,9 g
<b>Propilenoglicol</b>	7,6 ml	7,6 ml
<b>Nipagim</b>	0,15 g	0,15 g
<b>Água purificada</b>	6,5 ml	6,5 ml
<b>Suspensão de NLS (0,84 mg/ml)</b>	1,5 ml	-
<b>Solução de Anf-B em DMSO (0,84 mg/ml)</b>	-	1,5 ml

**Tabela 6.** Composição do CNLS e do CAB

<b>Componentes</b>	<b>Quantidade (%)</b>	
	<b>CNLS</b>	<b>CAB</b>
<b>Cera polowax</b>	18 g	18 g
<b>BHT</b>	0,075 g	0,075 g
<b>EDTA</b>	0,15 g	0,15 g
<b>Vaselina líquida</b>	9,06 g	9,06 g
<b>Nipagin/nipazol</b>	1,5 ml	1,5 ml
<b>Propilenoglicol</b>	15 g	15 g
<b>Miristato de isopropila</b>	3 g	3 g
<b>Água destilada</b>	10,3 ml	10,3 ml
<b>Suspensão de NLS (0,84 mg/ml)</b>	1,5 ml	-
<b>Solução de Anf-B em DMSO (0,84 mg/ml)</b>	-	1,5 ml

**Tabela 7.** Composição da PHNLS e da PHAB

Componentes	Quantidade (%)	
	PHNLS	PHAB
<b>Carbowax 4000</b>	5,91 g	5,91 g
<b>Carbowax 400</b>	4,6 ml	4,6 ml
<b>Propilenoglicol</b>	4,7 g	4,7 g
<b>Nipagin/nipazol</b>	0,15 ml	0,15 ml
<b>Suspensão de NLS (0,84 mg/ml)</b>	1,5 ml	
<b>Solução de Anf-B em DMSO (0,84 mg/ml)</b>		1,5 ml

Todas as formulações anteriormente descritas foram preparadas em duplicatas e acondicionadas em potes de vidro, semipermeável, com tampa rosqueável e armazenados em armários ao abrigo da luz (BRASIL, 2005; ORIQUI;MORI; WONGTSCHOWSKI, 2013), para posterior caracterização e estudo de estabilidade.

#### 4.11 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

As preparações semissólidas foram avaliadas quanto a estabilidade em temperatura média de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa média de  $75\% \pm 2^{\circ}\text{C}$  (BRASIL, 2005; ORIQUI;MORI; WONGTSCHOWSKI, 2013). Devido às condições de armazenamento, posteriores avaliações dos parâmetros abaixo estabelecidos, deverão ser feitas a cada 3 meses no primeiro ano de validade; a cada 6 meses no segundo ano, de forma a confirmar validade de 2 anos dos produtos (ORIQUI; MORI; WONGTSCHOWSKI, 2013).

Os ensaios analíticos fazem parte do controle de qualidade e têm como objetivo verificar a conformidade dos materiais ou produtos frente às especificações estabelecidas, para tanto, ensaios organolépticos (aspecto, cor, odor) e ensaios físico-químicos (determinação de pH, condutividade elétrica, determinação de densidade e teste de centrífuga) foram e serão realizados em tempos pré-determinados (0, 3, 7 e 14 dias) e (3, 6, 9, 12, 18, 24) (BRASIL, 2007).

##### 4.11.1 *Ensaio organolépticos*

Procedimentos utilizados para avaliar as características de um produto, detectáveis pelos órgãos dos sentidos: aspecto, cor, odor, sabor e tato.

#### 4.11.1.1 Aspecto

Observou-se visualmente se as amostras em estudo (GHNLS / GHAB, CNLS / CAB e PHNLS / PHAB) mantiveram as mesmas características macroscópicas das suas respectivas amostras de referência (gel hidrofílico, creme não-iônico e pomada hidrofílica), na mesma quantidade, ou se ocorreram alterações do tipo separação de fases, precipitação e turvação, por exemplo.

#### 4.11.1.2 Cor

A análise da cor (colorimetria) foi realizada por meio visual, comparando-se visualmente a cor da amostra com a cor das amostras padrão de referência (ausentes de Anf-B), que foram armazenadas em frascos da mesma especificação. A análise foi realizada sob condições de luz branca natural.

#### 4.11.1.3 Odor

As amostras e as amostras de referência, acondicionadas no mesmo material de embalagem, tiveram seus odores comparados diretamente através do olfato.

### 4.11.2 Ensaios físico-químicos

São operações técnicas que consistem em determinar uma ou mais características de um produto, com o auxílio de equipamentos, de acordo com um procedimento especificado.

#### 4.11.2.1 Determinação de Ph

Determinou-se o pH (A. Científica/Edutec) utilizando-se uma solução de 10% (m/v), obtida pela dispersão de 1 g das formulações em 10 mL de água milli-q com o auxílio de vórtex (BRASIL, 2007; SIQUEIRA, 2016). Todas as medidas foram realizadas em duplicata e uma média foi obtida a cada dia pré-determinado no estudo de estabilidade.

#### 4.11.2.2 Condutividade elétrica

Determinou-se a condutividade elétrica (HI763100 / HANNA instruments) utilizando-se uma solução de 10% (m/v), obtida pela dispersão de 1 g das formulações em 10 mL de água milli-q com o auxílio de vórtex (SIQUEIRA, 2016). Todas as medidas foram realizadas em duplicata e uma média foi obtida a cada dia pré-determinado no estudo de estabilidade.

#### 4.11.2.3 Determinação de densidade

A densidade aparente das amostras ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) foram medidas através da relação direta entre uma massa conhecida ( $\sim 5$  g) e seu respectivo volume específico, medido em proveta graduada.

#### 4.11.2.4 Teste de centrífuga

A fim de determinar qualquer sinal de instabilidade, indicativa de necessidade de reformulação, o teste de centrífuga foi realizado da seguinte maneira: as amostras foram submetidas a uma velocidade de 3000 rpm por 30 min em temperatura de  $25^\circ\text{C}$ , em seguida, foram analisados possíveis sinais indicativos de instabilidade das formulações. A análise foi realizada após 24 horas da obtenção das formulações (BRASIL, 2004).

### 4.12 ESTUDOS *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DA ANF-B A PARTIR DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

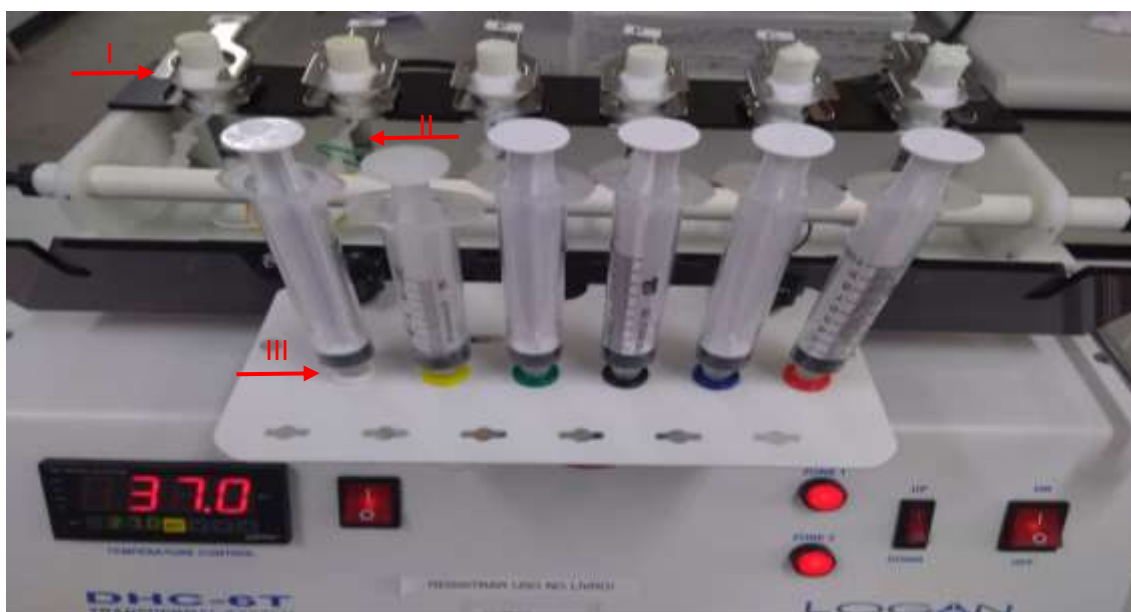
#### 4.12.1 Padronização de curva para quantificação de Anf-B por espectrofotometria

A concentração de Anf-B foi determinada por espectrofotometria UV (Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu UV-260) a 407 nm. A curva de calibração de Anf-B em tampão fosfato/2% DMSO (v/v) foi obtida na faixa de 0,19-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $r^2 = 0,9928$ ). Os valores de absorvância de cada alíquota dos tempos coletados foram utilizados para calcular os valores das concentrações de Anf-B em cada tempo de liberação do ensaio abaixo.

#### 4.12.2 Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação da Anf-B a partir das formulações desenvolvidas foi realizado em células de difusão do tipo Franz, constituída pelos compartimentos doador e receptor. O equipamento utilizado foi o DHC-6T Dry Heat Transdermal System (Logan Inst. Corp., EUA) (Figura 7). A câmara doadora e o compartimento receptor foram separados por uma membrana de diálise de MWCO 6-8 kDa MWCO 6-8 kDa (FRANCIS; GURUDEVAN; JAYAKRISHNAN, 2018). Uma quantidade de 5g de cada base foi inserida sobre o compartimento doador (Figura 7I). Quanto ao compartimento receptor (Figura 7II), a fraca solubilidade do fármaco em água e tampão (tampão fosfato, pH 7,4) exigiu 2% v/v de DMSO no meio para manter a condição *sink* ao longo do estudo, o que melhora a taxa de difusão do fármaco (HUSSAIN *et al.*, 2016). O estudo de liberação foi realizado sob agitação constante (100 rpm) a  $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante 12 h (MARCOLONGO, 2003). A amostragem foi

realizada a 0,5, 2, 4, 6, 8, e 12h pontos de tempo, seguida de substituição (Figura 7III), com volume igual (10 mL), de solução tampão fresca no compartimento receptor, partindo do princípio que o fármaco dissolvido deve ser removido do meio a fim de evitar acúmulo, de forma análoga ao que acontece no organismo (MARCOLONGO, 2003). As amostras foram analisadas utilizando espectrofotômetro UV-Vis a um máximo de 409 nm (UV-VIS Shimadzu UV-260) em duplicata. A quantidade de fármaco liberada foi calculada a partir da curva de calibração validada.



**Figura 7.** Equipamento contendo células do tipo Franz. I: compartimento doador; II: compartimento receptor; III: compartimento utilizado para adicionar e retirar o meio do compartimento receptor.

#### 4.13 ANIMAIS

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto Gonçalo Moniz – IGM (Protocolo N° 007/2015). Camundongos BALB/c foram mantidos no Biotério do IGM, sob condições adequadas de manejo técnico.



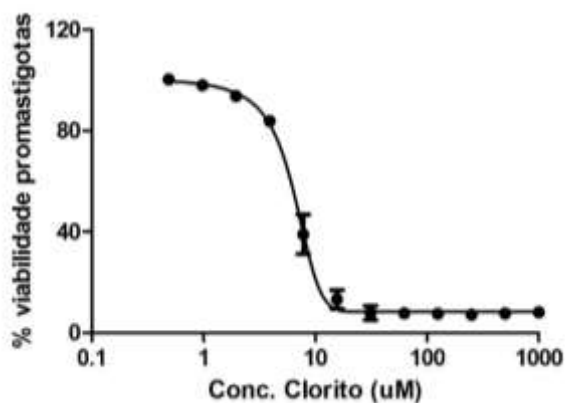
## 5 PROPOSTA DE ANÁLISE

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes, a depender dos dados obtidos. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis, sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . A concentração de inibição média ( $IC_{50}$ ) sobre a viabilidade intracelular do parasito e a concentração de citotoxicidade que implica em 50% da viabilidade celular ( $CC_{50}$ ) foi determinada a partir de regressão sigmoidal das curvas de concentração-resposta. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre o  $CC_{50}$  para Macrófagos peritoneais não infectados e o  $IC_{50}$  para a promastigota de *Leishmania braziliensis* ( $CC_{50} / IC_{50}$ ). As análises foram feitas no GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California).

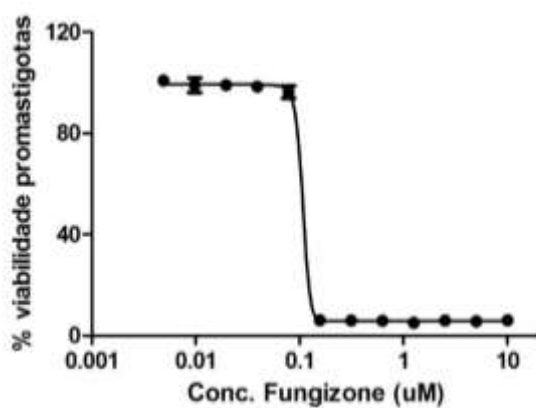
## 6 RESULTADOS

### 6.1 EFICÁCIA *IN VITRO* DO CLORITO DE SÓDIO ( $NaClO_2$ ) E FUNGIZONE® (ANF-B) SOBRE A INIBIÇÃO DA VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*

Os dados revelaram um claro efeito citotóxico do  $NaClO_2$  sobre promastigotas, com uma concentração efetiva média ( $IC_{50}$ ) de 9,66  $\mu M$  - intervalo de confiança de 95% (9,12-10,22  $\mu M$ ), este valor foi obtido da média de três ensaios independentes, considerado o desvio padrão, em triplicatas cada um (Figura 8), conforme determinado por regressão não-linear. A concentração efetiva média ( $IC_{50}$ ) do Fungizone foi de 0,11  $\mu M$  - intervalo de confiança de 95% (0,09-0,14  $\mu M$ ), valor obtido da média de três ensaios independentes, em triplicatas (Figura 9).



**Figura 8.** Efeito da solução de  $\text{NaClO}_2$  sobre formas promastigota de *Leishmania braziliensis* cultivadas durante 72 h nas concentrações de  $0,49 \mu\text{M}$  até  $1000 \mu\text{M}$ . O resultado médio do  $\text{IC}_{50}$  ( $9,66 \mu\text{M}$ ) foi obtido de 3 experimentos independentes.



**Figura 9.** Efeito do Fungizone sobre formas promastigota de *Leishmania braziliensis* cultivadas durante 72 h nas concentrações de  $0,005 \mu\text{M}$  a  $10 \mu\text{M}$ . O resultado médio do  $\text{IC}_{50}$  ( $0,11 \mu\text{M}$ ) foi obtido de 3 experimentos independentes.

Diante dos resultados positivos de eficácia de ambos os ativos sobre a inibição da viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis*, uma avaliação do perfil de combinação entre ambas as drogas foi realizado.

## 6.2 EFEITO ADITIVO DA ASSOCIAÇÃO *IN VITRO* ENTRE $\text{NaClO}_2$ e Anf-B

Para classificar a natureza da interação entre Anf-B/ $\text{NaClO}_2$  *in vitro*, utilizou-se a fração de concentração inibitória (FIC). FICs e a soma dos FICs ( $\sum \text{FICs}$ ) foram calculadas da seguinte forma:  $\text{FIC Anf-B} = \text{IC}_{50} \text{ Anf-B na combinação} / \text{IC}_{50} \text{ Anf-B em monoterapia}$ . A mesma equação foi aplicada ao  $\text{NaClO}_2$ . Esse cálculo foi feito para os valores obtidos para cada uma das diluições.  $\sum \text{FICs} = \text{FIC Anf-B} + \text{FIC NaClO}_2$ . A média do  $\sum \text{FICs}$  calculada foi usada para classificar a natureza da interação. Se entre  $0,3 - 0,7 =$  sinergismo;  $0,7 - 0,85 =$  sinergismo moderado;  $0,85 - 0,9 =$  ligeiramente sinérgico;  $0,9 - 1,1 =$  aditivo;  $> 1,1 =$  antagonismo.

Uma análise do cálculo do índice de combinação, que pode distinguir entre os efeitos sinérgicos, aditivos e antagonistas de dois compostos, confirmou que a combinação de clorito de sódio e Fungizone® resultou em um efeito aditivo sobre os promastigotas de *Leishmania V. braziliensis* (Tabela 8).

**Tabela 8.** Índices de combinação para atividade antileishmania por clorito de sódio e Fungizone® em promastigotas de *Leishmania V. braziliensis*.

Compostos	IC <sub>50</sub> (µM) Promastigotas		IC ± σ <sup>a</sup>
	Composto isolado	Combinação	
NaClO <sub>2</sub>	9,66	0,99	0,98±0,09
Fungizone	0,11	0,48	

<sup>a</sup>Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados utilizando concentrações em triplicatas e realizaram-se três ensaios independentes.

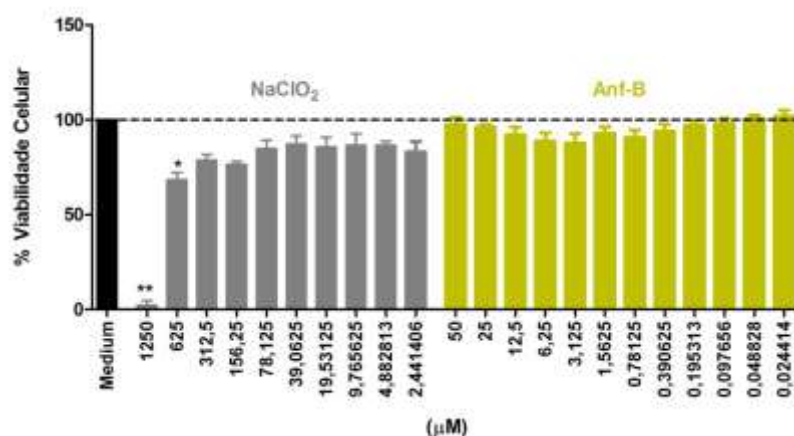
<sup>b</sup>Índice de combinação (IC). *Cutoff*: valor IC de 0,3-0,7 = sinergismo; 0,7-0,85 = sinergismo moderado; 0,85-0,9 = ligeiramente sinérgico; 0,9-1,1 = aditivo; > 1,1 = antagonismo. σ = desvio padrão.

Diante dos resultados de eficácia para ambas as drogas, em monoterapia e terapia combinada, testes de citocompatibilidade entre as drogas de células de murinos e humanas foi fundamental para a continuidade do trabalho. Tendo em vista que, a aplicação da formulação é por via tópica, citocompatibilidade sobre a linhagem celular de queratinócitos humanos foi também avaliada.

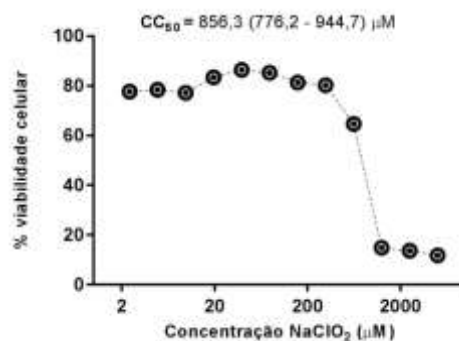
### 6.3 CITOCOMPATIBILIDADE DE NaClO<sub>2</sub> e Anf-B ISOLADOS SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS E SEUS RESPECTIVOS ÍNDICES DE SELETIVIDADE.

Os testes de citocompatibilidade celular, *in vitro*, utilizando macrófagos peritoneais de BALB/c, foram realizados por meio do ensaio colorimétrico com Alamar Blue®. As células foram incubadas com NaClO<sub>2</sub> ou com Anf-B por um período de 72 h. Após o tempo de tratamento, NaClO<sub>2</sub> apresentou redução da viabilidade celular a partir de 625 µM, onde foi capaz de reduzir 31,5% da viabilidade celular e o tratamento com Anf-B não apresentou redução de viabilidade estatisticamente significante (Figura 10).

Além disso, foi possível determinar a concentração citotóxica capaz de eliminar 50% das células ( $CC_{50}$ ). O resultado da citotoxicidade celular do  $NaClO_2$  apresentou um  $CC_{50}$  médio de 856,3  $\mu M$  (Figura 11), valores obtidos a partir da média de dois ensaios independentes. A concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de Alamar Blue®, calculada por análise de regressão. Os resultados de IS apresentados na Tabela 9 mostram que o  $NaClO_2$  e a Anf-B são 88,6 e >454,5 vezes menos tóxicos para as macrófagos peritoneais do que para as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, respectivamente.



**Figura 10.**  $NaClO_2$  e Anf-B são citocompatíveis com Macrófagos murinos. Macrófagos peritoneais foram tratados com  $NaClO_2$  e Fungizone por 72h. A viabilidade celular foi observada pelo percentual de redução de Alamar Blue. Barras representam  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais (\*\* $p < 0.001$  \* $p < 0.05$ ).



**Figura 11.**  $CC_{50}$  de  $NaClO_2$  sobre macrófagos murinos. Resultado da citotoxicidade do clorito de sódio sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c cultivados durante 72 h nas concentrações de 2,44  $\mu M$  a 5.000  $\mu M$ . Os ensaios foram realizados em triplicata e representam a média de 2 experimentos independentes.

**Tabela 9.** Valores de  $CC_{50}$  para macrófagos peritoneais e  $IC_{50}$  para formas promastigota de *Leishmania V. braziliensis* e os respectivos índices de seletividade (IS) do  $NaClO_2$  e Fungizone.

	Macrófago peritoneal $CC_{50}$	Promastigota $IC_{50}$	IS
$\mu M$			
$NaClO_2$	856,3	9,66	88,6
Fungizone	> 50	0,11	> 454,5

$CC_{50}$  = Concentração citotóxica para 50% dos macrófagos

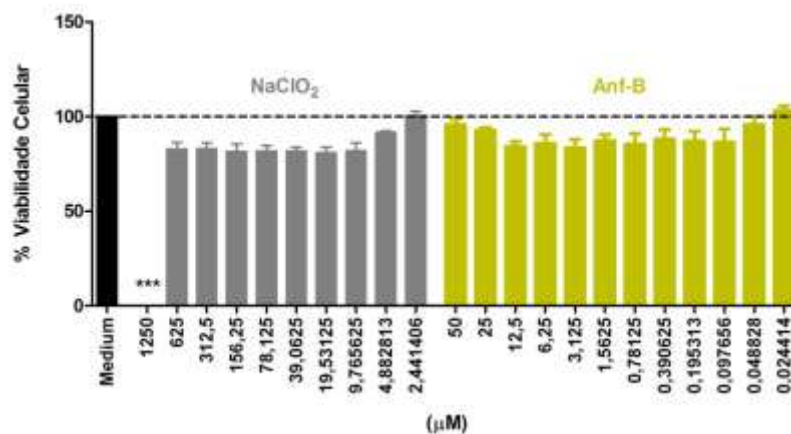
$IC_{50}$  = Concentração capaz de inibir em 50% o número de protozoários em cultura

IS =  $CC_{50}$  Macrófago Peritoneal /  $IC_{50}$  promastigot

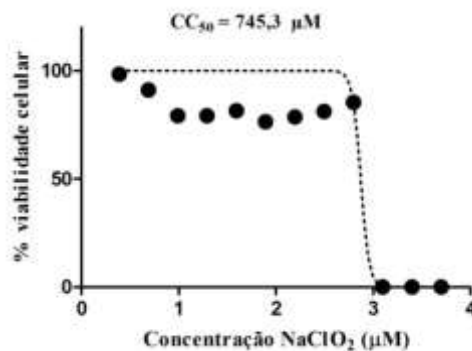
#### 6.4 CITOCOMPATIBILIDADE DO $NaClO_2$ e Anf-B ISOLADOS SOBRE QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCaT)

Os testes de citocompatibilidade celular, *in vitro*, utilizando linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT), foram realizados por meio do ensaio colorimétrico com Alamar Blue®. As células foram incubadas com  $NaClO_2$  ou com Anf-B por um período de 72 h. Após o tempo de tratamento,  $NaClO_2$  apresentou redução da viabilidade celular a partir de 1250  $\mu M$ , onde foi capaz de reduzir quase 100% da viabilidade celular e o tratamento com Anf-B não apresentou redução de viabilidade estatisticamente significativa (Figura 12).

Além disso, foi possível determinar a concentração citotóxica capaz de eliminar 50% das células ( $CC_{50}$ ). O resultado da citotoxicidade celular do  $NaClO_2$  apresentou um  $CC_{50}$  médio de 743,5  $\mu M$  (Figura 13), valores obtidos a partir da média de dois ensaios independentes. A concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) foi aquela que gerou redução de 50% no valor da densidade ótica nos ensaios de Alamar Blue®, calculada por análise de regressão.



**Figura 12. NaClO<sub>2</sub> e Anf-B são citocompatíveis com queratinócitos humanos.** HaCaT foram tratados com NaClO<sub>2</sub> por 72h. A viabilidade celular foi observada pelo percentual de redução de Alamar Blue. Barras representam  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle (\*\*p < 0.0001).



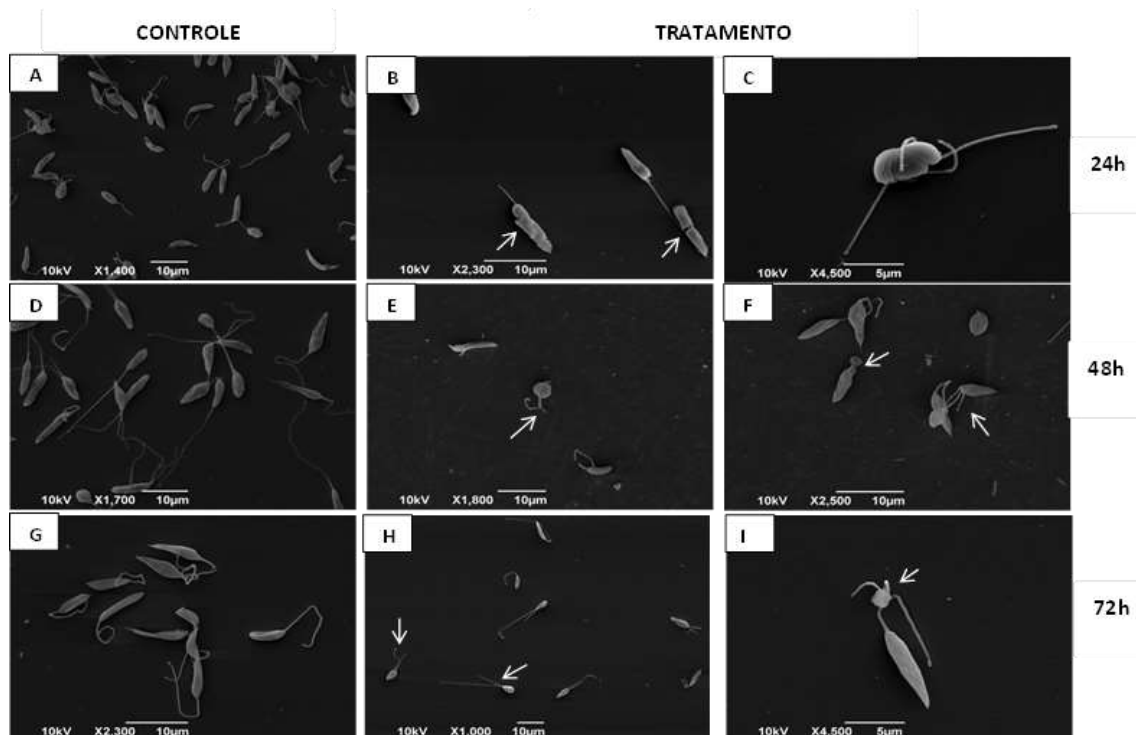
**Figura 13. CC<sub>50</sub> de NaClO<sub>2</sub> sobre queratinócitos humanos.** Resultado da citotoxicidade do NaClO<sub>2</sub> sobre linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCaT) cultivados durante 72 h nas concentrações de 2,44 µM a 5.000 µM. Os ensaios foram realizados em triplicata e representam a média de 2 experimentos.

Mediante os resultados prévios de eficácia e citocompatibilidade, os próximos experimentos objetivaram elucidar o mecanismo de ação do NaClO<sub>2</sub> sobre as formas promastigotas de *L.braziliensis*, a partir de análises das alterações ultraestruturais e morfológicas induzidas pela sua atividade. Ademais, a atividade de ambas as drogas foi avaliada sobre a forma evolutiva encontrada no hospedeiro humano: amastigostas intracelulares de *L.braziliensis*.

## 6.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis* DESENCADEADAS PELO TRATAMENTO COM NaClO<sub>2</sub>

### 6.5.1 Alterações morfológicas sobre promastigotas de *L. braziliensis* induzidas pelo tratamento com NaClO<sub>2</sub> observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Análises morfológicas através da microscopia eletrônica de varredura mostraram que a morfologia normal dos parasitos foi preservada nos grupos controles - não tratados (Figuras 10A, 10D, 10G), onde ressalta-se superfícies celulares estáveis, formas tipicamente alongadas e flagelos únicos e longos. Por outro lado, promastigotas tratadas com IC<sub>50</sub> do clorito de sódio mostraram nítidas alterações morfológicas nos parasitos. Dentre as alterações observadas, destaca-se a perda da forma alongada das células e alterações no flagelo dos parasitos em relação ao controle não tratado. No tempo de 24 h, foram observadas alterações pronunciadas na membrana celular e houve perda do formato alongado do corpo celular do parasito (Figuras 9B e 9C). Já no tempo de 48 h de tratamento, além de alterações na forma celular, foram observadas alterações no flagelo dos parasitos (Figuras 9E e 9F). Foi observada, no tempo de 72 h de tratamento, a perda da forma alongada do corpo celular das promastigotas e a presença de flagelo deformado, apresentando multiplicidade da organela (Figura 9H e 9I).



**Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* em cultura axênica tratada com clorito de sódio.** Os promastigotas foram tratados com  $\text{NaClO}_2$  ( $14 \mu\text{M}$ ) durante 24, 48 e 72 horas. (A) Promastigotas sem tratamento, controle 24 h. (B) Promastigotas tratadas por 24 h, observar descontinuidade da superfície celular. (C) Promastigotas tratadas por 24 h, observar encolhimento de superfície celular. (D) Promastigotas sem tratamento, controle 48 h. (E) Promastigotas tratadas por 48 h, notar alteração na forma e multiplicidade do flagelo. (F) Promastigotas tratadas por 48 h, notar achatamento e multiplicidade do flagelo. (G) Promastigotas sem tratamento, controle 72 h. (H) Promastigotas tratadas por 72 h, observar alteração no formato do corpo celular e multiplicidade dos flagelos. (I) Promastigotas tratadas por 72 h, observar alteração e multiplicidade do flagelo.

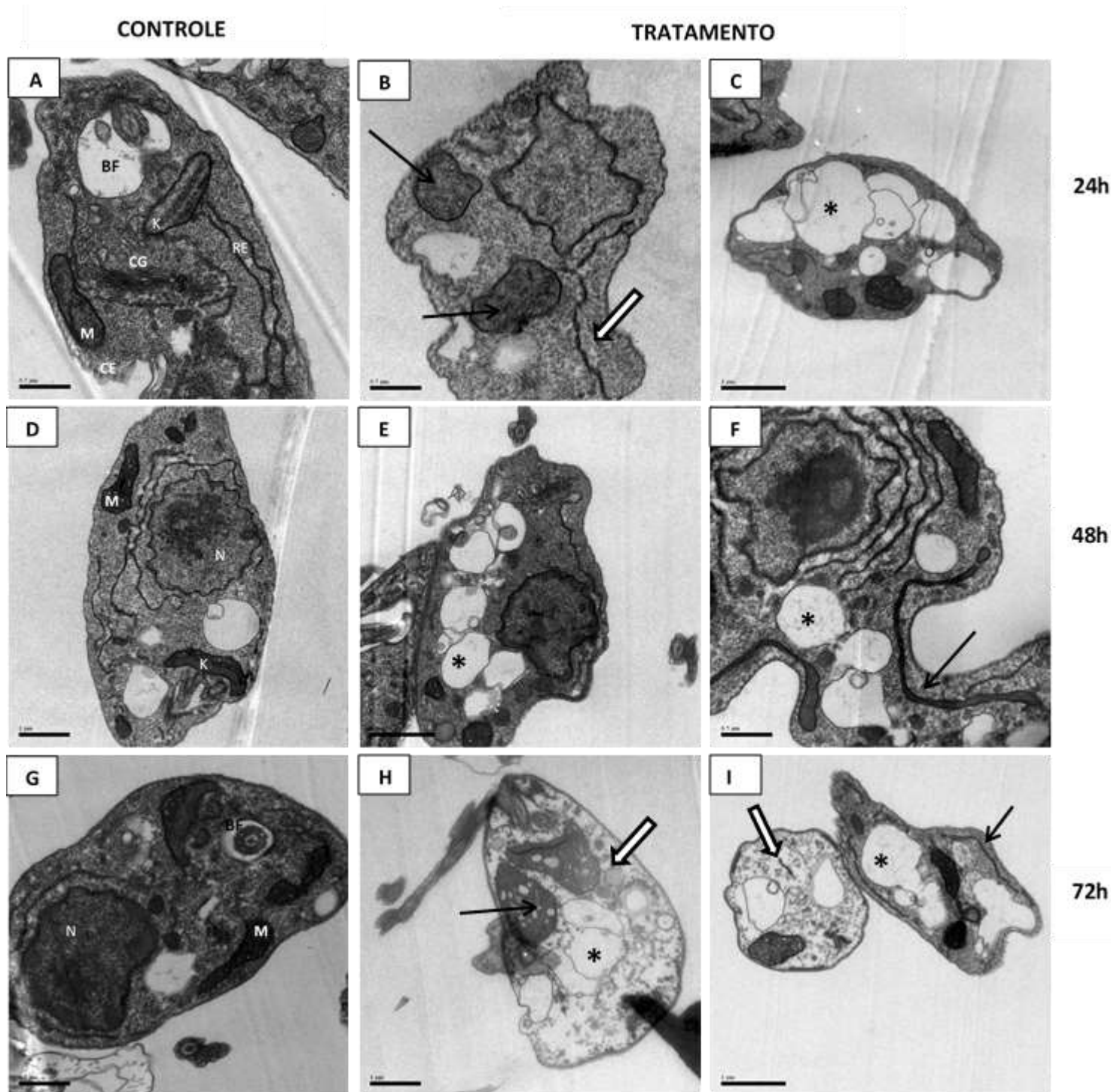
### 6.5.2 Alterações ultraestruturais sobre promastigotas de *L.braziliensis* induzidas pelo tratamento com $\text{NaClO}_2$ observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Análises ultraestruturais de promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com  $\text{NaClO}_2$  ( $14 \mu\text{M}$ ) e grupos controle não tratados foram realizadas nos períodos de 24, 48 e 72 h. Nota-se que, os grupos controles (Figuras 11 A, D e G) mantiveram sua forma e organelas celulares dentro dos padrões, notar: citoesqueleto preservado, núcleo com elétrons densidade preservada, presença do bolso flagelar, detalhes citoplasmáticos preservados, tais quais: complexo de Golgi e retículo endoplasmático bem delimitados e densidade eletrônica preservada, mitocôndrias com densidade eletrônica e cristas mitocondriais preservadas.

Em contrapartida, o tratamento com  $\text{NaClO}_2$  ( $14 \mu\text{M}$ ) induziu importantes alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania braziliensis* em todos os tempos de observação. Inchaço celular com redução de material eletrodens no citoplasma celular foi



observado (Figuras 11 B, H e I). Além disso, alterações na mitocôndria foram observadas: perda de material eletrodense, inchaço, aumento do comprimento e desorganização das cristas mitocondriais e formato celular foram observados (Figuras 11 B, F, H e I). Vacuolização difusa também foi observado (Figuras 11 C, E, F, H e I).

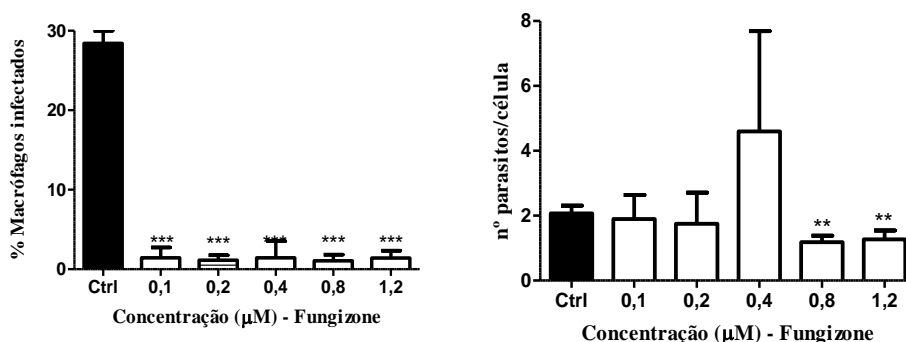


**Figura 15. Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* em cultura axênica tratada com  $\text{NaClO}_2$  ( $14\mu\text{M}$ ) durante 24, 48 e 72 horas.** (A) Promastigotas sem tratamento, controle 24 h. (B) Promastigotas tratadas por 24 h, observar perda da densidade eletrônica do citoplasma (seta branca), inchaço mitocondrial e desorganização das cristas mitocondriais (seta preta). (C) Promastigotas tratadas por 24 h, observar vacuolização difusa (\*). (D) Promastigotas sem tratamento, controle 48 h. (E) Promastigotas tratadas por 48 h, notar vacuolização difusa (\*). (F) Promastigotas tratadas por 48 h, notar comprimento aumentado da mitocôndria (seta preta) e vacuolização (\*). (G) Promastigotas sem tratamento, controle 72 h. (H) Promastigotas tratadas por 72 h, observar perda da densidade eletrônica do citoplasma (seta branca), vacuolização (\*) e inchaço da mitocôndria, perda da densidade eletrônica e cristas com formato circular (seta preta). (I) Promastigotas tratadas por 72 h, observar vacuolização (\*), comprimento aumentado da mitocôndria (seta preta), perda da densidade eletrônica do citoplasma (seta branca) e formato circular do parasito. (BF) bolso flagelar (CG) complexo de Golgi (RE) retículo endoplasmático (M) mitocôndria (N) núcleo (K) cinetoplasto (CE) citoesqueleto.

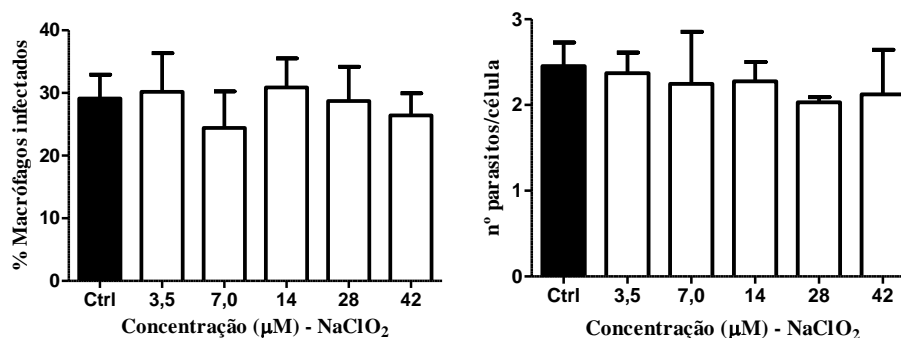
## 6.6 EFEITO DE Anf-B e NaClO<sub>2</sub>, EM MONOTERAPIA E TERAPIA COMBINADA, SOBRE A VIABILIDADE DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *L. braziliensis*

Devido aos dados anteriores da atividade de NaClO<sub>2</sub> e Anf-B sobre as formas promastigotas e sabendo que ambos não exercem efeito tóxico sobre macrófagos murinos, o potencial efeito leishmanicida do NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade intracelular do parasito, de forma *in vitro*, foi avaliado, bem como uma concentração ótima para combinação entre NaClO<sub>2</sub> e Anf-B foi analisada.

Inicialmente, todas as concentrações testadas de Anf-B (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 µM), após 48h de tratamento, foram capazes de reduzir o percentual de macrófagos infectados (Figura 16), entretanto, a redução do número de parasitos só foi estatisticamente significativa a partir da concentração de 0,8 µM ( $p < 0.01$ ). Entretanto, nas concentrações testadas de NaClO<sub>2</sub> (3,5; 7,0; 14; 28 e 42 µM) não houve alterações estatisticamente significante na redução do percentual de macrófagos infectados e na redução do número de parasitos por célula ( $p > 0.05$ ), com relação ao controle (Figura 17).

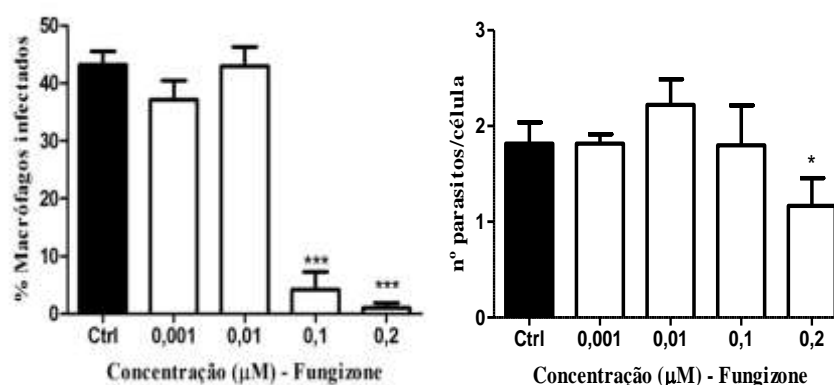


**Figura 16. Efeito de Anf-B sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Fungizone (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias  $\pm$  DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle (\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ ).

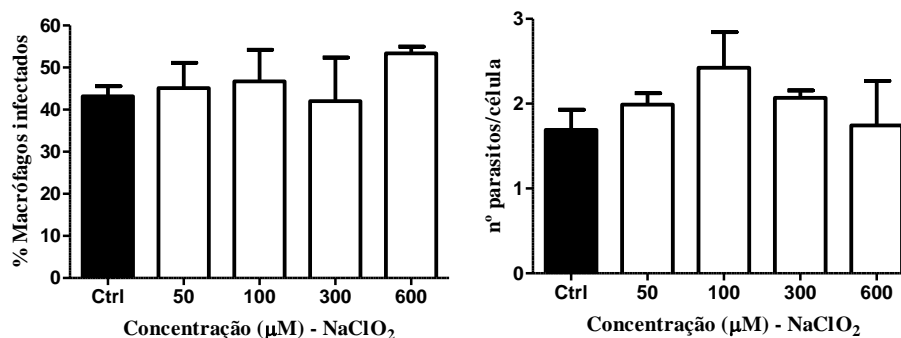


**Figura 17. Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com NaClO<sub>2</sub> (3,5; 7,0; 14; 28 e 42 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle.

Posteriormente, com a finalidade de encontrar uma concentração ideal para avaliar a interação entre Anf-B e NaClO<sub>2</sub> foram testadas concentrações menores de Anf-B (0,001; 0,01; 0,1; e 0,2 µM) e concentrações maiores de NaClO<sub>2</sub> (50; 100; 300 e 600 µM). Reforça-se que, todas as concentrações testadas estavam de acordo com os testes de citocompatibilidade dos compostos sobre macrófagos murinos e queratinócitos humanos. Neste cenário, Anf-B apresentou atividade estatisticamente significativa sobre a redução na % de macrófagos infectados a partir de 0,1 µM,  $p < 0.0001$ , e quanto à redução no número de parasitos por célula, a partir de 0,2 µM,  $p < 0.05$  (Figura 18). Contudo, nas concentrações testadas de NaClO<sub>2</sub> não houve alterações estatisticamente significante na redução do percentual de macrófagos infectados e na redução do número de parasitos por célula ( $p > 0.05$ ), com relação ao controle (Figura 19).

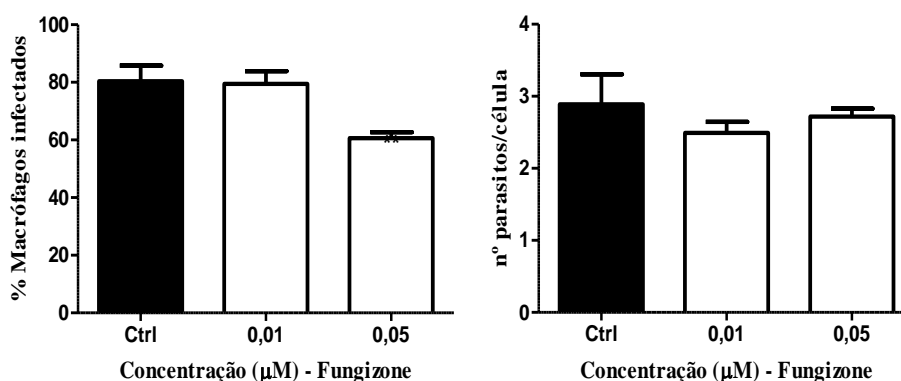


**Figura 18. Efeito de Anf-B sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Fungizone (0,001; 0,01; 0,1; e 0,2 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle (\*\*\*)  $p < 0.0001$ , \*  $p = 0.0363$ ).



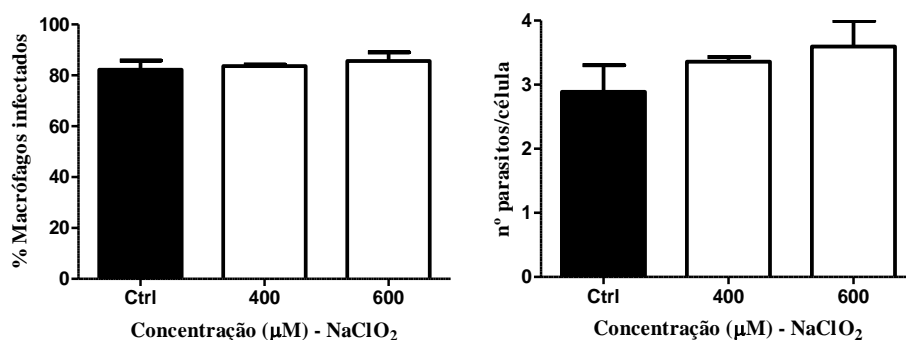
**Figura 19. Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com NaClO<sub>2</sub> (50; 100; 300 e 600 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle.

Tendo em vista que, uma resposta sinérgica na interação entre drogas a atividade de ambas é melhora, um outro ensaio avaliando a viabilidade das amastigotas intracelulares foi feito combinando-se Anf-B e NaClO<sub>2</sub>. As concentrações selecionadas de Anf-B (0,01 e 0,05 µM) e NaClO<sub>2</sub> (400 e 600 µM) foram avaliadas em monoterapia e em terapia combinada Anf-B/ NaClO<sub>2</sub> (0,001/400; 0,05/600; 0,01/600 µM). Entretanto, quanto à redução da porcentagem de macrófagos infectados, apenas Anf-B apresentou atividade estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ), na concentração de 0,05 µM, em relação ao controle, porém não houve atividade quanto à redução do número de parasitos por célula,  $p > 0.05$  (Figura 20). Ademais, para estes parâmetros, tanto NaClO<sub>2</sub> e Anf-B não apresentaram atividade de redução estatisticamente significativa,  $p > 0.05$  (Figuras 23 e 24).

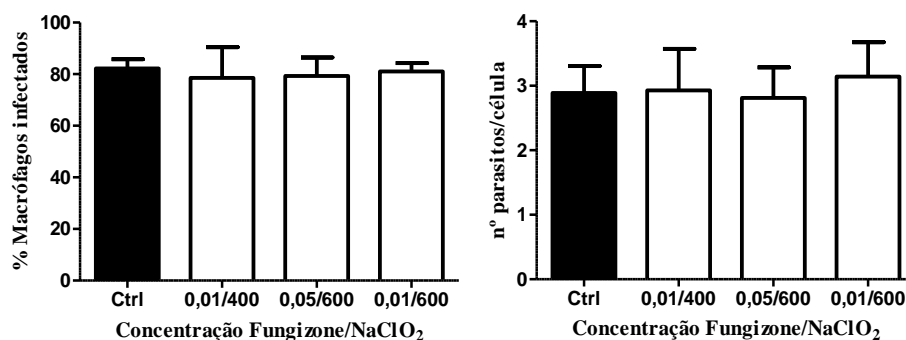


**Figura 20. Efeito de Anf-B sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Fungizone (0,01 e 0,05 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias

± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle (\*\* p < 0.01).



**Figura 21. Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com NaClO<sub>2</sub> (400 e 600 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle.

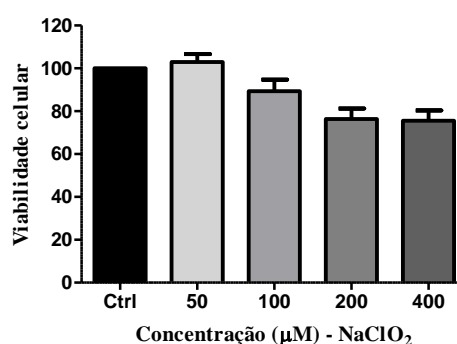


**Figura 22. Efeito da combinação entre Anf-B e NaClO<sub>2</sub> sobre a viabilidade de amastigota intracelular.** Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com Anf-B/NaClO<sub>2</sub> (0,001/400; 0,05/600; 0,01/600 µM) por 48 h. Meio DMEM suplementado foi utilizado como controle. (A) % de macrófagos infectados, avaliado por microscopia de fluorescência, conforme descrito em *Materiais e Métodos* (B) Relação entre o número total de parasitos encontrados em 200 células. Barras representam médias ± DP de um experimento em triplicata. Teste-t não pareado foi utilizado para comparar cada grupo experimental ao grupo controle.

Os resultados acima revelaram que NaClO<sub>2</sub> não foi eficaz na redução da porcentagem de macrófagos infectados, bem como em reduzir parasitemia intracelular. Estes dados levaram à investigação acerca do motivo da ausência de atividade do composto frente a amastigotas intracelulares, se por desprovimento de ação sobre esta forma evolutiva ou se por incapacidade de adentrar os macrófagos e reduzir a viabilidade das amastigotas. Para isto, a atividade da droga foi avaliada sobre a forma evolutiva em cultura axênica, ademais possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais foram investigadas.

## 6.7 NaClO<sub>2</sub> NÃO APRESENTOU EFICÁCIA SOBRE A INIBIÇÃO DA VIABILIDADE DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *L. braziliensis*

Com a finalidade de avaliar se a atividade do NaClO<sub>2</sub>, sobre amastigotas intracelulares, não era eficaz pelo fato da droga não ter a capacidade de adentrar a célula infectada, e posteriormente alcançar o vacúolo parasitóforo, a atividade do NaClO<sub>2</sub> foi avaliada sobre formas amastigotas axênicas de *L. braziliensis*. Contudo, conforme observado na Figura 23, em todas as concentrações testadas da droga (50, 100, 200 e 400 µM) não houve redução da viabilidade celular com relação ao controle que fosse estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).



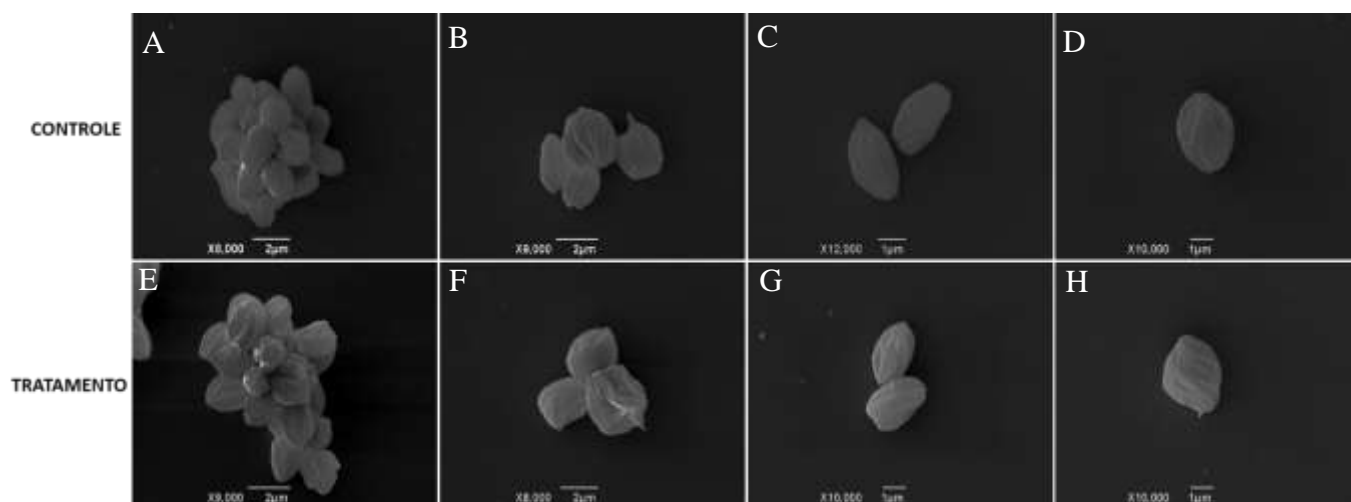
**Figura 23. Efeito de NaClO<sub>2</sub> sobre amastigota axênica de *L. braziliensis*.** Amastigotas axênicas foram tratadas com NaClO<sub>2</sub> (50; 100; 200 e 400 µM) por 24 h. Meio Schneider pH 5,5 suplementado foi utilizado como controle. A porcentagem de viabilidade celular foi obtida por Alamar Blue. Barras representam médias ± DP de dois experimentos independentes em triplicata. Teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido do pós-teste de Dunns, foi utilizado para comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle.

## 6.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE FORMAS AMASTIGOTAS EXTRACELULARES DE *L. braziliensis* APÓS TRATAMENTO COM NaClO<sub>2</sub>

### 6.8.3 Morfologia de amastigotas extracelulares de *L. braziliensis* tratadas com NaClO<sub>2</sub> observadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As formas amastigotas obtidas pelo processo de diferenciação *in vitro* foram analisadas quanto a sua morfologia através de observação em microscopia eletrônica de varredura (Figura 24). Os parasitos obtidos apresentaram morfologia ovalada, arredondada e ausência de flagelo livre, sendo esta a principal característica morfológica que distingue amastigotas de promastigotas. Os parasitos se desenvolvem formando grumos com aspecto de “cacho de uva” (Figuras 26 A e E). Todas estas características foram observadas em

ambos os grupos, controle (Figuras 26 A, B, C e D) e no grupo experimental, amastigotas tratadas com  $\text{NaClO}_2$  ( $14 \mu\text{M}$ ) por 24 horas, ou seja, não houve alterações morfológicas após o tratamento das amastigotas axênicas com  $\text{NaClO}_2$ .

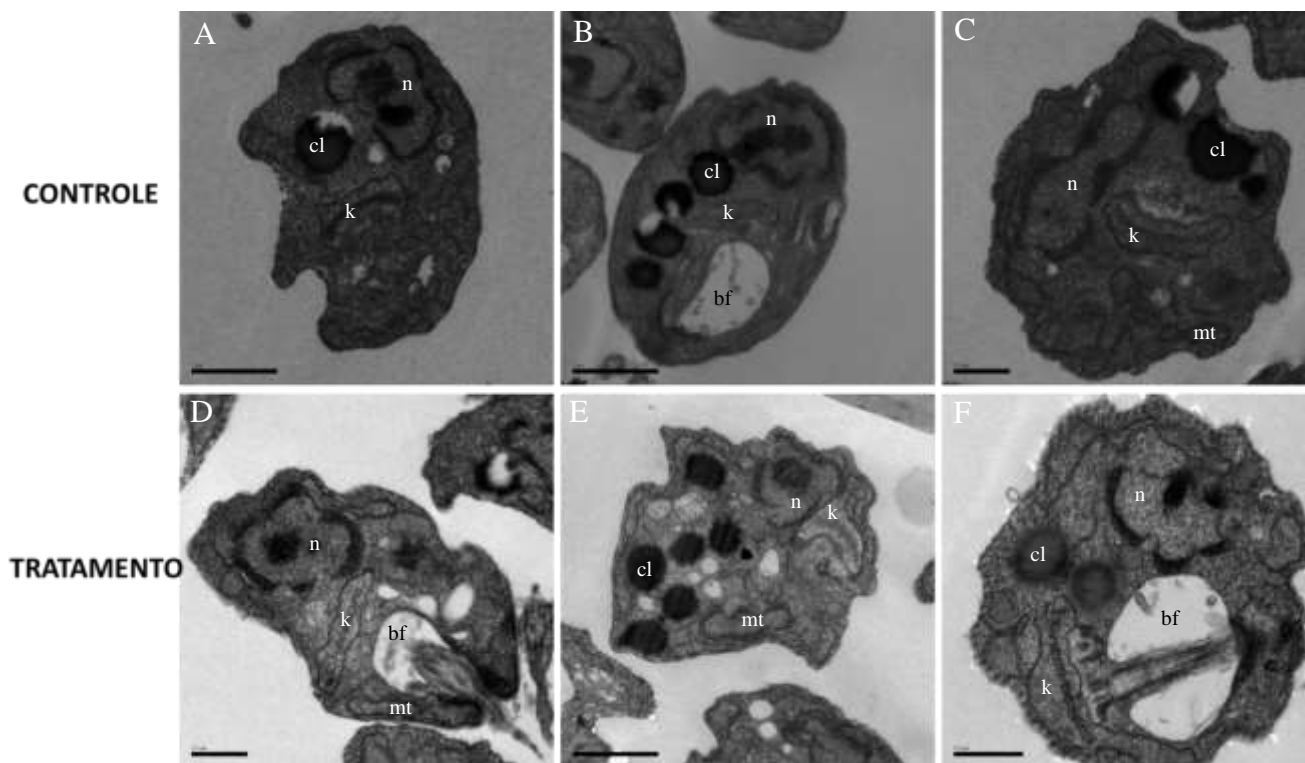


**Figura 24. Imagens de Microscopia eletrônica de varredura de amastigotas axênicas tratadas com  $\text{NaClO}_2$ .** Amastigotas axênicas de *L.braziliensis*. A, B, C e D: amastigotas axênicas controle, obtidas a partir de promastigotas em fase log final. E, F, G e H: amastigotas axênicas após tratamento de 24 h com  $\text{NaClO}_2$  ( $14 \mu\text{M}$ ).

#### 6.8.4 Ultraestruturas de amastigotas extracelulares de *L.braziliensis* tratadas com $\text{NaClO}_2$ observadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Com o intuito de verificar as possíveis alterações ultraestruturais intracelulares devido ao tratamento com  $\text{NaClO}_2$ , por 24 horas, as formas amastigotas axênicas de *L. braziliensis* foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão (Figura 25). As Figuras 27 (A, B e C) mostram as fotomicrografias da forma amastigota controle apresentando um núcleo bem delimitado, citoplasma granuloso e homogêneo, presença de corpúsculos lipídicos, cinetoplasto e mitocôndria altamente preservados. Todas estas características foram observadas em ambos os grupos, controle (Figuras 27 A, B e C) e no grupo experimental (Figuras 27 D, E e F), amastigotas tratadas com  $\text{NaClO}_2$  ( $14 \mu\text{M}$ ) por 24 horas, ou seja, não houve alterações ultraestruturais após o tratamento das amastigotas axênicas com  $\text{NaClO}_2$ .



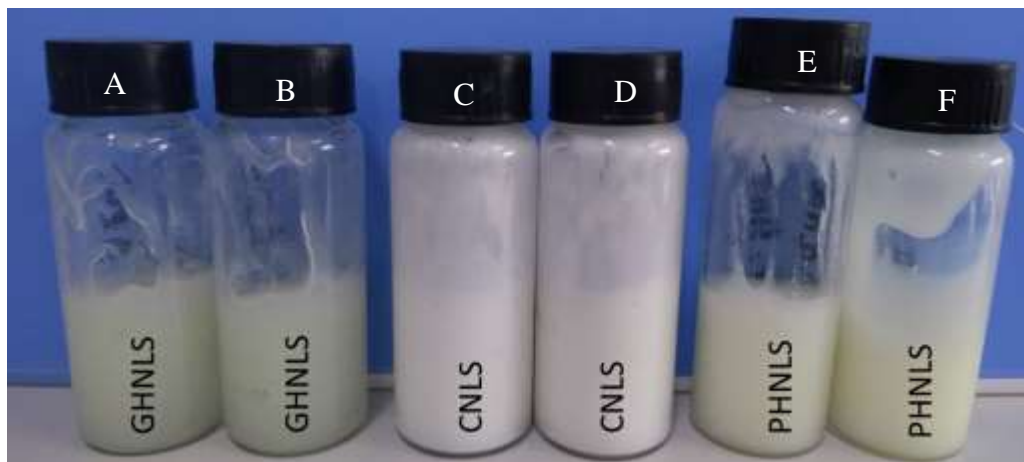


**Figura 25. Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão de amastigotas axênicas tratadas com NaClO<sub>2</sub>.** Amastigotas axênicas de *L.braziliensis*. A, B, C e D: amastigotas axênicas controle, obtidas a partir de promastigotas em fase log final. E, F, G e H: amastigotas axênicas após tratamento de 24 h com NaClO<sub>2</sub> (14 μM). (n) núcleo (bf) bolso flagelar (k) cinetoplasto (cl) corpúsculo lipídico (mt) mitocôndria.

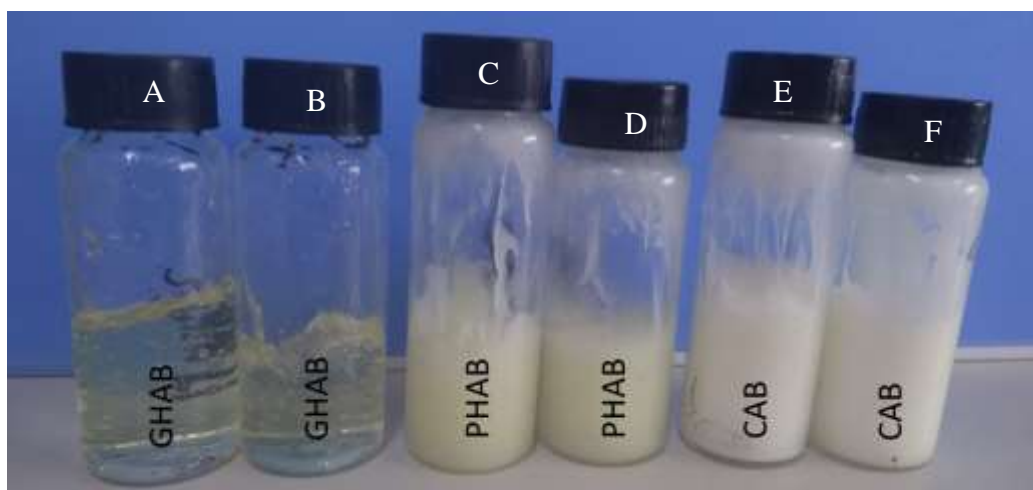
Através dos resultados obtidos, reconheceu-se que a atividade, *in vitro*, do NaClO<sub>2</sub> não foi benéfica sobre a forma evolutiva amastigota (intracelular e extracelular) de *L. braziliensis*. Por isso, as formulações desenvolvidas foram compostas apenas por Anf-B.

#### 6.8 FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS CONTENDO Anf-B a 0,01 %

Todas as formulações produzidas (GHNLS / GHAB, CNLS / CAB e PHNLS / PHAB) continham 0,01% de anfotericina B, livre ou em nanopartículas, em 15 g de formulação. Todas foram formuladas em duplicata, 10 g de cada formulação foram utilizados para estudos de estabilidade (Figuras 7 e 8) e 5 g para os estudos de liberação *in vitro* em células de Franz, as formulações em branco continham 10 g de cada base (Figura 9) e foram utilizadas como referência. GHNLS, CNLS, PHNLS GHAB, CAB, PHAB



**Figura 26. Nanoformulações contendo 0,01% de anfotericina B.** Nanoformulações obtidas a partir de uma suspensão de nanopartículas contendo anfotericina B a 0,84 mg/mL. A e B: Gel hidrofílico de carbopol contendo 0,01% de anfotericina; C e D: Creme não iônico contendo 0,01% de anfotericina; D e F: Pomada hidrofílica contendo 0,01% de anfotericina.



**Figura 27. Formulações contendo 0,01% de anfotericina B livre.** Formulações obtidas a partir de uma solução de anfotericina B em DMSO a 0,84 mg/mL. A e B: Gel hidrofílico de carbopol contendo 0,01% de anfotericina; C e D: pomada hidrofílica contendo 0,01% de anfotericina; E e F: Creme não iônico contendo 0,01% de anfotericina.



**Figura 28. Formulações de referência.** Duplicatas das formulações em branco contendo 10 g das bases. A e B: Gel base de carbopol; C e D: Creme base não-iônico; E e F: Pomada base hidrofílica (Carbowax).

## 6.9 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

As formulações obtidas foram caracterizadas quanto as suas características organolépticas e físico-químicas, estas características também foram utilizadas como parâmetros para estudos de estabilidade em tempos pré-determinados (d0, d3, d7 e d14).

### 6.9.1 Ensaios Organolépticos

As características organolépticas das formulações foram analisadas quanto ao aspecto, cor e odor. Estas características foram determinadas comparando as formulações contendo Anf-B (livre e em nanopartículas) às formulações de referência. Inicialmente, as formulações contendo Anf-B (GHNLS / GHAB, CNLS / CAB e PHNLS / PHAB) apresentaram alterações com relação ao aspecto visual e à cor com relação às amostras de referência.

As formulações do GHNLS e GHAB mantiveram aspecto consistente e heterogêneo, com presença de bolhas características, quando comparadas às amostras de referência, contudo a cor apresentou coloração característica da suspensão de nanopartículas de Anf-B e solução de Anf-B em DMSO, tornando-se então amareladas (Tabelas 6, 9 e 12). O mesmo ocorreu com as formulações de CNLS e CAB, que mantiveram aspecto consistente e homogêneo, contudo apresentou as mesmas alterações na cor, em relação às amostras de referência que apresentavam coloração branca (Tabela 8, 11 e 14). Contudo, com relação às formulações de PHNLS e PHAB o aspecto inicial apresentou diferença em relação ao

aspecto visual, apresentando consistência mais leve em relação às amostras de referência e mudaram a coloração passando de branco acizentado para amareladas (Tabela 7, 10 e 13).

**Tabela 10.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico das amostras de referência.

**Gel hidrofílico**

Dias	Aspecto	Cor	Odor
0	Consistente e Heterogêneo, com presença de bolhas características.	Límpido com brilho característico	Característico
3	-	-	-
7	-	-	-
14	-	-	-

**Tabela 11.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica das amostras de referência.

**Pomada hidrofílica**

Dias	Aspecto	Cor	Odor
0	Consistente com aspecto de cera; Homogênea.	Branco acizentado.	Ausência de odor forte
3	-	-	-
7	-	-	-
14	-	-	-

**Tabela 12.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do creme não-iônico das amostras de referência.

**Creme não-iônico**

Dias	Aspecto	Cor	Odor
0	Consistente; Homogêneo.	Branco.	Característico de vaselina.
3	-	-	-
7	-	-	-
14	-	-	-

**Tabela 13.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B em nanopartículas.

**GHNLS**

Dias	Aspecto	Cor	Odor
<b>0</b>	Consistente e Heterogêneo, com presença de bolhas características.	Levemente amarelado.	Característico.
<b>3</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-

**Tabela 14.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B em nanopartículas.

**PHNLS**

Dias	Aspecto	Cor	Odor
<b>0</b>	Consistência mais leve; Homogênea.	Levemente amarelada.	Ausência de odor forte
<b>3</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-

**Tabela 15.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B em nanopartículas.

**CNLS**

Dias	Aspecto	Cor	Odor
<b>0</b>	Consistente; Homogêneo.	Levemente amarelado.	Característico de vaselina.
<b>3</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-

**Tabela 16.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B livre.

<b>GHAB</b>			
<b>Dias</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>
<b>0</b>	Consistente; Heterogêneo, com presença de bolhas características.	Amarelo translúcido.	Característico.
<b>3</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-

**Tabela 17.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B livre.

<b>PHAB</b>			
<b>Dias</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>
<b>0</b>	Consistência mais leve; Homogênea.	Levemente amarelada	Ausência de odor forte
<b>3</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-

**Tabela 18.** Características organolépticas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B livre.

<b>CAB</b>			
<b>Dias</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>
<b>0</b>	Consistente; Homogêneo.	Levemente amarelado	Característico de vaselina.
<b>3</b>	-	-	-
<b>7</b>	-	-	-
<b>14</b>	-	-	-

Ao longo dos dias pré-determinados para análise (d3, d7, d14), as formulações mantiveram seu aspecto com relação ao dia da formulação (d0).

### 6.9.2 Ensaio Físico-Químicos

As características físico-químicas das formulações foram analisadas quanto ao pH, Condutividade elétrica (CE), densidade aparente e teste de centrifuga. Estas características foram determinadas comparando as formulações contendo Anf-B (livre e em nanopartículas) às formulações de referência. Inicialmente, as formulações contendo Anf-B (GHNLS / GHAB, CNLS / CAB e PHNLS / PHAB) apresentaram variações com relação às amostras de referência nos parâmetros aqui avaliados.

Os valores de pH (média de duplicata) de todas as formulações com relação às amostras de referência sofreu variações, com tendência de aumento no seu valor para todas elas, onde: Gel hidrofílico, Pomada hidrofílica e Creme não-iônico (5,1; 4,4 e 5,4), GHNLS, PHNLS e CNLS (6,7; 5,0; 6,5), GHAB, PHAB e CAB (6,0; 4,6; 6,1). Os valores de CE ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) sofreram poucas alterações, exceto o GHAB, onde: Gel hidrofílico, Pomada hidrofílica e Creme não-iônico (94; 34,5 e 17,6), GHNLS, PHNLS e CNLS (90,8; 40,6; 19,5), GHAB, PHAB e CAB (78,9; 32,6; 19,9). Assim também foi para os valores de densidade aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ): Gel hidrofílico, Pomada hidrofílica e Creme não-iônico (0,92; 1,11 e 0,93), GHNLS, PHNLS e CNLS (1,0; 1,13 e 0,93), GHAB, PHAB e CAB (1,02; 1,11 e 0,96).

**Tabela 19.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico das amostras de referência.

<b>Gel hidrofílico</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{S}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	5,1	94	0,92
	5,4	93,1	-
<b>3</b>			
<b>7</b>	5,7	92,1	-
<b>14</b>	6,1	91,6	-

**Tabela 20.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica das amostras de referência.

<b>Pomada hidrofílica</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	4,4	34,5	1,11
<b>3</b>	4,3	39,3	-
<b>7</b>	4,1	44,5	-
<b>14</b>	3,8	42	-

**Tabela 21.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico das amostras de referência.

<b>Creme não-iônico</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	5,4	17,6	0,93
<b>3</b>	5,7	19,1	-
<b>7</b>	5,8	20,5	-
<b>14</b>	6,3	22	-

**Tabela 22.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B em nanopartículas.

<b>GHNLS</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	6,7	90,8	1,0
<b>3</b>	6,2	91	-
<b>7</b>	5,6	90,9	-
<b>14</b>	5,8	91,4	-

**Tabela 23.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B em nanopartículas.

<b>PHNLS</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	5,0	40,6	1,13
<b>3</b>	4,7	42,8	-
<b>7</b>	4,0	45,0	-
<b>14</b>	4,2	43,9	-



**Tabela 24.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B em nanopartículas.

<b>CNLS</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	6,5	19,5	0,93
<b>3</b>	6,2	17,6	-
<b>7</b>	5,8	15,6	-
<b>14</b>	5,7	15,1	-

**Tabela 25.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Gel hidrofílico contendo Anf-B livre.

<b>GHAB</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	6,0	78,9	1,02
<b>3</b>	5,6	80	-
<b>7</b>	5,2	81,1	-
<b>14</b>	5,2	80,3	-

**Tabela 26.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade da Pomada hidrofílica contendo Anf-B livre.

<b>PHAB</b>			
<b>Dias</b>	<b>pH</b>	<b>Condutividade Elétrica (<math>\mu\text{s}/\text{cm}</math>)</b>	<b>Densidade (<math>\text{g}/\text{cm}^3</math>)</b>
<b>0</b>	4,6	32,6	1,11
<b>3</b>	4,4	38,1	-
<b>7</b>	4,1	43,5	-
<b>14</b>	4,2	44,1	-

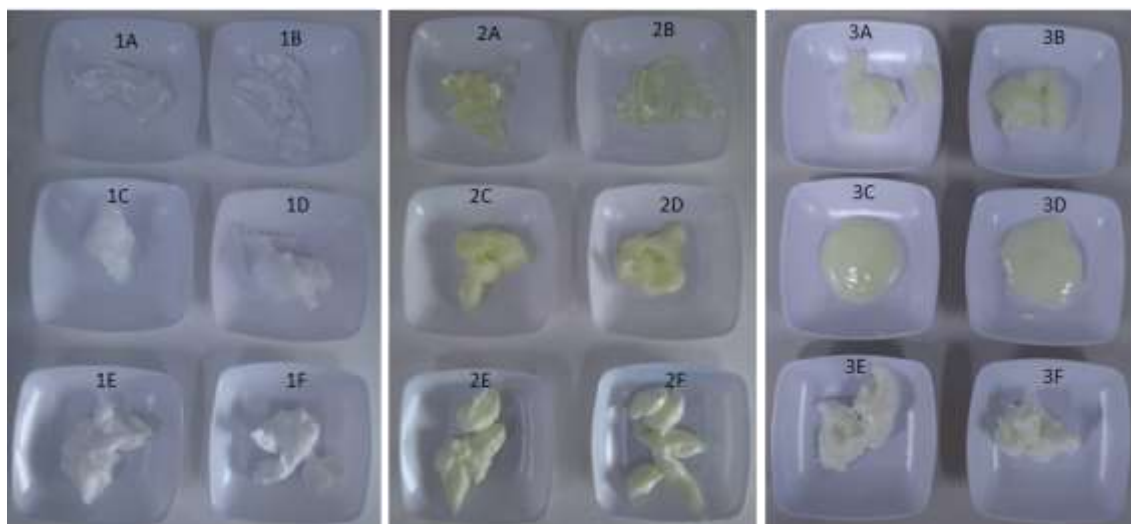
**Tabela 27.** Características físico-químicas ao longo dos tempos pré-determinados para estudo de estabilidade do Creme não-iônico contendo Anf-B livre.

<b>CAB</b>			
<b>Dias</b>	pH	Condutividade Elétrica ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	Densidade ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
<b>0</b>	6,1	19,9	0,96
<b>3</b>	6,0	19,2	-
<b>7</b>	5,8	18,7	-
<b>14</b>	5,4	18,1	-

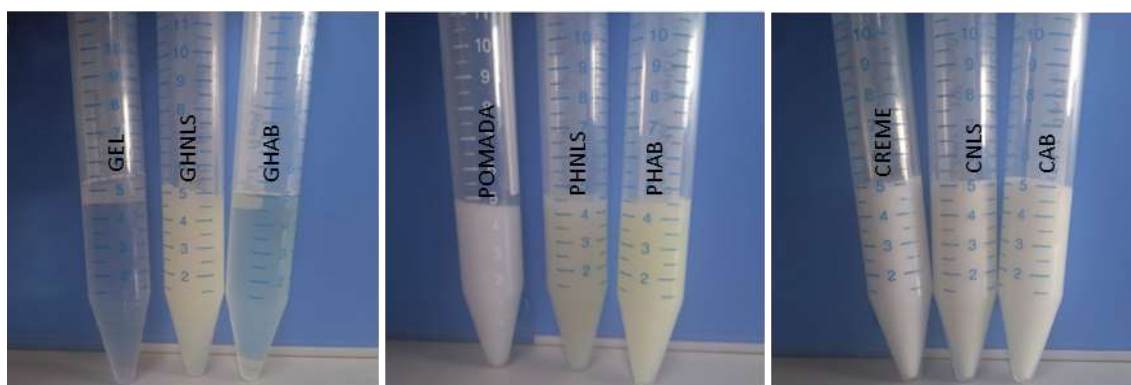
Os parâmetros físico-químicos (pH e condutividade elétrica) ao longo de 14 dias ( $d_0$ ,  $d_3$ ,  $d_7$  e  $d_{14}$ ) mostraram poucas variações do ( $d_0$ - $d_{14}$ ), tanto para as formulações padrões, quanto para as formulações contendo Anf-B. As formulações em gel padrão tiveram um leve aumento no pH (5,1 - 6,1) e leve diminuição da condutividade elétrica (94 - 91,6 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), para pomada hidrofílica e creme não iônico foram respectivamente: (4,4 - 3,8) e (34,5 - 42 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ); (5,4 - 6,3) e (17,6 - 22 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ). Todas as formulações contendo Anf-B sofreram uma leve tendência em diminuir o pH ao longo dos 14 dias: (6,7 - 5,8); (5,0 - 4,2); (6,5 - 5,7), GHNLS, PHNLS e CNLS, respectivamente e (6,0 - 5,2); (4,6 - 4,2); (6,1 - 5,4), GHAB, PHAB e CAB, respectivamente. Contudo, quanto à condutividade elétrica, as formulações em gel e pomada tenderam a um leve aumento do seu valor, enquanto para creme esse valor diminuiu: (90,8 - 91,4 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ); (40,6 - 43,9 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ); (19,5 - 15,1 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), GHNLS, PHNLS e CNLS, respectivamente e (78,9 - 80,3 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ) (32,6 - 44,1 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ); (19,9 - 18,1 $\mu\text{s}/\text{cm}$ ), GHAB, PHAB e CAB, respectivamente.

Ademais, o teste de centrífuga foi realizado como análise preliminar, a fim de determinar qualquer sinal de instabilidade indicativa de necessidade de reformulação (BRASIL, 2004). A centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (BRASIL, 2007).

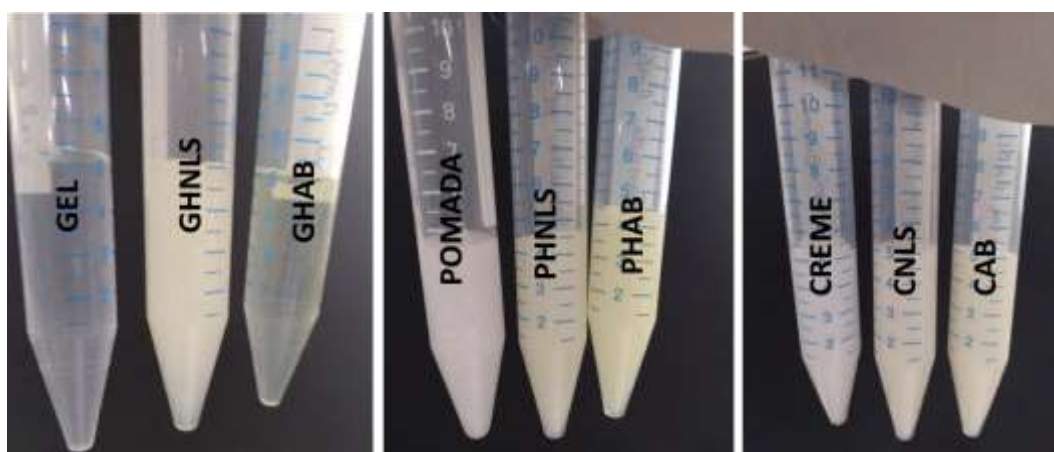
A Figura 29 apresenta o aspecto das amostras antes e a Figura 30 após a realização do teste de centrífuga. Após o teste observou-se que as formulações não apresentaram alteração em relação ao seu aspecto original, tanto as formulações em branco (1A a 1F) quanto às formulações contendo as nanopartículas de Anf-B (2A a 2F) e as formulações contendo Anf-B livre (3A a 3F).



**Figura 29. Formulações antes do teste de centrifuga.** Aspecto das formulações 24 h após produção, antes de serem submetidas ao teste de centrifuga. 1 (A e B): Gel hidrofílico; 1 (C e D): Pomada Hidrofílica; 1 (E e F): Creme não-iônico. 2 (A e B): Formulação GHAB; 2 (C e D): Formulação PHAB; 3 (E e F): Formulação CAB. 3 (A e B): Formulação GHNLS; 3 (C e D): Formulação CNLS; 3 (E e F): Formulação CNLS.



**Figura 30. Formulações após teste de centrifuga.** Uma alíquota de 5g de cada formulação foi submetida ao teste de centrifuga a 3000 rpm/30 min a 25°C.



**Figura 31. Formulações após teste de centrifuga (d14).** Uma alíquota de 5g de cada formulação foi submetida ao teste de centrifuga a 3000 rpm/30 min a 25°C, após 14 dias de preparo.

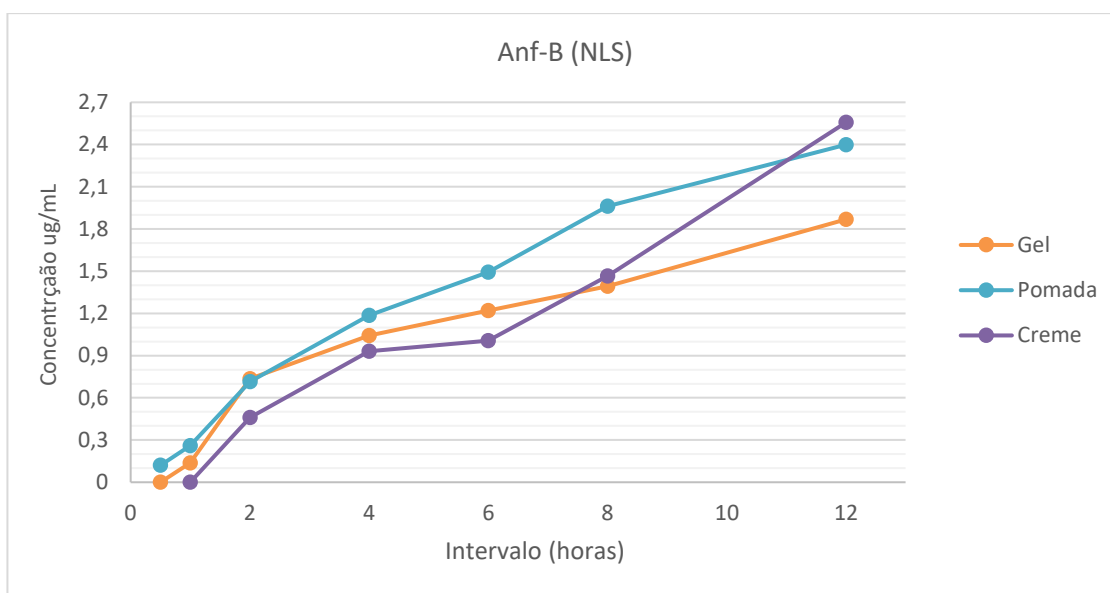
A Figura 31 apresenta o aspecto das amostras após a realização do teste de centrifuga 14 dias após o preparo das formulações. Após o teste, observou-se que as formulações não apresentaram alteração em relação ao seu aspecto original (Figura 29).

### 6.9.3 Liberação *in vitro* de Anf-B a partir das formulações semissólidas desenvolvidas

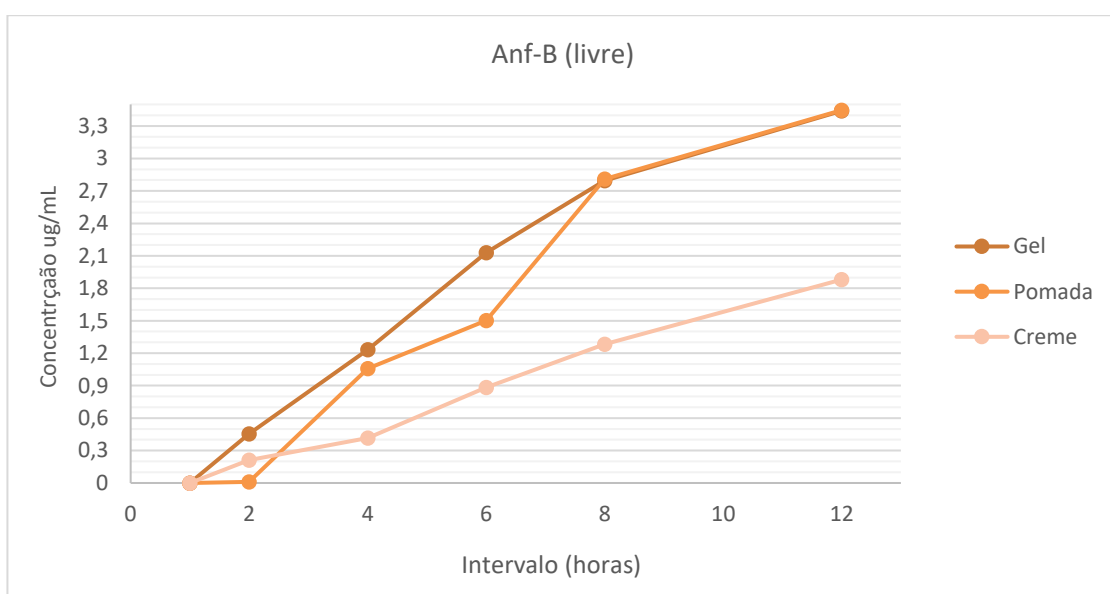
O perfil de liberação de Anf-B obtido a partir das nanoformulações e das formulações semissólidas (Anf-B livre) resultou nos perfis mostrados na Figura 32 (GHNLS, PHNLS e CNLS) e na Figura 33 (GHAB, PHAB, CAB). Com base no valor inicial adicionado ao meio doador (5 g de cada formulação = 42 µg de Anf-B de cada formulação) os valores máximos liberados, em 10 mL do meio receptor, para cada formulação, em 12 horas, estão ilustrados na Tabela 28:

**Tabela 28.** Concentração, quantidade e porcentagem de Anf-B a partir das nanoformulações (GHNLS, PHNLS e CNLS) e das formulações (GHAB, PHAB, CAB) semissólidas.

Formulações	Concentração liberada (µg/mL) em 12 horas	Quantidade liberada em 10 ml do meio receptor	Porcentagem liberada em 12 horas
GHNLS	1,9	19	45%
PHNLS	2,4	24	57%
CNLS	2,6	26	62%
GHAB	3,4	34	81%
PHAB	3,4	34	81%
CAB	1,9	19	45%



**Figura 32.** Perfil de liberação da Anf-B a partir das nanoformulações semissólidas (Gel hidrofílico - GHNLS, Pomada hidrofílica - PHNLS e creme não-iônico- CNLS).



**Figura 33.** Perfil de liberação da Anf-B livre a partir das formulações semissólidas (Gel hidrofílico - GHAB, Pomada hidrofílica - PHAB e creme não-iônico- CAB).

Com base nos dados acima, nenhuma das formulações apresentaram 100 % de liberação da Anf-B, apenas as formulações contendo Anf-B livre liberou um valor próximo (81%) a partir das bases gel e pomada. As nanoformulações liberaram menos de 70 % de Anf-B dentro das 12 horas de liberação, o que as tornam mais adequadas para um efeito sustentado da atividade tópica da Anf-B.

## 7 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que buscou desenvolver uma nanoformulação tópica, combinando anfotericina-B (um antibiótico antifúngico poliênico, empregado no tratamento da leishmaniose) e clorito de sódio (agente promotor de reparação tecidual), para o tratamento da leishmaniose tegumentar localizada, causada por *L. braziliensis*. Inicialmente, as drogas foram testadas em formas promastigotas de *L. braziliensis* e seus respectivos IC<sub>50</sub> foram obtidos para cepa em estudo (MHOM/BR/01/BA788). A natureza da interação entre as drogas em estudo foi determinada *in vitro*, onde proporções de combinações selecionadas foram investigadas. A análise das interações medicamentosas visou indicar se a natureza da interação poderia ser categorizada como sinérgica, aditiva ou antagônica. Em seguida, a citocompatibilidade de anf-B e NaClO<sub>2</sub> foram testadas em células murinas (macrófagos peritoneais) e humanas (queratinócitos - HaCaT) e a CC<sub>50</sub> também foi obtida. O índice de seletividade de ambas as drogas foram calculados relacionando o IC<sub>50</sub> sobre promastigotas e o CC<sub>50</sub> para macrófagos peritoneais.

Ademais, a determinação da atividade de anf-B e NaClO<sub>2</sub> sobre amastigotas intracelulares, em monoterapia e em terapia combinada, foi avaliada. Contudo, apenas anf-B mostrou-se eficaz contra estas formas evolutivas, desta forma, a atividade de NaClO<sub>2</sub> sobre amastigotas extracelulares foi avaliada, porém também não houve resposta eficaz nas mais altas concentrações testadas. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura foram obtidas das formas evolutivas, promastigotas e amastigotas axênicas, de *L. braziliensis* após tratamento com NaClO<sub>2</sub>, estas microscopias mostraram alterações que trouxeram indícios acerca do mecanismo de ação da droga.

De 2004-2007, um estudo clínico, de fase IIa, monocêntrico, controlado e randomizado, foi realizado em Kabul e teve como objetivo primário avaliar a eficácia clínica de um novo protocolo para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. tropica*. O estudo avaliou dois grupos: I. Pacientes tratados com eletro-cauterização de alta frequência, acrescidos de cuidados da ferida com hidrogel contendo 5 mM de NaClO<sub>2</sub> (0,045% DAC N -055) e II. Pacientes tratados apenas com eletro-cauterização de alta frequência. Após fechamento das feridas, pacientes que ainda apresentaram biópsias positivas para *Leishmania*, a presença do NaClO<sub>2</sub> causou uma epitelização mais rápida da ferida, reforçando seu efeito promotor de reparação e imunomodulatório (JEHRAN *et al.*, 2014).

Outro estudo clínico, de fase IIb, controlado e randomizado, também realizado no

Afeganistão, avaliou três grupos de pacientes com leishmaniose cutânea, infectados por *L.tropica* ou *L.major*: I. Pacientes que receberam estibogluconato de sódio intradérmico (SSG); II. Pacientes tratados com eletro-cauterização de alta frequência, acrescidos de cuidados da ferida com 5 mM de NaClO<sub>2</sub> (0,045% DAC N -055); e III. Pacientes tratados apenas com um creme contendo 0,045% DAC N -055. Neste estudo, resultados mostraram que o tratamento das úlceras de leishmaniose cutânea com eletro-cauterização de alta frequência seguido, acrescidos de cuidados da ferida com 5 mM de NaClO<sub>2</sub> (0,045% DAC N -055) ou com DAC N-055 sozinho mostrou tempos de fechamento da ferida mais curtos do que com a terapia SSG padrão (STAHL *et al.*, 2014).

Neste cenário, Jebran *et al.*, 2014, também avaliou a atividade *in vitro* de DAC N-055 sobre formas evolutivas, extra e intracelular de *Leishmania*. Para este fim, promastigotas de *L. tropica* foram cultivadas na ausência ou na presença de concentrações crescentes de DAC N-055 (0,4 a 400 µM), por 4 dias. Os dados revelaram um efeito citotóxico de DAC N-055 em promastigotas, com uma EC<sub>50</sub> de 13,7 µM. Dadas as diferenças bioquímicas e moleculares conhecidas entre as espécies de *Leishmania*, que conduzem a diferentes perfis de sensibilidade deste parasito às diversas drogas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), a atividade de NaClO<sub>2</sub> foi primeiramente avaliada aqui neste estudo sobre *L.braziliensis*. O resultado aqui obtido foi similar ao de Jebran *et al.*, 2014 e NaClO<sub>2</sub>, em um período de 72 h de incubação com promastigotas axênicas (4x10<sup>5</sup> parasitos/poço), obteve IC<sub>50</sub> médio de 9,66 µM – intervalo de confiança de 95% (9,12 – 10,22 µM) – a partir de 3 ensaios independentes.

Sabendo-se que não há correlação entre as atividades promastigotas e amastigotas frente a compostos com potencial leishmanicida (OSORIO *et al.*, 2006), a atividade do NaClO<sub>2</sub> foi aqui determinada sobre amastigotas intracelulares de *L.braziliensis* em macrófagos peritoneais murinos. Os resultados aqui obtidos mostraram que o composto não apresentou atividade (reduções nas taxas de infecção e número de parasitos/célula infectada) sobre esta forma evolutiva nas concentrações testadas (3,5; 7,0; 14; 28; 42 µM) e (50, 100, 300, 600 µM), quando comparadas ao controle (p >0.05) – Figuras 17 e 19.

As concentrações de clorito de sódio foram aumentadas, pois estudos já mostraram atividade concentração-dependente de drogas leishmanicidas, contra formas amastigotas intracelulares. Macrófagos infectados com *L.amazonensis*, tratadas com boldina apresentou uma resposta na redução da infecção de forma concentração-dependente, onde na menor concentração testada (50 µg/mL) houve redução de 50% da infecção, enquanto que 600 µg/mL houve uma redução de 96% (SALAMA; ARRAIS-LIMA; ARRAIS-SILVA, 2017).

Assim também foi para DAC N-055, quando testado contra formas amastigotas intracelulares de *L. tropica*, onde na menor concentração testada (40  $\mu\text{M}$ ) não houve reduções significativas na taxa de infecção de macrófagos e no número de parasitos/macrófagos infectados. Enquanto que, na maior concentração testada (400  $\mu\text{M}$ ) houve redução significativa ( $p < 0.01$ ) em ambos os parâmetros avaliados (JEBRAN *et al.*, 2014).

Neste contexto, o aumento nas concentrações de  $\text{NaClO}_2$ , testadas sobre amastigotas intracelulares, obedeceram os resultados obtidos quanto a citocompatibilidade da droga com macrófagos murinos. Observou-se, que tanto  $\text{NaClO}_2$  quanto Anf-B, apresentaram citocompatibilidade em altas concentrações, onde  $\text{NaClO}_2$  só apresentou toxicidade para estas drogas ( $p < 0.05$ ) a partir de 625  $\mu\text{M}$  e  $\text{CC}_{50}$  médio de 856,3  $\mu\text{M}$  e Anf-B não mostrou toxicidade nas concentrações testadas ( $p > 0.05$ ), sendo a maior delas 50  $\mu\text{M}$ . Diante destes resultados e dos valores obtidos de  $\text{IC}_{50}$  para promastigotas, ambas as drogas apresentaram um bom índice de seletividade (comparação da quantidade de um agente terapêutico que causa o efeito terapêutico à quantidade que causa toxicidade): 88, 6 e  $>454,5$  para  $\text{NaClO}_2$  e Anf-B, respectivamente.

Sabe-se que, a seletividade terapêutica é um grande desafio na descoberta de medicamentos (HOPKINS, 2008) e, apesar do aumento nos gastos com pesquisa e desenvolvimento, muitos candidatos a medicamentos falham porque há pouco efeito terapêutico em concentrações não tóxicas (HUGHES, 2008). Em estudo que objetivou avaliar atividades citotóxicas e leishmanicida de monoterpenos aromáticos sintéticos, observou-se que dentre os 9 protótipos testados, apenas 1 deles mostrou um índice de seletividade (IS) considerável (18) com relação a sua atividade sobre amastigotas intracelulares (13,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e sua citotoxicidade sobre promonócitos humanos, apesar de outros três compostos terem apresentado uma boa atividade sobre amastigotas (26; 43 e 58,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), porém um baixo IS: 1,9; 3,3; 1,7, respectivamente (OSORIO *et al.*, 2006).

Além dos testes de citocompatibilidade terem sido testados sobre macrófagos murinos, dentro do contexto de que a formulação aqui proposta é para administração tópica, a citotoxicidade dos compostos avaliadas foram testadas sobre queratinócitos humanos (HaCaT). Resultados mostraram que o perfil de citocompatibilidade e citotoxicidade dos compostos sobre queratinócitos foi bem similar ao perfil mostrado para macrófagos:  $\text{NaClO}_2$  apresentou citotoxicidade a partir de 1250  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) e  $\text{CC}_{50}$  média de 745,3  $\mu\text{M}$  e Anf-B mostrou-se citocompatível até na maior concentração testada (50  $\mu\text{M}$ ).



Conforme mencionado anteriormente, a citotoxicidade de drogas, sobre células do hospedeiro, continua sendo um problema na triagem por novas drogas. Todos os anos, vários milhares de novas entidades químicas passam por triagem em várias culturas de células, mas, eventualmente, não atingem o status da droga devido a efeitos colaterais graves (BADISA *et al.*, 2010). Dado isso, as combinações de medicamentos são uma estratégia estabelecida para alcançar a seletividade terapêutica, seja contrabalançando a compensação biológica, poupando doses em cada composto ou acessando mecanismos multialvo específicos ao contexto (KEITH; BORISY; STOCKWELL, 2005).

Outrossim, apesar dos resultados aqui obtidos com NaClO<sub>2</sub> sobre as formas amastigotas intracelulares, estudos mostram que a atividade de uma droga em combinação pode ser melhor do que sua atividade isolada. Jabini *et al.*, 2015 mostraram que a atividade isolada de Glucantime a 25 µg/mL não foi capaz de reduzir, de forma estatisticamente significativa, a % de macrófagos infectados com *L.major*. Enquanto que, quando na presença de silimarina (25 µM ou 12,5 µM) houve redução significativa ( $p < 0.05$ ) na % de macrófagos infectados (JABINI *et al.*, 2014). Além disso, mostrou-se aqui que a interação entre NaClO<sub>2</sub> e Anf-B mostrou-se aditiva, com índice de combinação =  $0,98 \pm 0,09$  (Tabela 6) quando as drogas foram combinadas em 3 proporções diferentes (NaClO<sub>2</sub>/Anf-B): (5:1; 1:1; 1:5).

Desta forma, combinações de Anf-B/ NaClO<sub>2</sub> foram avaliadas em diferentes concentrações (Figura 22) 0,01/400 µM; 0,05/600 µM e 0,01/600 µM, respectivamente, entretanto nenhuma atividade nos parâmetros avaliados, para atividade sobre amastigotas intracelulares, foi observada ( $p > 0.05$ ), em relação ao controle. Da mesma forma foi observado para as drogas nas mesmas concentrações, em monoterapia (Figuras 20 e 21), apenas Anf-B na concentração de 0,05 µM reduziu a % de macrófagos infectados, em relação ao controle ( $p < 0,01$ ).

O resultado aqui encontrado, onde houve divergência quanto a atividade do NaClO<sub>2</sub> sobre as formas evolutivas de *L. braziliensis*, bem como encontrado em outros estudos (JABINI *et al.*, 2014; OSORIO *et al.*, 2006), são justificáveis pelo fato que as características celulares, moleculares e bioquímicas das formas promastigotas diferem consideravelmente das amastigotas (as formas responsáveis pelas manifestações clínicas no homem), de modo que o valor terapêutico das drogas anti-*Leishmania* deve ser avaliado e validado nas últimas (OSORIO *et al.*, 2006). Em seus estudos, Jabini *et al.*, 2014, mostraram que silimarina não obteve atividade eficaz sobre formas promastigotas de *L. major*, enquanto que, em combinação com Glucantime<sup>®</sup>, mostrou ter atividade sobre amastigotas intracelulares

(JABINI *et al.*, 2014). Além do mais, Osorio *et al.*, 2006, em um screening de avaliação da atividade de monoterpenos sintéticos, mostraram que todas as nove drogas testadas sobre as formas evolutivas de *L. panamensis* mostraram valores de EC<sub>50</sub> divergentes sobre elas, em algumas situações maiores para promastigotas do que para amastigotas e vice-versa (OSORIO *et al.*, 2006).

Apesar da forma promastigota de *Leishmania* ser a forma extracelular do parasito e a forma amastigota ser mais resistente ao microambiente, potencialmente tóxico, do hospedeiro, nem sempre as drogas em estudo serão mais tóxicas para a forma intracelular. Corroborar-se isto com fato de que Anfotericina B, por exemplo, ativa um *burst* oxidativo sobre macrófagos infectados, potencializando seu efeito (WOLF; MASSOF, 1990). Acrescenta-se o fato de Glucantime<sup>®</sup> ser muito mais tóxico para amastigotas intracelulares que contra promastigotas extracelulares (CE<sub>50</sub> = 6,7 µg/ml e 4,0 mg/ml, respectivamente) (OSORIO *et al.*, 2006).

Além de estudos mostrarem variações nas respostas às drogas frente as diferentes formas evolutivas de parasitos, bem como nas diferentes espécies de *Leishmania spp.*, outros estudos mostram também que essa variação ocorre quando muda o cenário de *in vitro* para *in vivo*. Croft e Seifert, 2006 em um estudo que buscou adquirir dados para identificar combinações (anfotericina B, estibogluconato de sódio, paromomicina e sitamaquina) de miltefosina, *in vitro* e *in vivo*, para a terapia da leishmaniose visceral, mostraram que os índices de combinação variaram quando mudou-se o cenário de *in vitro* para *in vivo*. Os autores mostraram que *in vitro* apenas a combinação entre miltefosina e estibogluconato de sódio mostrou-se sinérgica (IC = 0,61-0,75), enquanto que *in vivo* apenas as combinações entre miltefosina/anfotericina B e miltefosina/paromomicina mostraram ter a capacidade de potencializar a atividade de miltefosina (CROFT; SEIFERT, 2006).

O modelo amastigota de *Leishmania* intramacrófago é atualmente considerado o padrão ouro para a caracterização da suscetibilidade *in vitro* a medicamentos. A execução deste ensaio, com um rendimento suficientemente alto, para *screening* de compostos de tamanho é tecnicamente e financeiramente desafiador, devido à sua complexidade e robustez limitados (NÜHS *et al.*, 2015). Entretanto, o rastreamento contra o estágio promastigota, embora mais prático, não identifica todos os compostos ativos e leva a inúmeros falso-positivos (DE MUYLDER *et al.*, 2011). Callahan *et al.*, 1997 avaliaram a atividade de 6 drogas sobre promastigotas, amastigotas intracelulares e axênicas de *Leishmania mexicana*, ao comparar a atividade das drogas sobre cada forma evolutiva, os resultados mostraram que

as IC<sub>50</sub> sobre promastigotas e amastigotas intracelulares diferiram em quatro dos seis fármacos testados, enquanto que as IC<sub>50</sub> entre amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares diferiram apenas para uma droga, dentre as 6 testadas (CALLAHAN *et al.*, 1997).

Neste contexto, a fim de avaliar se a atividade de NaClO<sub>2</sub> sobre amastigotas intracelulares não foi eficaz pelo fato da droga não ter a capacidade de entrar nos macrófagos e atuar sobre os parasitos, ensaios foram realizados sobre a forma axênica de amastigotas e a viabilidade destas formas foi avaliada comparando-se ao controle. As concentrações de NaClO<sub>2</sub> testadas (50, 100, 200 e 400 µM) não mostraram atividade (p >0.05) sobre as amastigotas mesmo de forma direta. Conclui-se que, NaClO<sub>2</sub> não foi capaz de atuar sobre a atividade de macrófagos e reduzir a viabilidade de amastigotas e nem foi capaz de reduzir a atividade de amastigotas em cultura axênica.

O mecanismo de ação de NaClO<sub>2</sub> foi relacionado à sua capacidade de produzir hipoclorito e espécies reativas de oxigênio, mas os alvos intracelulares responsáveis pelos seus efeitos são praticamente desconhecidos (STAHL *et al.*, 2014). Até onde se sabe, este é o primeiro estudo a mostrar as alterações morfológicas e ultraestruturais de NaClO<sub>2</sub> sobre formas promastigotas de *Leishmania*. As imagens aqui obtidas, mostraram alterações ultraestruturais importantes (Figura 15), foram elas: Inchaço celular com redução de material eletrodense do citoplasma, alterações mitocondriais também foram observadas (perda de material eletrodense, inchaço, aumento do comprimento e desorganização das cristas mitocondriais e formato celular foram observados) e vacuolização difusa.

Desta maneira, imagens, com alterações similares, foram encontradas em um estudo que objetivou investigar o efeito *in vitro* de DETC, os resultados mostraram alterações em nível de mitocôndria (aumento do tamanho, densidade eletrônica reduzida e cristas circulares) sobre promastigotas axênicas de *L.amazonensis*. Em conjunto com outros resultados, os autores concluíram que DETC aumenta a produção de ânions superóxido (CELES *et al.*, 2016). Outro estudo que buscou avaliar o efeito de alicina sobre *Leishmania* encontrou alterações ultraestruturais características de danos oxidativo: inchaço celular, redução da densidade eletrônica do citoplasma e vacuolização. Os resultados deste estudo sugeriram um efeito da alicina sobre o sistema de defesa antioxidante, bem como o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (CORRAL-CARIDAD *et al.*, 2012).

Ainda neste contexto, o tratamento de promastigotas axênicas com NaClO<sub>2</sub> também causou alterações morfológicas importantes e também trouxeram indícios de mecanismo de

ação da droga. Os principais achados por microscopia eletrônica de varredura mostraram as principais alterações em nível de: descontinuidade e encolhimento da superfície celular e multiplicidade do flagelo (Figura 6). Estes achados trazem indícios de: estresse oxidativo, perda citoplasmática e divisão celular prejudicada, respectivamente (VANNIER; DE CASTRO, 2009).

Com base nos resultados obtidos a partir dos ensaios de viabilidade (Figura 23) e microscopias (Figuras 12 e 13) sobre a ação do  $\text{NaClO}_2$  sobre amastigotas axênicas de *L.braziliensis*, decidiu-se não adicionar o mesmo às formulações semissólidas aqui desenvolvidas.

Portanto, foram desenvolvidos 6 tipos de formulações: Gel hidrofílico contendo nanopartículas de Anf-B; Pomada hidrofílica contendo nanopartículas de Anf-B; Creme não-iônico contendo nanopartículas de Anf-B; Gel hidrofílico contendo Anf-B livre; Pomada hidrofílica contendo Anf-B livre; Creme não-iônico contendo Anf-B livre. Para todas estas formulações, foram realizados caracterizações (aspectos organolépticos e físico-químicos) e estudo de estabilidade (14 dias).

Para análise dos aspectos organolépticos, as formulações em branco de cada base semissólida (Gel hidrofílico, Pomada hidrofílica e Creme não-iônico) foram utilizadas como padrão (Figura 28). Com relação aos aspectos organolépticos, todas as formulações contendo Anf-B tomaram coloração amarelada, devido à cor da suspensão de nanopartículas e da solução de Anf-B em DMSO. Os aspectos físico-químicos também variaram a cada tipo de base e a cada tipo de formulação (contendo Anf-B em nanopartículas e Anf-B livre), quanto ao pH, todas as formulações contendo Anf-B tiveram o pH diminuído com relação à formulação em branco. O mesmo ocorreu nas formulações em gel contendo Anf-B de Salerno *et al.*, 2015 (SALERNO *et al.*, 2015). Este achado corrobora a incorporação de Anf-B às bases.

Ademais, todas as formulações foram acompanhadas em tempos pré-determinados ao longo de 14 dias, ao final todas as formulações mantiveram seus aspectos organolépticos, quando comparados ao dia das formulações e quanto aos aspectos físico-químicos (pH e condutividade elétrica) as variações foram amenas. Para tanto, corroboram estes achados de estabilidade o teste da centrífuga realizado no dia da formulação e 14 dias após, em ambos os tempos não houve sinais de instabilidade das formulações, tais quais: precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (Figura 31).

A eficácia de qualquer produto utilizado através da via tópica está diretamente relacionada à liberação do fármaco da forma farmacêutica para pele ou mucosa. Os ensaios

de liberação durante o desenvolvimento de uma formulação identificam variáveis críticas de um processo e garantem a qualidade da formulação final (SIEWERT *et al.*, 2003). Apesar desse tipo de ensaio ainda não ser preconizado pela legislação brasileira para formulações líquidas e semissólidas destinadas para uso tópico (ZARONI *et al.*, 2013), sua importância é indiscutível no desenvolvimento de novas formulações.

Os perfis de liberação *in vitro* de Anf-B, a partir das nanoformulações e das formulações contendo-a livre, pode ser observada no gráfico apresentado nas Figuras 32 e 33. É muito importante observar que não houve nenhum efeito *burst* de liberação nas formulações desenvolvidas, sugere-se que o fármaco apresentou boa interação com os componentes das bases semissólidas e menor com o meio receptor (HUSSAIN *et al.*, 2016). Ademais, nenhuma das formulações liberou 100% do fármaco, o que sugere que alguma quantidade da droga pode ter interagido com a membrana de diálise utilizada.

Conforme esperado, e como já mostrado em outro estudo (HUSSAIN *et al.*, 2016), a Anf-B incorporada em sistema nanoestruturado apresentou um perfil de liberação mais lento, assim como ao final do tempo de estudo (12h). As nanoformulações em pomada (PHNLS) e creme (CNLS) liberam uma quantidade menor de Anf-B (57% e 62%, respectivamente), sugere-se que estas formulações apresentaram maior interação com o sistema nanoparticulado contendo o fármaco, ademais é sugerido que a presença de parafina, emulsificantes e carbopol em bases semissólidas geram uma liberação mais lenta de fármacos (GANESHPURKAR *et al.*, 2014; HUSSAIN *et al.*, 2016). Dentro deste cenário, a nanoformulação base gel de carbopol (GHNLS) foi a que apresentou a liberação mais lenta da Anf-B.

Quanto às formulações contendo Anf-B livre, apenas a formulação em creme (CAB) liberou o fármaco de forma mais lenta (45% em 12 horas), reforçando o fato que a presença de parafina e emulsificantes retarda a liberação de fármacos. As formulações em gel (GHAB) e pomada (PHAB) apresentaram um perfil de liberação mais acelerado e ao final das 12 horas liberou 81% de Anf-B. Estes resultados corroboram que o fármaco livre é liberado de forma mais rápida de bases semissólidas quando comparado à nanoformulações.

As nanoformulações apresentaram liberação de Anf-B em 12 horas, cerca de 50% do fármaco, sugere-se que a outra metade seja liberada dentro de 24 horas, desta forma estas formulações seriam mais convenientes para que os pacientes aplicassem em um intervalo de tempo menor estas formulações. \

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que o  $\text{NaClO}_2$  apresenta atividade sobre promastigotas de *L.braziliensis* e quando associado à Anfotericina-B resulta em um efeito aditivo sobre a redução da viabilidade de promastigotas. Imagens de MEV e MET sugerem um efeito por aumento do estresse oxidativo de  $\text{NaClO}_2$  sobre estas formas parasitárias. Não foi observado efeito do  $\text{NaClO}_2$  sobre a viabilidade de amastigotas intra e extracelulares. Desta forma, as nanoformulações desenvolvidas exploraram a monoterapia com Anfotericina-B utilizando nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Formulações semi-sólidas contendo estes nanocarreadores demonstraram-se estáveis e com um perfil de liberação de Anfotericina-B mais lento com relação às formulações contendo este fármaco livre, disperso na base semi-sólida.

Por fim, este trabalho foi pioneiro na demonstração da atividade do  $\text{NaClO}_2$  em uma espécie de *Leishmania* do Novo Mundo. Por outro lado, apresenta um conjunto de dados sobre o potencial farmacotécnico de nanoformulações contendo Anfotericina-B, abrindo novas possibilidades de pesquisa e desenvolvimento tecnológico para uma nova formulação tópica deste fármaco na terapêutica da LTA.

**REFERÊNCIAS**

- AFONSO, M. M. S. **Estudos sobre algumas populações brasileiras de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): Morfologia, morfometria e hábitos alimentares**. 2008. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86–90, ago. 2017.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. *et al.* Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853–882, dez. 2003.
- ANTONIO, L. de F. *et al.* Effect of secondary infection on epithelialisation and total healing of cutaneous leishmaniasis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 9, p. 640–646, set. 2017.
- BADISA, R. *et al.* Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. **Anticancer Research**, v. 29, n. 8, p. 2993–2996, 2010.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 1, p. 1–10, jan. 2011.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, set. 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2013.
- BRUNI, N. *et al.* Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5289–5311, jul. 2017.
- CALLAHAN, H. *et al.* An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, n. 4, 1997.
- CELES, F. S. *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 38330, dez. 2016.
- CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27–55, 1984.
- COPELAND, N. K.; ARONSON, N. E. Leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious**

- Diseases**, v. 28, n. 5, p. 426–437, out. 2015.
- CORRAL-CARIDAD, M. *et al.* Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 475–482, 2012.
- COSTA, T. L. DA. **Estudo do metabolismo energético de *Leishmania spp* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear**. Universidade Federal de Goiás, 2011.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, jan. 2006.
- CROFT, S.; SEIFERT, K. In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.
- DE CARVALHO, R. F. *et al.* Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 217–222, out. 2013.
- DE MENEZES, J. P. B. *et al.* Advances in development of new treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.
- DE MUYLDER, G. *et al.* A Screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 7, 2011.
- DU PLESSIS, J.; WEINER, N.; MÜLLER, D. G. The influence of in vivo treatment of skin with liposomes on the topical absorption of a hydrophilic and a hydrophobic drug in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 103, n. 2, p. R1–R5, mar. 1994.
- EL-ON, J. *et al.* Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 26, n. 5, p. 745–51, 25 nov. 1984.
- ESFANDIARPOUR, I.; DABIRI, S. H. Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: a clinical and histologic study. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 8, p. 848–852, ago. 2007.
- FERREIRA, L. S. *et al.* In Vitro Skin Permeation and Retention of Paromomycin from Liposomes for Topical Treatment of the Cutaneous Leishmaniasis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 3, p. 289–296, 3 jan. 2004.
- FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097–4102, 1 nov. 2004.
- FORTENBACH, C. R.; MODJTAHEDI, B. S.; MAIBACH, H. I. Role of physical chemical properties in drug relay into skin compartments. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 6, p. 294–299, 2008.



FRANCIS, A. P.; GURUDEVAN, S.; JAYAKRISHNAN, A. Synthetic polymannose as a drug carrier: synthesis, toxicity and anti-fungal activity of polymannose-amphotericin B conjugates. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 13, p. 1529–1548, set. 2018.

FRANCO, L.; BOCHI, L. Produção e caracterização de diferentes formulações tópicas semissólidas contendo meloxicam na forma nanoestruturada. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 9, n. 16, p. 209–231, 2013.

GANESHPURKAR, A. *et al.* Delivery of Amphotericin B for Effective Treatment of Candida Albicans Induced Dermal Mycosis in Rats via Emulgel System: Formulation and Evaluation. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 4, p. 369–374, 2014.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Leishmania donovani Develops Resistance to Drug Combinations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. e1974, 20 dez. 2012.

GLASGOW, L. A. *et al.* Enhancement of resistance to murine osteogenic sarcoma in vivo by an extract of Brucella abortus (Bru-Pel): association with activation of reticuloendothelial system macrophages. **Infection and Immunity**, v. 23, n. 1, p. 19–26, jan. 1979.

GONÇALVES, G. S. *et al.* Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Acta Tropica**, v. 93, n. 2, p. 161–167, fev. 2005.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003.

GOVERNO DO BRASIL. **Casos de leishmaniose caem no País, mas doença ainda requer atenção**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao>. Acesso em: 13 jan. 2018.

GROGL, M. *et al.* Successful topical treatment of murine cutaneous leishmaniasis with a combination of paromomycin (Aminosidine) and gentamicin. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 354–9, abr. 1999.

GUPTA, S. *et al.* Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 4, p. 267, 2013.

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; DRIER-JONAS, S.; JIMÉNEZ-ARELLANES, M. A. Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1105–1110, dez. 2017.

HONZAK, L.; SENTJURC, M.; SWARTZ, H. M. In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applied to the skin of hairless and normal mice. **Journal of Controlled Release**, v. 66, n. 2–3, p. 221–228, maio. 2000.

HOPKINS, A. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature**

**Chemical Biology**, p. 682–690, 2008.

HUGHES, B. 2007 FDA drug approvals: a year of flux. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 107–109, 2008.

HUSSAIN, A. *et al.* Formulation and optimization of nanoemulsion using antifungal lipid and surfactant for accentuated topical delivery of Amphotericin B. **Drug Delivery**, v. 23, n. 8, p. 3101–3110, 12 out. 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) FORUM ON MICROBIAL THREATS. The Causes and impacts of neglected tropical and zoonotic diseases: opportunities for integrated intervention strategies. In: **The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases: Opportunities for Integrated Intervention Strategies**. Washington, DC. [s.n.].

ISAAC-MÁRQUEZ, A. P.; LEZAMA-DÁVILA, C. M. Detection of pathogenic bacteria in skin lesions of patients with chiclero's ulcer: reluctant response to antimonial treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1093–1095, dez. 2003.

JAAFARI, M. R. *et al.* Effect of Topical Liposomes Containing Paromomycin Sulfate in the Course of Leishmania major Infection in Susceptible BALB/c Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2259–2265, 1 jun. 2009.

JABINI, R. *et al.* Effects of combined therapy with silymarin and glucantime on Leishmaniasis induced by Leishmania major in BALB/c Mice. **Drug Research**, v. 65, n. 03, p. 119–124, 12 mar. 2014.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23–24, p. 1272–1281, dez. 2013.

JEBRAN, A. F. *et al.* Rapid healing of cutaneous leishmaniasis by high-frequency electrocauterization and hydrogel wound care with or without DAC N-055: A Randomized controlled phase iia trial in Kabul. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2694, 13 fev. 2014.

KALANTARI, H. *et al.* Effect of topical nanoliposomes of paromomycin on rats liver and kidney. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, n. 4, p. e17565, nov. 2014.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–45, set. 2006.

KEITH, C.; BORISY, A.; STOCKWELL, B. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Reviews Drug Discovery**, p. 71–78, 2005.

KRAUSE, G.; KROEGER, A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 92–4, 1994.

KUMAR, R. *et al.* Immune checkpoint targets for host-directed therapy to prevent and treat Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 8 nov. 2017.

- LAGE, L. M. DOS R. *et al.* An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 11, p. 4083–4095, nov. 2016.
- MACHADO-COELHO, G. L. L. *et al.* Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 1, p. 55–61, jan. 2005.
- MARQUES, A.; MASUR, H. Manifestações clínicas. In: **Tratado de Infectologia**. 2<sup>a</sup> ed. Editora Atheneu, 1998. p. 1–24.
- MARTINS, S. *et al.* Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1–2, p. 216–227, 2012.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, jan. 2014.
- MERINO-ESPINOSA, G. *et al.* Cutaneous leishmaniasis by *Leishmania infantum*: behind granulomatous lesions of unknown aetiology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, ago. 2017.
- MIGDAL, C.; SERRES, M. Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. **médecine/sciences**, v. 27, n. 4, p. 405–412, abr. 2011.
- MINAMI, A.; MASUDA, K. Statistical observations of cystosarcoma phyllodes. **Geka chiryo. Surgical therapy**, v. 19, n. 1, p. 12–20, jul. 1968.
- MORIZOT, G. *et al.* Travelers with cutaneous leishmaniasis cured without systemic therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, p. 370–380, ago. 2013.
- MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR, R. Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 4, p. 349, 2009.
- MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161–77, jul. 2000.
- MUSA, A. *et al.* Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin Combination Compared to SSG for Visceral Leishmaniasis in East Africa: A Randomised Controlled Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1674, jun. 2012.
- NASCIMENTO, A. A. D. S. **Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Diptera : Psychodidae)* Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- NEAL, R. A. *et al.* The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 5, p. 577–584, maio 1995.

- NÜHS, A. *et al.* Development and validation of a novel leishmania donovani screening cascade for high-throughput screening using a novel axenic assay with high predictivity of leishmanicidal intracellular activity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 2015.
- ORIQUI, L. R.; MORI, M.; WONGTSCHOWSKI, P. Guia para a determinação da estabilidade de produtos químicos. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 340–347, 2013.
- OSORIO, E. *et al.* Antileishmanial and cytotoxic activity of synthetic aromatic monoterpenes. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 405–413, 2006.
- PAHO. **PAHO WHO | Leishmaniasis**. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754). Acesso em: 4 jan. 2018.
- PEREZ, A. P. *et al.* Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 190–198, 2016.
- PETERSEN, A. L. DE O. A. *et al.* 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.
- PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, dez. 2017.
- ROBERTS, M. T. M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v. 75–76, n. 1, p. 115–130, fev. 2006.
- SADEGHIAN, G. *et al.* Decreased effect of glucantime in cutaneous leishmaniasis complicated with secondary bacterial infection. **Indian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 1, p. 37, 2011.
- SALAMA, I.; ARRAIS-LIMA, C.; ARRAIS-SILVA, W. Evaluation of Boldine Activity against Intracellular Amastigotes of Leishmania amazonensis. **Korean Journal of Parasitology**, v. 55, n. 3, p. 337–340, 2017.
- SALERNO, C. *et al.* Novel gel-like microemulsion for topical delivery of Amphotericin B. **Revista Colombiana de Ciencias Química Farmacêutica**, v. 44, n. 3, p. 359–381, 2015.
- SALGADO, V. R. *et al.* The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 241–251, abr. 2016.
- SANTOS, C. *et al. et al.* Amphotericin B-Loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: development, characterization, and in vitro skin permeation studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 322–329, abr. 2012.
- SANTOS, A. M. DOS *et al.* Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41,

n. 5, p. 444–448, out. 2008.

SBMT. **Leishmaniose tegumentar americana: novo medicamento**. Disponível em: <http://www.sbmt.org.br/portal/leishmaniose-tegumentar-americana-populacoes-economicamente-desfavorecidas-podem-contar-com-novo-medicamento/>. Acesso em: 9 jan. 2018.

SCHAFERKORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 6, p. 427–443, jul. 2007.

SCORZA, B.; CARVALHO, E.; WILSON, M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, jun. 2017.

SOARES-BEZERRA, R.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracellular molecules as a drug target. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 139–149, 2004.

SOTO, J. *et al.* Topical paromomycin/methylbenzethonium chloride plus parenteral meglumine antimonate as treatment for American cutaneous leishmaniasis: controlled study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 56–58, jan. 1998.

STAHL, H.-C. *et al.* A randomized controlled phase IIb wound healing trial of cutaneous leishmaniasis ulcers with 0.045% pharmaceutical chlorite (DAC N-055) with and without bipolar high frequency electro-cauterization versus intralesional antimony in Afghanistan. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 619, dez. 2014.

STAHL, K.; SAKHAYEEEE, I. Lupoid cutaneous leishmaniasis in Afghanistan treated with 0.045% DAC N-055. **BMC Proceedings**, v. 5, n. Suppl 6, p. P247, 2011.

SUNDAR, S. *et al.* Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, fev. 2011.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 1 set. 2017.

SURI, S.; FENNIRI, H.; SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 16, 2007.

TEIXEIRA, D. E. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1° ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ., 2013.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, maio 2017.

TRINCONI, C. T. *et al.* Combination Therapy with Tamoxifen and Amphotericin B in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.

58, n. 5, p. 2608–2613, maio 2014.

TRINCONI, C. T. *et al.* Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, p. 1–7, mar. 2017.

VANNIER, M.; DE CASTRO, S. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 246–260, 2009.

WHO. WHO. **Leishmaniasis**. WHO, 2017a.

WHO. WHO. **The top 10 causes of death**. WHO, 2017b.

WHO. WHO. **Epidemiological situation**. WHO, 2017c.

WOLF, J.; MASSOF, S. In vivo activation of macrophage oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. **Infection and Immunity**, p. 1296–300, 1990.

ZARONI, M. *et al.* Orientações normativas relativas a medicamentos dermatológicos no Brasil e em outros países. In: VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F A **Regulação de Medicamentos no Brasil**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. In: **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.