

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RAPHAELA ARIANY DOS SANTOS SILVA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE
LIPOSSOMAS CONTENDO ALUMÍNIO-CLORO-FTALOCIANINA
COMBINADA À TERAPIA SISTÊMICA PARA TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2021

RAPHAELA ARIANY DOS SANTOS SILVA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE
LIPOSSOMAS CONTENDO ALUMÍNIO-CLORO-FTALOCIANINA
COMBINADA À TERAPIA SISTÊMICA PARA TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar.

Coorientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira.

Belo Horizonte

2021

S586a Silva, Raphaela Ariany dos Santos.
Avaliação da eficácia da administração tópica de lipossomas contendo alumínio-cloro-ftalocianina combinada à terapia sistêmica para tratamento da leishmaniose cutânea experimental / Raphaela Ariany dos Santos Silva. – 2021.
81 f. : il.

Orientadora: Marta Marques Gontijo de Aguiar.

Coorientadora: Mônica Cristina de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Leishmaniose cutânea – Teses. 2. Alumínio-Cloro-Ftalocianina – Teses. 3. Terapêutica – Teses. 4. Lipossomos – Teses. I. Aguiar, Marta Marques Gontijo de. II. Oliveira, Mônica Cristina de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.778



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE LIPOSSOMAS CONTENDO ALUMÍNIO CLORO FTALOCIANINA COMBINADA A TERAPIA SISTÊMICA PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

RAPHAELA ARIANY DOS SANTOS SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Dra. Sávaia Caldeira de Araújo Lopes
Hospital de Aeronáutica de Lagoa Santa

Prof. Dr. Leandro Gonzaga de Oliveira
Centro Universitário UNA

Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 30 de agosto de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Savía Caldeira de Araújo Lopes, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Monica Cristina de Oliveira, Membro**, em 30/08/2021, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marta Marques Gontijo de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 30/08/2021, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Gonzaga de Oliveira, Usuário Externo**, em 01/09/2021, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0914064** e o código CRC **C40F51AC**.

COLABORADORES

Dr. Antonio Claudio Tedesco – Departamento de Química – Universidade de São Paulo

Dr. Celso Martins Queiroz Junior – Departamento Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Lucas Antônio Ferreira – Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Paulo Eduardo Souza – Instituto de Física- Universidade de Brasília

Dr^a Eliane de Moraes Teixeira - Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz/Minas

Dr^a Danielle Sóter do Nascimento Damasio – Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais

Ma. Líndicy Leidicy Alves – Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz/Minas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades, aprendizados e pelas pessoas que encontrei nesta trajetória.

À professora Marta por tanta dedicação, disponibilidade aos experimentos e em tirar dúvidas, paciência, pelo exemplo pessoal e profissional e todo conhecimento compartilhado. Muito obrigada por incentivar na busca do conhecimento.

À professora Mônica pelas oportunidades, pelos ensinamentos transmitidos, esclarecimentos, paciência, atenção e pelo exemplo como ser humano e profissional.

À minha família, pelo apoio e amor incondicional.

Ao Ênio, pelo amor, paciência, incentivo aos estudos e por toda dedicação comigo.

À Carol e Larissa, pelo apoio, companheirismo e por tornar esses anos leves e divertidos.

À Dani, agradeço a disponibilidade, ajuda, ensinamento e paciência durante os experimentos. Sua amizade foi um presente fruto deste trabalho.

Ao Celso agradeço pela disponibilidade, atenção e aprendizado.

À professora Eliane e a Lindicy pela solicitude em contribuir neste projeto.

Aos funcionários da faculdade de farmácia, em especial para Adelaide, Batista, Ernane e Nazaré, agradeço imensamente pelo auxílio e disponibilidade quando solicitados.

Aos professores André Barros, Elaine, Gisele e Lucas, agradeço pela contribuição na minha formação.

Aos alunos do LTF, sou grata por toda ajuda e aprendizado nos experimentos.

Enfim, agradeço a todos que participaram, torceram e incentivaram a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Decorridas várias décadas de estudos relativos às leishmanioses, ainda não existe tratamento realmente eficaz e atóxico para as diferentes formas clínicas dessa parasitose. Compostos antimoniais pentavalentes são utilizados como primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, incluindo a leishmaniose cutânea (LC), porém, apresentam fatores que limitam sua utilização, tais como alta toxicidade, baixa adesão e a via de administração parenteral. O desenvolvimento de terapias alternativas, incluindo a identificação de medicamentos eficazes para o tratamento tópico e/ou oral da LC é desejável. Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) tópica associada ao tratamento sistêmico é uma alternativa interessante. A TFD se baseia na ativação de uma molécula fotossensibilizante, como a alumínio-clorofalocianina (AICIFc), a qual produz espécies reativas de oxigênio que induzem a destruição do parasito. Como alternativa para o tratamento oral, o Fexinidazol (Fex), um nitroimidazol, também vem sendo pesquisado para o tratamento da LC. Todavia, tanto AICIFc quanto o Fex apresentam limitações, entre elas a baixa solubilidade em água. Assim este trabalho propõe preparar lipossoma contendo AICIFc (Lip-AICIFc) e sistema auto emulsionável de liberação de fármacos contendo Fex (SEDDS-Fex), caracterizar química e físico-quimicamente estes sistemas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, teor e concentração; e avaliar a eficácia no tratamento da LC em animais infectados com *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) major*. Foram preparados dois lotes de cada uma das formulações: Lip-AICIFc 1 e 2 e SEDDS-Fex 1 e 2. Como as formulações apresentaram características físico-químicas adequadas para as vias de administração propostas, foram conduzidos os estudos de eficácia. Camundongos BALB/c foram infectados com *L. (L.) amazonensis*, separados em grupos e tratados com: Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Glucantime[®], combinação Lip-AICIFc+SEDDS-Fex, combinação Lip-AICIFc+Glucantime[®] e controle (sem tratamento). Os resultados mostraram que houve estabilização no tamanho das lesões dos animais tratados com as combinações Lip-AICIFc+Glucantime[®] e Lip-AICIFc+SEDDS-Fex, sem redução significativa da carga parasitária na lesão. Entretanto, a combinação Lip-AICIFc+SEDDS-Fex foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço. Os animais infectados com *L. (L.) major* foram tratados com: Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, combinação Lip-AICIFc+SEDDS-Fex, suspensão-Fex e controle (sem tratamento).

Os resultados mostraram que houve redução no tamanho das lesões dos animais tratados com a combinação Lip-AICIFc+SEDDS-Fex, com redução significativa da carga parasitária na lesão e no baço. Assim, os resultados obtidos neste trabalho apontam que combinação Lip-AICIFc+SEDDS-Fex pode ser promissora para o tratamento da LC causada por *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) major*.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea; alumínio-cloro-ftalocianina; lipossomas; fexinidazol; sistema autoemulsionável de liberação de fármacos.

ABSTRACT

After several decades of studies on leishmaniasis, there is still no really effective and non-toxic treatment for the different clinical forms of this parasitosis. Pentavalent antimonial compounds are used as the first choice for the treatment of leishmaniasis, including cutaneous leishmaniasis (CL), however, they have factors that limit their use, such as high toxicity, low adherence and the route of parenteral administration. The development of alternative therapies, including the identification of effective drugs for the topical and/or oral treatment of CL, is desirable. In this context, topical photodynamic therapy (PDT) associated with systemic treatment is an interesting alternative. PDT is based on the activation of a photosensitizing molecule, such as chloro-aluminum-phthalocyanine (AICIFc), which produces reactive oxygen species that induce the destruction of the parasite. As an alternative to oral treatment, Fexinidazole (Fex), a nitroimidazole, has also been researched for the treatment of CL. However, both AICIFc and Fex have limitations, including low water solubility. Thus, this work proposes to prepare liposome containing AICIFc (Lip-AICIFc) and self-emulsifying drug delivery systems containing Fex (SEDDS-Fex), to characterize chemically and physicochemically these systems regarding size, polydispersion index, zeta potential, content and concentration; and evaluate the efficacy in the treatment of CL in animals infected with *L. (L.) amazonensis* or *L. (L.) major*. Two batches of each of the formulations were prepared: Lip-AICIFc 1, and 2 and SEDDS-Fex 1 and 2. As the formulations presented adequate characteristics for the proposed routes of administration, efficacy studies were carried. BALB/c mice were infected with *L. (L.) amazonensis*, separated into groups and treated with: Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Glucantime®, Lip-AICIFc+SEDDS-Fex combination, Lip-AICIFc+Glucantime® combination and control (no treatment). The results showed that there was stabilization in the size of the lesions of animals treated with the combinations of Lip-AICIFc+Glucantime® and Lip-AICIFc+SEDDS-Fex, without a significant reduction in the parasite load on the lesion. However, the combination Lip-AICIFc+SEDDS-Fex was able to reduce the parasite load in the spleen. Animals infected with *L. (L.) major* were treated with: Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Lip-AICIFc+SEDDS-Fex combination, suspension-Fex and control (no treatment). The results showed that there was a reduction in the size of the lesions in animals treated with the combination of Lip-AICIFc+SEDDS-Fex, with significant reduction in the parasite load in the lesion and

spleen. Thus, the results obtained in this work indicate that the Lip-AICIFc+SEDDS-Fex combination may be promising for the treatment of CL caused by *L. (L.) amazonensis* or *L. (L.) major*.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; chloro-aluminum-phthalocyanine; liposomes; fexinidazole; self emulsifying drug delivery systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i>	21
Figura 2 - Mecanismo de citotoxicidade da TFD	27
Figura 3 - Fórmula estrutural da AICIFc	29
Figura 4 - Características estruturais dos lipossomas.	31
Figura 5 - Fórmula estrutural do EPC	32
Figura 6 - Método de preparação dos lipossomas pelo método Bangham	33
Figura 7 - Fexinidazol e seus metabólitos primários	34
Figura 8 - Etapas do preparo de Lip-AICIFc	40
Figura 9 - Etapas do preparo do SEDDS-FEX	41
Figura 10 - Ilustração das medidas realizadas para determinação do diâmetro médio da lesão para espécie <i>L. (L.) amazonensis</i>	45
Figura 11 - Microscopia com luz polarizada da formulação SEDDS-Fex 2	52
Figura 12 - Avaliação da carga parasitária na lesão em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
Figura 13 - Avaliação da carga parasitária no baço em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
Figura 14 - Avaliação do diâmetro médio das lesões em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	57
Figura 15 - Análise histopatológica das lesões de pele dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e análise do Score Total	60
Figura 16 - Peso dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> submetidos a diferentes tratamentos nos tempos: início-0,7,14 e 21 dias.	61

Figura 17 – Determinação da carga parasitária na lesão de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i> para avaliação da eficácia terapêutica de diferentes tratamentos <i>in vivo</i>	63
Figura 18 - Determinação da carga parasitária no baço de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i> para avaliação da eficácia terapêutica <i>in vivo</i>	64
Figura 19 - Monitoramento do tamanho da lesão em resposta a diferentes tratamentos de camundongos fêmeas BALB/c infectados com de <i>L. (L.) major</i>	65
Figura 20 - Análise histopatológica dos camundongos fêmeas BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i> e análise do Score Total	68
Figura 21 - Avaliação do peso dos camundongos Balb/C infectados com <i>L. (L.) major</i> submetidos a diferentes tratamentos	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos estudos que utilizaram porfirinas, ftalocianinas e clorinas no tratamento da leishmaniose cutânea	28
Tabela 2 - Descrição dos componentes da formulação SEDDS-fex	41
Tabela 3 - Descrição dos componentes da formulação da suspensão-Fex	42
Tabela 4 - Condições cromatográficas de análise	43
Tabela 5 - Diferentes modalidades de tratamentos dos camundongos infectados com a forma amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	45
Tabela 6 - Diferentes modalidades de tratamentos dos camundongos infectados com a forma amastigotas de <i>L. (L.) major</i>	49
Tabela 7- Parâmetros avaliados para caracterização química e físico-química do lip-AICIFc	50
Tabela 8 - Parâmetros avaliados para caracterização química e físico-química do SEDDS-Fex (10mg/mL)	50
Tabela 9 – Imagens das lesões em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	57
Tabela 10 – Avaliação do efeito do tratamento em camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) major</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$^1\text{FS}^*$	Estado excitado de vida curta
$^3\text{FS}^*$	Estado de tripleto de vida longa
AICIFc	Alumínio-cloro-ftalocianina
AB	Anfotericina B
AM	Antimoniato de N-metil-glucamina
DND <i>i</i>	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DSPG	Diestearoilfosfatidilglicerol
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
FC	Fosfatidilcolina
Fex	Fexnidazol
FS	Fotossensibilizador
FS^0	Estado fundamental
HLB	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
HSPC	Fosfatidilcolina hidrogenada de soja
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
Lip	Lipossomas
Lip-AICIFc	Lipossomas contendo alumínio-cloro-ftalocianina
M	Molar
MLV	Vesículas multilamelares
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
Sb^{3+}	Antimônio trivalente
Sb^{5+}	Antimônio Pentavalente
SEDDS	Sistema autoemulsionável de liberação de fármacos

SFM	Sistema fagocitário mononuclear
TFD	Terapia fotodinâmica
TGI	Trato gastrointestinal
TRIS	Tris-(hidroximetil)-amino metano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Doenças negligenciadas	20
2.1.1	Leishmanioses	20
2.1.2	Leishmaniose Tegumentar (LT)	22
2.2	Tratamento da LT	23
2.3	Terapia Fotodinâmica	26
2.3.1	Alumínio-cloro-ftalocianina	29
2.3.2	Lipossomas	30
2.4	Fexinidazol (Fex)	33
2.4.1	Sistema autoemulsionável de liberação de fármacos (SEDDS)	35
2.5	Associação de tratamentos	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Materiais	39
4.2	Métodos	39
4.2.1	Preparo e caracterização das Formulações	39
4.2.1.1	Preparo dos lipossomas contendo AICIFc	39
4.2.1.2	Preparo dos SEDDS- Fex	40
4.2.1.3.	Preparo da suspensão-Fex	41
4.2.1.4	Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	42
4.2.1.5	Determinação da concentração de AICIFc nos lipossomas por espectrometria de absorção na região do visível	42
4.2.1.6	Determinação do teor Fex no SEDDS por cromatografia líquida de alta eficiência.	43
4.2.1.7	Análise microscópica do SEDDS-Fex	43
4.3	Avaliação da eficácia leishmanicida <i>in vivo</i>	44

4.3.1	Estudo in vivo com a espécie <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
4.3.1.1	Avaliação da carga parasitária	46
4.3.1.2	Avaliação histopatológica da lesão	47
4.3.1.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
4.3.2	Estudo in vivo com a espécie <i>L. (L.) major</i>	48
4.4	Análise estatística	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Preparo e caracterização das formulações Lip-AICIFc e SEDDS-Fex	50
5.2	Avaliação da eficácia leishmanicida <i>in vivo</i>	53
5.2.1	Estudo in vivo com espécie <i>L. (L.) amazonensis</i>	53
5.2.2	Estudo in vivo com espécie <i>L. (L.) major</i>	61
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses, consideradas um problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam suscetíveis à infecção. Nas Américas, as leishmanioses estão presentes em 18 países, sendo mais comum a leishmaniose tegumentar (LT) na sua forma clínica cutânea (BRASIL, 2021).

Atualmente, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de antimonial pentavalente, como de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Apesar de eficaz, na maioria dos casos os antimoniais estão associados à considerável toxicidade cardíaca, hepática e renal. Por essa razão, quando há impedimento na utilização dos antimoniais, outros fármacos podem ser utilizados como tratamento alternativo, sendo os mais usados a anfotericina B e pentamidina. No entanto, todos os medicamentos empregados no tratamento das leishmanioses possuem limitações, tais como: custo elevado, dificuldade de administração, toxicidade ou ainda o desenvolvimento de possível resistência, o que representa grande obstáculo para o sucesso da terapia (SILVA, F.C.; ALVES, C. R, 2014).

Em face dessas limitações, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimula o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento com intuito de melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas (OMS, 2021). Nesse contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) pode ser uma técnica promissora no tratamento da LT devido à sua baixa toxicidade, menores custos e melhor adesão dos pacientes ao tratamento (OLIVEIRA, S. *et al.*, 2017).

A alumínio-cloro-ftalocianina (AICIFc) tem sido investigada como fotossensibilizador (FS) para tratar leishmaniose devido às suas características fotofísicas adequadas para aplicação da TFD (ANNUNZIO *et al.*, 2019). Entretanto, a AICIFc apresenta baixa solubilidade em água e tende a se autoagregar, o que reduz a sua capacidade de produção de oxigênio singlete ou espécies reativas de oxigênio (NUNES *et al.*, 2004). O desempenho do FS como substância bioativa leishmanicida para aplicação tópica pode ser melhorado se for utilizado um nanocarreador. Os lipossomas são sistemas nanométricos adequados para a veiculação de substâncias bioativas, que podem

modular sua penetração pela epiderme e derme, assim como sua absorção sistêmica (FRÉZARD *et al.*, 2005; MONTANARI *et al.*, 2010).

Outra alternativa pesquisa é o Fexinidazol (Fex) que foi redescoberto pela Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DND) por meio de revisão sistemática de moléculas ativas contra protozoários. No entanto, o Fex apresenta também baixa solubilidade em água o que pode ser um fator limitante para sua absorção oral. Por essa razão, o Sistema autoemulsionável de liberação de fármacos (SEDDS) é uma alternativa interessante para veiculação do Fex, pois estes sistemas apresentam fácil produção, quando comparado a outros nanossistemas, não utilizam solventes tóxicos e, principalmente, aumentam a biodisponibilidade oral de substâncias bioativas (DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; DAMASIO, 2021).

Embora a busca de um simples composto, efetivo contra todas as espécies de *Leishmania* e as formas clínicas da doença, seja considerada por alguns autores uma utopia, o desenvolvimento de uma nova formulação totalmente efetiva, ou ainda sua associação com fármacos já existentes, é altamente relevante. A utilização de compostos combinados, visando, preferencialmente, diferentes alvos de atuação e mecanismos de defesa, tem sido incentivada de modo a aperfeiçoar a capacidade dos compostos por meio de efeito sinérgico ou aditivo, prevenindo o aparecimento de resistência ao fármaco, diminuindo as doses requeridas, reduzindo os efeitos colaterais, a alta toxicidade e o custo do tratamento ou, ainda, aumentando o espectro de atividade (SOARES; LEON, 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar a eficácia da administração tópica de lipossomas contendo alumínio cloro ftalocianina em combinação com SEDDS-Fex ou Glucantime® para tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por diferentes espécies de *Leishmania spp.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças negligenciadas

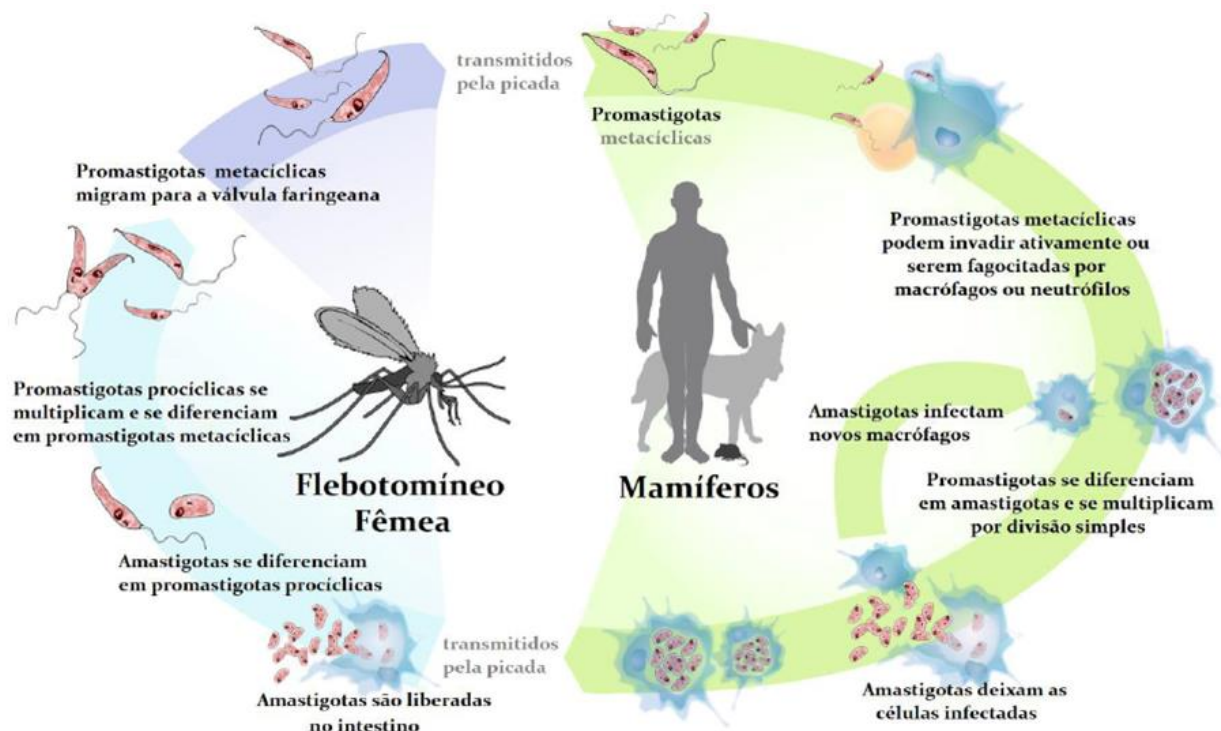
As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países, afetam mais de um bilhão de pessoas e custam bilhões de dólares às economias em desenvolvimento todos os anos. As populações que vivem em situação de pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos, animais domésticos e gado são as mais afetadas (OPAS, 2019). As doenças negligenciadas podem manter pacientes acamados e improdutivos por semanas ou meses, perpetuando a pobreza. Apesar dos significativos progressos da medicina nos últimos 50 anos, as populações vulneráveis ainda sofrem com a falta de tratamentos adequados disponíveis, sendo que as leishmanioses se enquadram nesta situação (DNDi, 2021).

2.1.1 Leishmanioses

Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para as leishmanioses e estão sob risco de infecção. Estima-se que 700.000 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo. Segundo a OMS, as leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* que pertence à ordem *Kinetoplastida*, à família *Trypanosomatidae* e apresentam ciclo de desenvolvimento heteroxeno, ou seja, um hospedeiro invertebrado e outro hospedeiro vertebrado (NEVES, 2016; OMS, 2021).

As *Leishmanias* são transmitidas quando a fêmea infectada do flebotomíneo inocula o protozoário em um hospedeiro sem infecção, enquanto se alimenta de seu sangue. Tais hospedeiros, além do homem, podem ser vários mamíferos silvestres (como a preguiça, o gambá, roedores, canídeos) e domésticos (cão, cavalo etc.) (FIOCRUZ, 2021). A **Figura 1** apresenta o ciclo biológico da *Leishmania*.

Figura 1 - Ciclo biológico da *Leishmania spp*



Fonte: FRÉZARD, 2015.

No ciclo de vida do parasito, ao picar um mamífero infectado, o vetor ingere, juntamente com o sangue, células contendo formas amastigotas. Essas formas são conduzidas à porção anterior do trato digestivo do invertebrado, onde se transformam em promastigotas procíclicas. As formas promastigotas migram, então, para o epitélio do tubo digestivo, onde se multiplicam por divisão binária e se aderem pela região do flagelo. Após a multiplicação, os parasitos migram para a porção anterior do trato digestivo, até a válvula estomodeal do inseto, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas, forma altamente infectante. Em seguida, essas formas se direcionam à probóscide e são regurgitadas, sendo transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado, como o homem, durante a picada. O parasito pode ser fagocitado por diversas células humanas, infectando-as: os neutrófilos, primeiramente; células dendríticas; e, principalmente, os macrófagos. No interior do vacúolo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas que, por sua vez, se multiplicam por divisão binária. A multiplicação intensa ocasiona o rompimento da membrana do macrófago, liberando os amastigotas que, então, se disseminam pelos sistemas circulatório e linfático e infectam novos monócitos e macrófagos do sistema fagocitário

mononuclear (SFM) (CHAPPUIS *et al.*, 2007; MATLASHEWSKI, 2001; KAYE, SCOTT, 2011).

O curso da infecção é definido por uma série de fatores relacionados ao parasito como: espécie, cepa, forma evolutiva e inóculo inicial, e também ao hospedeiro. A localização do parasito nas células do SFM, associada à resposta imune estimulada pela presença do antígeno parasitário, produzem uma reação inflamatória com predominância celular (processo inflamatório crônico do tipo granulomatoso). A interação entre a multiplicação parasitária e a resposta imune do hospedeiro poderá produzir infecção mais ou menos grave e, na dependência da espécie do parasito envolvida, podem acometer órgãos viscerais - Leishmania Visceral (LV) ou surgir lesões teciduais acometendo o tecido cutâneo e/ou mucosa - Leishmania Tegumentar (LT) (SILVA *et al.*, 2014).

2.1.2 Leishmaniose Tegumentar (LT)

No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que requerem mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que podem ocasionar no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social, psicológico e econômico (BRASIL, 2017).

Em 2019 foram confirmados 15.484 casos novos de LT no Brasil, com coeficiente de detecção de 7,37 casos a cada 100 mil habitantes, uma vez que o coeficiente de detecção de novos casos é o cálculo da incidência real de casos e da agilidade diagnóstica dos serviços de saúde. A LT acomete principalmente os adultos jovens, na faixa etária de 20 a 49 anos (54,9%), do sexo masculino (75,2%). Do total de casos notificados em 2019, 67,1% evoluíram para cura clínica, enquanto 1,9% abandonaram o tratamento. Em 5,3% foi detectada a presença da forma mucosa e 19 óbitos por LT. Por conseguinte, conhecer a porcentagem de cura é um indicador importante, pois está relacionado com o diagnóstico, acompanhamento adequado dos pacientes, e ainda permite avaliar o controle da LT e redução das formas graves e deformidades (BRASIL, 2018; BRASIL, 2021).

Apesar da ampla variedade de formas clínicas encontrada em pacientes com LT, variando de uma lesão autorresolutiva a lesões desfigurantes, esta pode ser classificada em quatro formas clínicas principais: leishmaniose cutânea localizada (LCL) caracterizada por uma pápula eritematosa que evolui para uma úlcera

geralmente indolor, que aparece no local da picada do vetor; disseminada (LD), caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco; mucosa (LM), que é uma lesão secundária que atinge principalmente a orofaringe, com comprometimento do septo cartilaginoso e demais áreas associadas; e a forma clínica difusa (LCD), que inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento, evoluindo de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas (NEVES, 2016; VASCONCELOS *et al.*, 2018).

No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea é frequentemente causada pela *Leishmania (Leishmania) major*. No Novo Mundo, as principais espécies são *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (NEVES, 2016). Nesse sentido, as características da LT presente em cada espécie são:

L. (L.) major: provoca a formação de úlceras indolores, como nas outras formas, quando as lesões não se complicam. As lesões evoluem rapidamente para uma úlcera úmida, e com frequência são múltiplas (NEVES, 2016).

L. (L.) amazonensis: apresenta úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da LCD (BRASIL, 2017).

L. (V.) guyanensis: causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo que as lesões múltiplas são consequências de picadas simultâneas de vários flebotomos infectados ou metástases linfáticas secundárias. É muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie (BRASIL, 2017).

L. (V.) braziliensis: é caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase, por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos, forma mucosa da doença (BRASIL, 2017).

2.2 Tratamento da LT

O tratamento da LT deve ser indicado de acordo com a manifestação clínica, com o apoio do diagnóstico laboratorial e obedecendo aos critérios estabelecidos para cada situação, cujo objetivo é a cicatrização das lesões cutâneas, assim como a prevenção de acometimento das mucosas. No Brasil, o fármaco de primeira escolha para o

tratamento da LTA é o antimoniato de N-metil-glucamina (AM) (Glucantime®), recomendado pelo Ministério da Saúde, na dose de 10 mg-20 mg Sb^{5+} /kg/dia durante vinte dias consecutivos, administrado pelas vias endovenosa ou intramuscular para LC e 20 mg Sb^{5+} /kg/dia durante trinta dias consecutivos para a LM (BRASIL, 2019). Conforme o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (2017) existe a possibilidade do tratamento com AM por via intralesional, entretanto, a recomendação possui várias ressalvas quanto a forma clínica, número e tamanho das lesões.

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não é totalmente esclarecido. Sugere-se que o antimônio pentavalente (Sb^{5+}) seja um pró-fármaco, que é convertido em antimônio trivalente (Sb^{3+}), após sua administração. Entretanto, o mecanismo (enzimático ou não enzimático) e o sítio (macrófago ou parasito) da redução ainda não foram determinados (ROBERTS *et al.*, 1998; SERENO *et al.*, 1998; OUELLETTE *et al.*, 2004). O AM é considerado eficaz, entretanto, possui alta toxicidade, podendo trazer impactos negativos para o paciente. Os efeitos adversos mais frequentes do tratamento com AM são: dores musculoesqueléticas, alterações gastrointestinais e cefaleia de leve a moderada, alterações eletrocardiográficas, como prolongamento do intervalo QT, alteração de repolarização ventricular, alterações isquêmicas, e laboratoriais, aumento leve a moderado das enzimas pancreáticas e hepáticas (VASCONCELOS *et al.*, 2018). Outros tratamentos indicados em caso de resposta não satisfatória, debilidade do paciente, idosos, gestantes e/ou presença de comorbidades são a anfotericina B, anfotericina B lipossomal e as pentamidinas (BRASIL, 2017).

A anfotericina B (AB) é antifúngico poliênico que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade celular e o balanço iônico, causando morte celular. A formulação convencional de AB, comercializada no Brasil é o Anforicin B® (Cristália, Brasil). Nessa formulação, o sal biliar desoxicolato de sódio é utilizado para solubilizar a AB, formando um complexo micelar em solução. Seu uso é limitado pelos efeitos adversos, como anafilaxia, trombocitopenia, dor generalizada, convulsões, calafrio, febre, flebite, anemia, anorexia, diminuição da função tubular renal e hipocalcemia em um terço dos doentes. Com a finalidade de minimizar estes efeitos ocasionados pela AB, a indústria farmacêutica desenvolveu formulações lipídicas, dessas destaca-se o AmBisome® uma formulação lipossomal de AB, formada por vesículas unilamelares pequenas, constituídas de fosfatidilcolina

hidrogenada de soja (HSPC), colesterol, diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) e AB na razão molar de 2:1:0,8:0,4 (ARRUDA *et al.*, 2016; FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Algumas vantagens da formulação lipossomal são a menor toxicidade, melhor direcionamento do alvo farmacológico e redução do tempo de internação (FILIPPIN; SOUZA, 2006). No entanto, a via de administração continua sendo intravenosa cujas desvantagens são o desconforto do paciente, risco de embolia e em caso de dose excessiva não é possível retardar a biodisponibilidade do fármaco (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2017), além de não ser estabelecida a segurança em gestantes e lactantes (BRASIL, 2017).

Em adição, a pentamidina é um derivado sintético da amidina, eficaz contra grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania*. A descoberta da atividade antiprotozoária das diamidinas foi consequente à procura por compostos hipoglicemiantes que pudessem comprometer o metabolismo energético dos parasitos. Atualmente, é comercializada para uso humano apenas sob a forma liofilizada de isotionato de pentamidina. O possível mecanismo de ação da pentamidina seria por inibição de diferentes processos celulares, ainda não totalmente elucidados. Todavia, resistência à pentamidina tem sido descrita em tripanossomas e leishmanias (NEVES *et al.*, 2016).

Recentemente, a miltefosina foi incorporada ao esquema terapêutico da LT por meio da portaria nº 56, de 30 de outubro de 2018 (BRASIL, 2018a), sendo um medicamento de uso oral. Porém, segundo a DNDi (2021a) existe relatos de uma queda de eficácia da monoterapia na Ásia, provavelmente associada à subexposição para crianças e também foi relatado esse fato na África. O tratamento é realizado com doses de 2,5 mg/kg/dia, administradas 2 a 3 vezes por dia, até o limite de 150 mg/dia (3 cápsulas/dia), durante 28 dias. As reações adversas mais comuns estão relacionadas ao trato gastrointestinal, tais como: o náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Entretanto, a miltefosina é teratogênica, necessitando cautela ao ser prescrita para mulheres em idade fértil (BRASIL, 2018b; BRASIL, 2020; BRASIL, 2020a)

Portanto, os tratamentos disponíveis atualmente apresentam uma série de limitações como alto custo, administração parenteral e alta toxicidade, associadas a muitos outros efeitos adversos indesejáveis (RIBEIRO *et al.*, 2016). Dessa forma, o desenvolvimento de terapias alternativas, incluindo a identificação de medicamentos

eficazes para o tratamento tópico e/ou oral da LT é uma proposta altamente atrativa que diminuiria a toxicidade, reduziria os efeitos adversos, diminuiria o custo do tratamento e melhoraria a qualidade de vida dos pacientes (LOPES *et al.*, 2019).

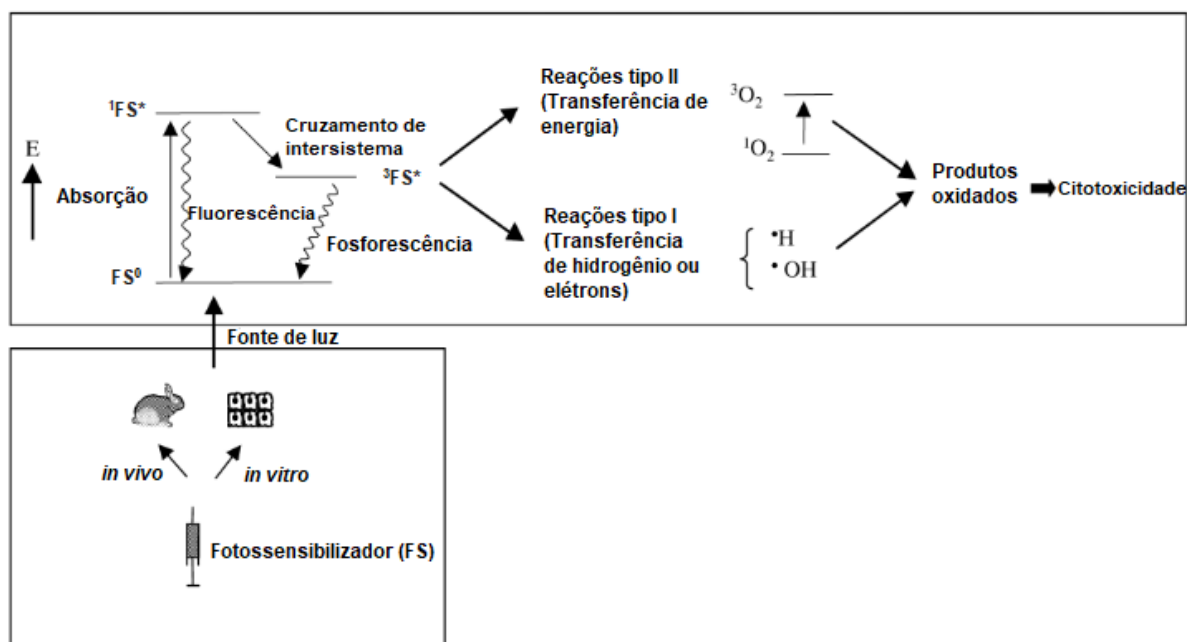
2.3 Terapia Fotodinâmica

Como já relatado, diante dos graves efeitos adversos e limitações dos tratamentos atualmente disponíveis, outras alternativas estão sendo estudadas para o tratamento da LT, dentre elas o tratamento tópico com terapia fotodinâmica (TFD).

A TFD foi desenvolvida no final dos anos 1970 e tem sido amplamente utilizada em diferentes especialidades incluindo a dermatologia, urologia, otorrinolaringologia e oftalmologia. Esta modalidade de tratamento baseia-se na fotoativação de moléculas de fotossensibilizador (FS), quando irradiadas pela luz em um comprimento de onda específico. Uma vez que o FS é ativado pela luz, pode gerar espécies reativas de oxigênio que induzem a destruição dos parasitos. Portanto, o FS é um elemento crítico no processo de TFD (KONAN *et al.*, 2002; AKILOV *et al.* 2007; OSPINA *et al.*, 2014).

A interação de luz monocromática com o fármaco fotossensibilizador induz uma série de processos. Após a absorção da luz, o FS, inicialmente em estado fundamental (FS^0), é ativado para um estado excitado de vida curta ($^1FS^*$) que pode se converter em um estado de tripleto de vida longa ($^3FS^*$) (**Figura 2**). O principal papel do estado singleto no processo de fotossensibilização é agir como um precursor do estado tripleto. O estado tripleto é o estado fotoativo, que pode gerar espécies citotóxicas passando por duas reações principais. As reações do tipo I podem produzir radicais livres ou íons superóxidos resultantes da transferência de hidrogênio ou elétron. Já as reações do tipo II envolvem interação entre o oxigênio e o estado tripleto do FS para mediar a formação de oxigênio singleto, que geralmente acredita-se ser a principal espécie citotóxica em TFD (KONAN *et al.*, 2002).

Figura 2 - Mecanismo de citotoxicidade da TFD



Fonte: Adaptado de KONAN *et al.*, 2002. O FS quando estimulado por um comprimento de onda específico desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres que causam citotoxicidade.

Os FS subdividem-se, basicamente, em primeira e segunda geração. Os FS de primeira geração, representados principalmente por uma mistura de porfirinas (Photofrin), apresentaram algumas limitações na aplicação clínica resultantes de baixa pureza química de hipersensibilidade da pele à luz após aplicação da TFD várias semanas devido à meia-vida longa e seu alto acúmulo na pele. As desvantagens dos FS de primeira geração levaram a necessidade de investigar novos compostos e iniciaram o desenvolvimento dos FS de segunda geração. Atualmente, o grupo dos FS de segunda geração inclui derivados de hematoporfirina e FS sintéticos tais como: ácido 5-aminolevulínico e as ftalocianinas. Os FS de segunda geração são caracterizados por uma maior pureza química, maior rendimento de formação de oxigênio singleto e maior penetração nos tecidos localizados profundamente devido à sua absorção máxima na faixa de comprimento de onda de 650–800 nm. A principal desvantagem do FS de segunda geração é sua baixa solubilidade em água (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018). A **Tabela 1** apresenta alguns estudos realizados utilizando fototerapia para o tratamento da leishmaniose.

Tabela 1 - Descrição dos estudos que utilizaram porfirinas, ftalocianinas e clorinas no tratamento da leishmaniose cutânea

Autor e ano	Tipo de estudo	Espécie <i>Leishmania</i>	FS*	Família química
Kosaka <i>et al.</i> , 2007	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>L. (L.) major</i>	ALA	Porfirina
Evangelou <i>et al.</i> , 2011	Clínico	<i>L. (L.) major</i>	ALA	Porfirina
Mateus <i>et al.</i> , 2014	<i>In vitro</i>	<i>L. (V.) panamensis</i> ou <i>L. infantum</i>	ALA	Porfirina
Silva <i>et al.</i> , 2015	<i>In vitro</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	Tetrassulfonato de zinco ftalocianina	Ftalocianina
Pinto <i>et al.</i> , 2016	<i>In vitro</i>	<i>L. (L.) major</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	Clorina	Clorina
Ribeiro <i>et al.</i> , 2016	<i>In vivo</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Alumínio cloro ftalocianina	Ftalocianina
Viana <i>et al.</i> , 2018	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	ALA	Porfirina
Lopes <i>et al.</i> , 2019	<i>In vivo</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	AlCIFc	Ftalocianina
Ribeiro <i>et al.</i> , 2019	<i>In vivo</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	AlCIFc	Ftalocianina

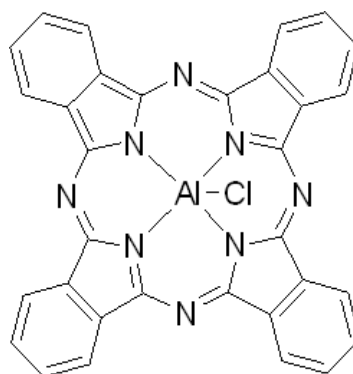
*FS = fotossensibilizadores, ALA = do inglês 5-aminolevulinic acid (ácido 5-aminolevulínico).

Fonte: adaptada Annunzio *et al.*, 2019. Relação dos estudos, no período entre 2007 a 2019, feitos em diferentes espécies causadoras de LC com fotossensibilizadores.

2.3.1 Alumínio–cloro–ftalocianina

As Ftalocianinas apresentam uma variedade de íons metálicos em sua estrutura química, que são de fato responsáveis pela particular propriedade de cada molécula. Alumínio (III) e zinco (II) são dois metais usados para aumentar a fototoxicidade das ftalocianinas. Além disso, uma vantagem extra dos corantes à base de ftalocianina é que eles podem ser seletivamente acumulados e eliminados muito mais de forma eficiente para fora do tecido-alvo, com quase nenhuma fluorescência observada nas células 24 h após a administração do medicamento. As ftalocianinas absorvem luz entre 630 e 700 nm, fornecem penetração máxima no tecido e alta eficiência como agente FS. As propriedades favoráveis das ftalocianinas para serem utilizadas na TFD são dependentes do íon metal presente em sua estrutura molecular (**Figura 3**) (PORTILHO *et al.*, 2013). A AICIFc é quimicamente estável e exibe propriedades fotofísicas adequadas (como alto rendimento quântico de tripleto e longa vida útil de tripleto) para procedimentos médicos. Embora possua alto peso molecular, sua natureza hidrofóbica permite facilmente a interação com camadas lipídicas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Figura 3 - Fórmula estrutural da AICIFc



Fonte:Sigma Aldrich,2021.

No entanto, AICIFc é uma substância hidrofóbica propensa à autoagregação. O desvio do comportamento linear de Lambert-Beer para essa substância bioativa em solução, causado pela formação de dímeros, é normalmente mais pronunciado em água do que em solventes orgânicos. Os dímeros são considerados inativos ou muito mais ineficientes do que os monômeros como FS. A agregação reduz a capacidade de sensibilização da ALCIFc nas reações de transferência de elétrons e na fotoprodução de O₂ (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004). Assim, o uso de nanocarreadores em

associação com FS minimiza este problema, como também pode aumentar seu acúmulo no local da aplicação (ROCHA *et al.*, 2019). Entre os sistemas nanocarreadores disponíveis, os lipossomas parecem ser os mais indicados, pois apresentam elevada biocompatibilidade, são biodegradáveis e apresentam bom direcionamento para o tecido alvo. Portanto, quando o alvo é o SFM, esse nanossistema possui maior retenção no baço e fígado, além de atingir o sistema linfático (MONTEIRO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2020).

Nesi-Reis e colaboradores (2018) apresentaram os efeitos fototóxicos da AICIFc contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis in vitro*, mostrando a possibilidade do uso da TFD com AICIFc no tratamento da LT. Hernández e colaboradores (2012), avaliaram a atividade da AICIFc em solução e encapsulada em lipossomas como FS para reduzir a viabilidade celular e inibir o crescimento *in vitro* de *L. panamensis* e *L. chagasi*, mostrando que a forma lipossomal foi dez vezes mais ativa. Estudos conduzidos *in vivo* por Ribeiro e colaboradores (2016), assim como, por Lopes e colaboradores (2019) mostraram o potencial da ALCIFc veiculada em lipossomas no tratamento tópico de animais infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Em resumo, a AICIFc aplicada em conjunto com os procedimentos de TFD pode ser realizada em um ambiente ambulatorial e, em alguns casos, sem hospitalização. Do ponto de vista da saúde coletiva, tem despertado grande interesse também pelos seus menores custos operacionais quando comparados aos tratamentos tradicionais (RIBEIRO *et al.*, 2016).

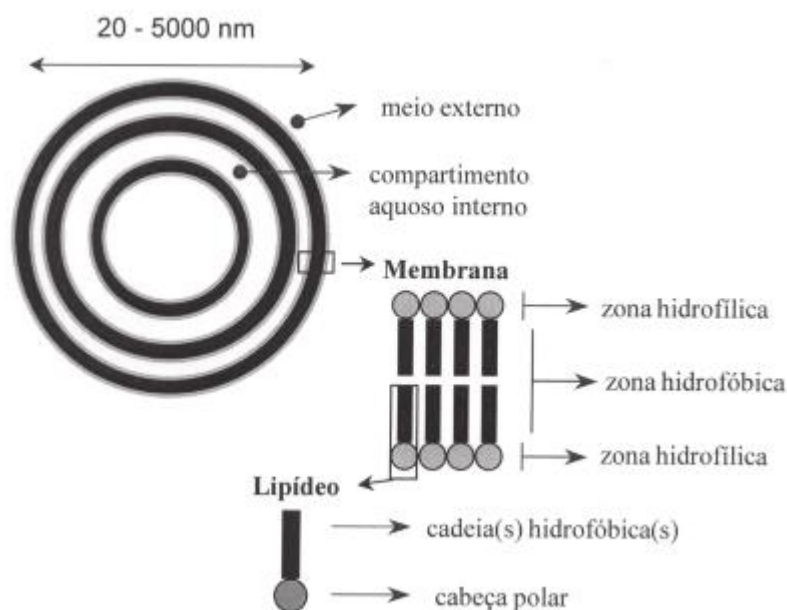
2.3.2 Lipossomas

O desempenho de um FS como um fármaco antileishmania para aplicação tópica pode ser melhorada se usado um carreador adequado bem como pode alterar a forma de sua internalização pelos macrófagos infectados. Os lipossomas são vesículas coloidais que variam em tamanho de 50 a 1000 nm de diâmetro, são constituídos por fosfolipídios biocompatíveis e biodegradáveis, e apresentam a potencialidade de carrear substâncias bioativas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas (**Figura 4**) como veículos de entrega de alguns medicamentos antileishmania, já disponíveis no mercado (HERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

As propriedades dos lipossomas são altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, carga superficial, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno

podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (FRÉZARD *et al.*, 2005; AKBARZADEH *et al.*, 2013).

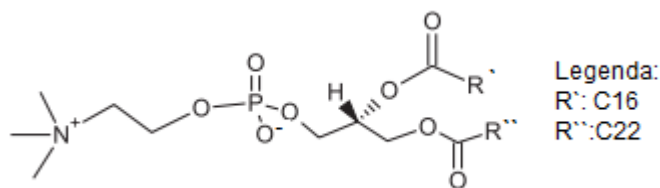
Figura 4 - Características estruturais dos lipossomas



Fonte: FRÉZARD *et al.*, 2005.

Dentre os fosfolipídios utilizados no preparo dos lipossomas, pode-se destacar os glicerofosfolipídios, os quais podem ser de origem natural ou sintética. A fosfatidilcolina (FC) é um fosfolipídio de origem natural constituída por uma extremidade polar formada por um grupo colina e um grupo fosfato ligado à porção hidrofóbica que é composta por duas longas cadeias acílicas de 16 a 22 carbonos ligadas às hidroxilas do glicerol mediante a formação de ligações éster ésteres com o glicerol (**Figura 5**). As cadeias acílicas podem conter uma ou mais insaturações. Devido à estrutura polar-apolar, ou seja, anfifílica, essas moléculas tendem a se auto-organizar em bicamadas. A FC tem sido purificada a partir de fontes naturais abundantes, como a gema de ovo e são denominadas fosfatidilcolina de ovo ou em inglês egg phosphatidylcoline (EPC) (MERTINS *et al.*, 2008)

Figura 5 - Fórmula estrutural da fosfatidilcolina (FC)

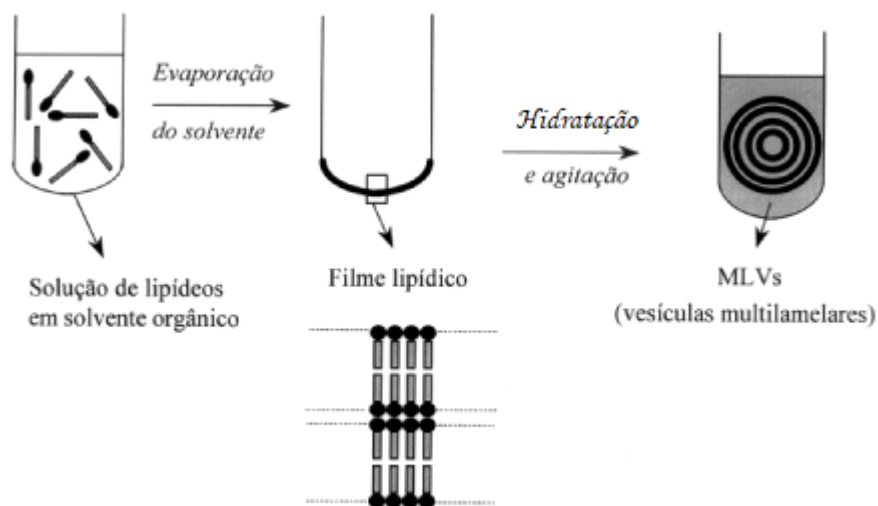


Fonte: Adaptado MERTINS *et al.*, 2008.

Os métodos convencionais de fabricação de lipossomas envolvem quatro etapas: dissolução dos lipídios em solvente orgânico, eliminação do solvente orgânico, dispersão dos lipídios em meio aquoso, purificação dos lipossomas resultantes e caracterização química e físico-química da dispersão de lipossomas do final produto (MOZAFARI, 2005). Usualmente, utiliza-se o método de preparo denominado “método de Bangham” ou também chamado de “hidratação do filme”. O preparo consiste no uso de solventes orgânicos voláteis, tais como clorofórmio, éter ou etanol, para solubilizar os lipídios. De maneira que os lipídios são depositados como uma película fina na parede do balão de fundo redondo, à medida que o solvente é evaporado por técnica de evaporação sob pressão reduzida (AKBARZADEH *et al.*, 2013).

Em seguida, uma solução aquosa é adicionada aos lipídios aderidos na parede do balão, permitindo sua hidratação sob agitação vigorosa, resultando na formação de lipossomas multilamelares (MLV) (**Figura 6**) (MONTEIRO *et al.*, 2014). A encapsulação da substância bioativa hidrofóbica ou hidrofílica ocorre mediante sua solubilização no solvente orgânico junto com os lípidos ou na solução aquosa, respectivamente. (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Os lipossomas MLV podem ser calibrados para obtenção de uma dispersão de lipossomas de tamanho e distribuição homogêneos por meio da técnica de extrusão, a qual consiste na passagem da formulação através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades. (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

Figura 6 - Método de preparação dos lipossomas pelo método Bangham



Fonte: Adaptado de FREZÁRD *et al.*, 2005.

Diante do exposto e conforme estudos anteriores, a incorporação do agente fotoativo em membranas biológicas parece ser fortemente melhorada quando a composição lipídica do carreador lipossomal mimetiza a composição lipídica da membrana, melhorando assim a seletividade da substância bioativa e a eficiência da TFD. A solubilização do sensibilizador na bicamada lipídica também fornece um meio alternativo de controlar a liberação das substâncias bioativas inseridas nos lipossomas (CHEN *et al.*, 2005).

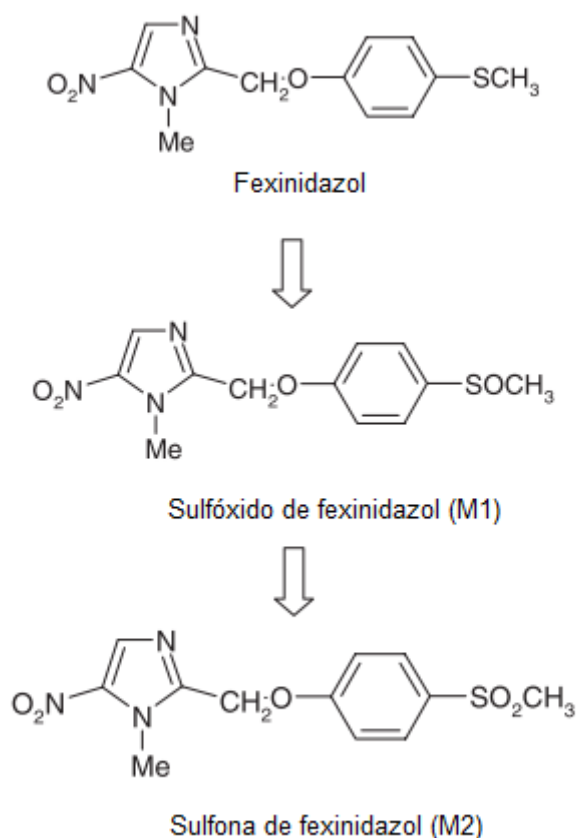
2.4 Fexinidazol (Fex)

Outra proposta interessante para o tratamento da LT seria um fármaco administrado por via oral. O Fex foi sintetizado pela primeira vez pela Hoechst em 1978 sendo redescoberto pela DNDi após extensa triagem por meio de empresas farmacêuticas e bancos de dados publicados. Subsequente, foi avaliado no tratamento para tricomonas, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (DEEKS *et al.*, 2019).

O Fex é um derivado nitroimidazol (**Figura 7**), com forma molecular $C_{12}H_{13}N_3O_3S$, massa molecular 279,31g/mol e apresenta baixa solubilidade em água (48,27 mg/L) (REPOSITORY, 2015). Em todas as espécies de animais investigadas, o Fex foi rapidamente metabolizado por oxidação, resultando na formação de dois metabólitos

farmacologicamente ativos o sulfóxido e a sulfona de Fex (**Figura 7**), que parecem ser os principais responsáveis pela atividade antiparasitária. Nenhum estudo formal foi realizado para determinar o modo de ação do Fex, mas é provável que o composto atue de forma semelhante a outros fármacos 5-nitroimidazol(WYLLIE *et al.*, 2012; TORREELE *et al.*, 2012).

Figura 7 - Fexinidazol e seus metabólitos primários



Fonte: Adaptado de TORREELE *et al.*, 2012

Ao longo dos anos, o Fex foi submetido a extensos estudos de toxicologia regulatória, incluindo farmacologia de segurança (respiratória, cardiovascular e comportamento geral) e estudos de toxicocinética de dose repetida em ratos e cães. No geral, o Fex foi considerado bem tolerado, sem toxicidade específica. Durante os anos de 2010-2011, a *DNDi* realizou dois ensaios clínicos de Fase I para avaliar a segurança e a farmacocinética do Fex em voluntários humanos sendo administrados doses únicas e múltiplas (BAHIA *et al.*, 2012).

O Fex, assim como seus metabólitos sulfóxido e sulfona, tiveram a atividade *in vitro* avaliada em macrófagos murinos infectados com *L. donovani*, sendo demonstrada a atividade terapêutica de todas essas formas moleculares. Estudo conduzido em camundongos infectados com *L. donovani* mostrou a atividade leishmanicida do Fex após sua administração por via oral por cinco dias consecutivos. Nesse estudo, a dose de 200mg/Kg/dia levou a uma redução de 98,4% da carga parasitária no fígado (WYLLIE *et al.*, 2012).

A atividade do Fex em suspensão também foi investigada contra as principais espécies causadoras de LV e LT do Novo Mundo. Este estudo *in vivo* mostrou a eficácia do Fex oral contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, quando administrado em altas doses (200 e 300mg/kg/dia), mostrando o potencial do Fex para terapia oral das leishmanioses causadas por espécies de importância epidemiológica nas Américas (DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019).

2.4.1 Sistema autoemulsionável de liberação de fármacos (SEDSS)

A administração oral de fármacos hidrofóbicos apresenta um grande desafio devido à baixa solubilidade aquosa de tais compostos. O SEDSS é uma mistura isotrópica de óleos, surfactantes, solventes e cosolventes/cosurfactantes, que pode ser usado como alternativa de formulação a fim de melhorar a absorção oral de fármacos altamente lipofílicos. Assim, o SEDSS pode ser administrado por via oral em cápsulas de gelatina mole ou dura e formar emulsões finas de óleo em água (o/a) relativamente estáveis após diluição aquosa devido à agitação suave dos fluidos gastrointestinais (PATEL *et al.*, 2011).

Em decorrência disso, a eficiência da absorção oral do fármaco veiculado no SEDSS depende de muitos parâmetros relacionados à formulação, como concentração de surfactante, razão óleo/surfactante, polaridade da emulsão, tamanho da gota e carga, todos os quais, em essência, determinam a autoemulsificação (CHATTERJEE *et al.*, 2016).

Ademais, conhecer a função desempenhada por cada componente é importante para obter maior eficiência do nanossistema. A seguir estão descritos o papel de cada agente presente na formulação:

Óleo: Representa um dos excipientes mais importantes na formulação SEDDS não só porque pode solubilizar quantidades marcantes do fármaco lipofílico ou facilitar a autoemulsificação, mas também e principalmente porque pode aumentar a fração do fármaco lipofílico transportada através do sistema linfático intestinal, aumentando assim a absorção do trato gastrointestinal (TGI), dependendo da natureza molecular do triglicerídeo (GURSOY *et al.*, 2004).

Surfactante: É responsável por reduzir a tensão superficial entre o óleo e a fase aquosa. Os surfactantes não iônicos com valores do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (do inglês hydrophilic–lipophilic balance-HLB) relativamente altos são mais amplamente recomendados para serem utilizados no SEDDS, tais como Tween 20, Tween- 80, Cremophor RH40, Pluronic L-64 e Emulphor EI-620 (CHATTERJEE *et al.*, 2016). Normalmente, a concentração de surfactante varia entre 30 e 60% p/p, a fim de formar SEDDS estável. Determinar a concentração de surfactante adequadamente é muito importante, pois grandes quantidades de surfactantes podem causar irritação no trato gastrointestinal (GURSOY *et al.*, 2004).

Cosurfactante: Ajuda principalmente a aumentar a capacidade de carreamento do fármaco, resultando na redução da concentração de surfactante quando é adicionado à formulação. A adição de cosurfactante reduz as chances de variabilidade e irritação local causada pelos surfactantes, aumentando a fluidez interfacial. Também facilita o processo de dispersão no meio (CHATTERJEE *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, o SEDDS tem sido amplamente investigados para aumentar a biodisponibilidade e estabilizar as taxas de absorção de fármacos hidrofóbicos administrados por via oral. De forma que esse sistema se distingue dos outros porque possui a vantagem de ser produzido por processo de fabricação simples, o que facilita a produção em larga escala. Assim como, apresentam melhor estabilidade física e química após o armazenamento a longo prazo por serem anidros, não sofre danos devido ao processo de digestão dos lipídios quando comparado aos outros sistemas e reduz a variabilidade inter e intraindivíduos e frente a efeitos alimentares(WANG *et al.*, 2009; BENSON *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2016).

2.5 Associação de tratamentos

Considerando-se a problemática do tratamento das leishmanioses, é essencial a busca experimental de compostos que possibilitem o desenvolvimento de novos

tratamentos altamente efetivos, com menores efeitos adversos e que não induzam facilmente a resistência (SOARES; LEON, 2014). Por isso, fármacos em associação podem gerar sinergias (aumento de eficácia, retardo ou impedimento de desenvolvimento de resistência parasitária) constituindo benefícios terapêuticos. Geralmente, os fármacos combinados agem por diferentes mecanismos ou em variados sítios-alvo, o que pode justificar a sinergia. Além disso, seus parâmetros farmacocinéticos devem ser compatíveis, para que se harmonizem a via de administração, o intervalo entre doses e a duração do efeito (HOEFLER; WANNMACHER, 2007).

De acordo com Infoleish (2019), as vantagens no uso da terapia combinada são:

1. O uso de um tratamento local e um tratamento sistêmico resultaria hipoteticamente um efeito aditivo, pois o segundo eliminaria os parasitos circulantes ou remanescentes localizados na periferia da lesão que os tratamentos locais não alcançam e que podem ser a causa das recaídas;
2. Também oferece a oportunidade de aumentar a taxa de cura atual se comparada com qualquer outra abordagem terapêutica disponível em monoterapia;
3. A combinação reduz a duração do tratamento. Além disso, caso sejam alcançadas as taxas de cura esperadas, haverá evidências para recomendar a substituição dos antimoniais como primeira linha de tratamento nos casos de LC não complicada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Preparar, caracterizar e avaliar a eficácia da administração tópica de lipossomas contendo AICIFc em combinação com medicamentos de administração sistêmica para tratamento da LC experimental causada por diferentes espécies de *Leishmania spp.*

3.2 Objetivos específicos

- Preparar lipossomas contendo AICIFc pelo método de Bangham.
- Realizar caracterização química e físico-química dos lipossomas contendo AICIFc por meio de medidas de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta.
- Determinar a concentração de AICIFc utilizando espectrometria de absorção na região do visível.
- Preparar SEDDS contendo Fex (SEDDS-Fex).
- Realizar caracterização química e físico-química do SEDDS-Fex mediante medidas de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Determinar a concentração de Fex utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliar a eficácia do tratamento tópico do lipossoma contendo AICIFc em combinação com a administração sistêmica de Glucantime® ou SEDDS-Fex para tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por *L. (L.) amazonensis*.
- Avaliar a eficácia do tratamento tópico do lipossoma contendo AICIFc em combinação com a administração sistêmica com SEDDS-Fex para o tratamento da leishmaniose cutânea experimental causada por *L. (L.) major*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Reagentes: Alumínio cloro ftalocianina (Sigma- Aldrich, EUA), cloreto de sódio (NaCl) (MERCK KGaA, Alemanha), fosfatidilcolina de ovo (EPC) (Lipoid GmbH, Alemanha), álcool etílico 95% (Synth, Brasil), Tris-(hidroximetil)-amino metano (TRIS) (Sigma-Aldrich, EUA), triglicerídeos de cadeia média (TCM) (Lipoid GmbH, Alemanha), monooleato de sorbitano etoxilado - Tween 80[®] (Croda), Tween 80[®] (Êxodo Científica), Óleo de mamona hidrogenado e etoxilado - Kolliphor RH 40[®] (Sigma-Aldrich, Monooleato de Sorbitano - Span 80[®] (Sigma-Aldrich), meio Schineider (Sigma Chemical, EUA), Fexinidazol (Centipharm), soro fetal bovino (Gibco, Alemanha), solução de antibióticos penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA), Glucantime[®] (Sanofi-Aventis), Acetonitrila (LS Chemicals), água Milli-Q obtida por um sistema Milli-Q Direct-Q3 Millipore (Billerica, EUA).

Parasitos: *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. (L.) major* (MHOM/IL/80/Friendlin).

Animais: Hamsters Golden machos com cerca de 5 semanas provenientes do Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e camundongos BALB/c fêmeas com cerca de 5 semanas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Os protocolos utilizados neste estudo foram certificados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG): 85/2019 e 18/2020.

4.2 Métodos

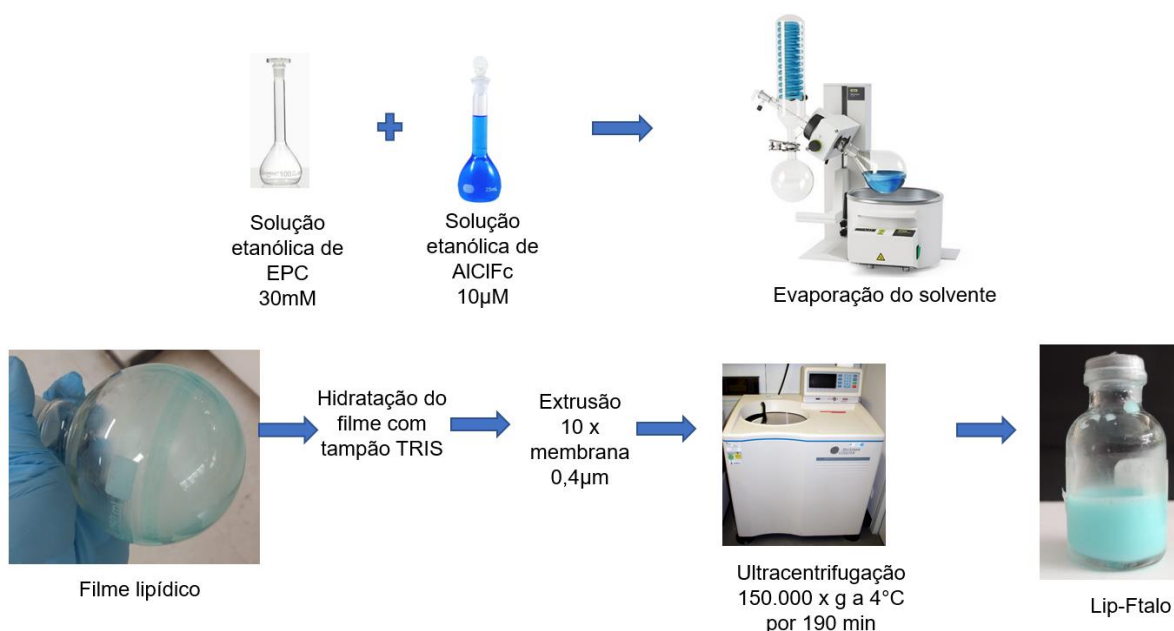
4.2.1 Preparo e caracterização das Formulações

4.2.1.1 Preparo dos lipossomas contendo AICIFc

Para o preparo dos lipossomas contendo AICIFc (Lip-AICIFc) foi utilizado o método Bangham, conforme descrito por Lopes e colaboradores (2019). Resumidamente, foi preparada uma solução etanólica de AICIFc (5,74µg/mL) e esta foi adicionada a uma solução etanólica contendo fosfatidilcolina de ovo (30 mM), seguido de homogeneização. Um filme lipídico foi então obtido por evaporação do álcool etílico sob pressão reduzida. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com Tampão TRIS (60 mM) pH 7,4, até uma concentração final de 20 mM de fosfatidilcolina de ovo. Após

o preparo, as vesículas foram submetidas à extrusão usando membranas de policarbonato (0,4 μm , 10 vezes) e purificadas por ultracentrifugação a 150.000 x g a 4°C por 190 min (Optima® L-80XP; Beckman Coulter, Indianapolis, EUA) (**Figura 8**). A seguir, o sobrenadante foi separado a fim de retirar a AICIFc não encapsulada e os pellets obtidos foram ressuspensionado com tampão TRIS. De maneira que o volume final obtido estava concentrado três vezes em relação ao volume inicial preparado.

Figura 8 – Etapas do preparo de Lip-AICIFc



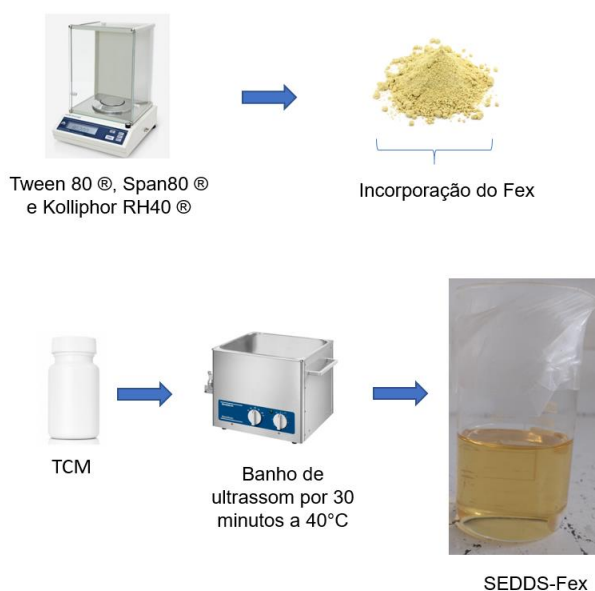
4.2.1.2 Preparo dos SEDDS- Fex

O preparo do SEDDS-Fex (**Tabela 2**) foi realizado conforme descrito por DAMASIO (2021). Inicialmente foram pesados os surfactantes e cosurfactante em um frasco de penicilina, estes foram homogeneizados sob agitação magnética por 2 minutos. Em seguida, o Fex foi adicionado (10mg/g) e o frasco submetido à nova agitação por mais 2 minutos. Após homogeneização, o triglicerídeo de cadeia média (TCM) foi adicionado aos poucos e o frasco foi submetido por mais 2 minutos de agitação. Como últimas etapas do processo, a formulação foi levada ao banho de ultrassom por 30 minutos, à 40°C e então mantida sob agitação magnética por 24 \pm 2 horas, à temperatura ambiente (**Figura 9**) (DAMASIO, 2021).

Tabela 2 - Descrição dos componentes da formulação SEDDS-Fex

Componente	Composição (%p/p)	Função farmacotécnica
Tween 80 [®]	30	Surfactante
Span 80 [®]	10	Co-surfactante
Kolliphor RH 40 [®]	10	Surfactante
TCM	49	óleo
Fex	1	Fármaco

Figura 9 – Etapas do preparo do SEDDS-FEX



4.2.1.3 Preparo da suspensão-Fex

Para o preparo da suspensão de Fex este foi pesado em um tubo de centrífuga (15 mL), contendo esferas de vidro, juntamente com o Tween 80[®] (Tabela 3). Em seguida foram homogeneizados em um vórtex até que o Fex estivesse totalmente disperso no Tween 80[®]. Em seguida a água purificada foi adicionada e a mistura novamente homogeneizada em vórtex até a obtenção de uma suspensão. A formulação foi protegida da luz e armazenada a 4^o C por 7 dias (DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019).

Tabela 3 - Descrição dos componentes da formulação suspensão-Fex

Componente	Composição (%p/v)	Função farmacotécnica
Tween 80®	1,5	Surfactante
Fex	0,5	Fármaco
Água purificada	98	Veículo

4.2.1.4 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

As análises de diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão (IP) dos Lip-AICIFc e SEDDS-Fex foram realizadas por espectroscopia de correlação de fótons à 25°C e em ângulo de 90°. O potencial zeta foi avaliado por espalhamento dinâmico da luz associado à mobilidade eletroforética em um ângulo de 90°. As medidas foram efetuadas utilizando-se o equipamento Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra).

As amostras de Lip-AICIFc foram diluídas 1:80 em solução de cloreto de sódio (NaCl) (0,9% m/v) e as de SEDDS-Fex em água Milli-Q diluídas 1:200. As medidas são feitas em triplicata e os valores representados como média \pm desvio padrão.

4.2.1.5 Determinação da concentração de AICIFc nos lipossomas por espectrometria de absorção na região do visível

A determinação da concentração de AICIFc nos lipossomas foi realizada pelo método de espectrometria de absorção na região do visível no comprimento de onda de 674nm. Após o processo de purificação, descrito no item 4.2.1.1, foi coletada uma amostra e determinada a concentração de AICIFc (concentração de AICIFc nos lipossomas purificado). Em seguida, 100 μ L lip- AICIFc foram solubilizados em 900 μ L de álcool etílico (95%) ambos pesados separadamente para calcular o fator de diluição. Com o resultado da absorbância obtida, calculou-se a concentração da AICIFc nos lipossomas por meio da equação $y = 0,467x - 0,0191$ obtida pela curva padrão da AICIFc em etanol.

4.2.1.6 Determinação do teor Fex no SEDDS por cromatografia líquida de alta eficiência.

Para quantificação de FEX em SEDDS foi utilizado método previamente desenvolvido e validado por DAMASIO (2021) por cromatografia de alta eficiência (CLAE). Brevemente, foram pesados cerca de 250 mg de SEDDS-Fex (10 mg/mL), solubilizados em 5 mL de acetonitrila, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com o mesmo solvente. Desta solução, foram pipetados 5 mL para um balão de 50 mL e o volume completado com acetonitrila. Por fim, pipetou-se 1 mL desta para um balão de 10 mL e o volume completado com fase móvel. Também foi preparada uma solução padrão com a mesma concentração final (1µg/mL), as soluções foram filtradas em membrana 0,45 µm, injetadas no equipamento, e foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Condições cromatográficas de análise

Condições cromatográficas	
Comprimento de onda	320 nm
Coluna	Fase reversa ACE® C8 (250 mm x 4,6 mm)
Temperatura	25°C
Fase móvel	Água ultrapurificada:Acetonitrila (30:70)
Tempo de corrida	7 minutos
Volume de injeção	20 µL
Fluxo	1,0 mL/minuto

4.2.1.7 Análise microscópica do SEDDS-Fex

A identificação de cristais de Fex foi feita por análises de microscopia de luz polarizada utilizando o Microscópio Óptico Zeiss®. As análises foram feitas com aumento 100x. As amostras contendo SEDDS-Fex foram analisadas sem diluição e também foi realizada a análise da suspensão-Fex.

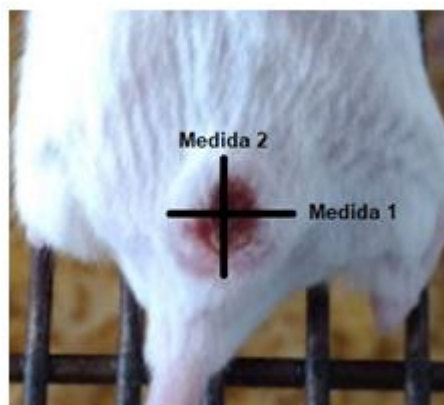
4.3 Avaliação da eficácia leishmanicida *in vivo*

4.3.1 Estudo *in vivo* com a espécie *L. (L.) amazonensis*

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas *in vitro* em meio Schneider completo, enriquecido com 20% de soro fetal bovino (SFB) até atingirem a fase estacionária de crescimento. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Hamsters Golden (idade: cerca de 5 semanas) foram anestesiados com Ketamina (100mg/kg) / xilasina (15mg/kg) e inoculados com um volume 0,03 mL, via subcutânea, na pata (seringa BD ultra-fine 0,3 mL, agulha curta 30 G), contendo 1×10^9 promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. O desenvolvimento do edema de pata foi monitorado visualmente. Quando os animais apresentam edemas bem definidos sem ulcera, estes foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, o nódulo foi removido e os fragmentos de tecido triturados (Ultra-turrax, IKA, Estados Unidos) em meio de Schineider. O tecido foi centrifugado a 50 g por dois minutos para sedimentação (Thermo Scientific Haraeus). O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado a 1700 g por 15 minutos (Thermo Scientific Haraeus). O pellet formado foi ressuscitado em meio de Schnneider para obtenção leishmânias na forma amastigota (AGUIAR *et. al*; 2010).

Camundongos fêmeas BALB/c (idade: cerca de 5 semanas) foram tricotomizados e inoculados com um volume 0,02 mL, via subcutânea, na base da cauda (seringa BD ultra-fine 0,3 mL, agulha curta 30 G), com as amastigotas recém isoladas de *L. (L.) amazonensis*. O desenvolvimento das lesões foi monitorado por meio de medidas do diâmetro médio. O diâmetro médio da lesão foi calculado considerando a média entre a maior linha que pode ser traçada unindo duas bordas da lesão e a linha que corta esta com um ângulo de 90° medido com auxílio de um paquímetro digital (**Figura 10**). E ainda foram retiradas fotografias no início e fim do tratamento para acompanhamento da progressão das lesões. Outra forma de avaliação foi a pesagem dos animais que ocorreu nos tempos: início do tratamento (0), 7, 14 dias e fim do tratamento (21 dias).

Figura 10 – Ilustração das medidas realizadas para determinação do diâmetro médio da lesão para espécie *L. (L.) amazonensis*



Após o desenvolvimento de lesões homogêneas (diâmetro médio de cerca de 8 mm), os animais foram divididos em 6 grupos de 7 animais cada e tratados por 10 dias alternados, conforme discriminado na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Diferentes modalidades de tratamento dos camundongos infectados com a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*

Grupos	Tratamento	Dose
1	Controle infectado não tratado	-----
2	Lip-AICIFc	0,0306mg/kg/dia
3	Glucantime®	200mg/kg/dia
4	Lip-AICIFc em combinação com Glucantime®	0,0306mg/kg+ 200mg/kg/dia
5	SEDDS-Fex	50 mg/kg/dia
6	Lip-AICIFc em combinação com SEDDS- Fex	0,0306 mg/kg + 50 mg/kg/dia

Para o tratamento tópico com Lip-AICIFc os animais foram previamente anestesiados com uma mistura de ketamina (100mg/kg) / xilasina (15mg/kg) por via intraperitoneal. Após os animais serem sedados os olhos foram protegidos com gaze umedecida em salina estéril. Os tratamentos foram aplicados diretamente na lesão (50 µL), com auxílio de uma pipeta automática. Após a aplicação dos lipossomas a lesão foi coberta com papel alumínio por 15 minutos. Após este período a lesão foi descoberta e o animal posicionado a uma distância de 5 cm da lâmpada em relação a base onde o animal encontrava-se. A distância foi medida com auxílio de uma régua. Os olhos dos animais foram mantidos protegidos com gaze umedecida em salina estéril durante todo período de exposição à luz. A lesão foi exposta a radiação com a lâmpada a uma distância de 5 cm ($\lambda = 660$ nm), potência 81,39 mW/cm², fluxo de 0-95,2 J/cm² e por 20 minutos monitorados com auxílio de cronômetro. A temperatura do animal foi monitorada com auxílio de um termômetro posicionado no dorso do animal, durante todo período de exposição à luz. Os parâmetros da lâmpada foram monitorados durante o tempo de exposição, sendo a última medida realizada 30 segundos antes do termino da sessão. Em seguida a lesão foi limpa com solução salina estéril 0,9% e gaze estéril (LOPES *et al.*, 2019).

O tratamento com Glucantime® foi realizado por via intraperitoneal (0,2mL), e o tratamento oral com SEDDS-Fex por gavagem (0,2 mL) após a mistura de SEDDS-Fex com água na proporção 1:1. O grupo controle não infectado e não tratado foi apenas manuseado para simular a condição de stress que os outros grupos foram submetidos.

4.3.1.1 Avaliação da carga parasitária

A eficácia dos tratamentos também foi avaliada mediante a determinação da carga parasitária na lesão e no baço, utilizando o método análise diluição limitante. Os animais foram eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO₂) um dia após o término do tratamento e, em seguida, a lesão e o baço foram removidos para determinação da carga parasitária. A lesão e o baço foram pesados, triturados (Ultraturrax, IKA, Estados Unidos) em meio Schneider contendo solução de antibiótico (penicilina potássica 100UI e de sulfato de estreptomicina 10µg/mL). Em seguida, a lesão e o baço foram centrifugados a 50xg por dois minutos para sedimentação dos tecidos. Os sobrenadantes foram separados e novamente centrifugados nas

seguintes: a lesão a 1700xg por 15 minutos e o baço a 1620xg por 2 minutos. Cada pellet foi ressuspendido em 1 mL de meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino e 10 µL/mL da solução de antibióticos (penicilina potássica 100UI e de sulfato de estreptomicina 10µg/mL). Diluições sucessivas em placa de cultivo de 96 orifícios estéreis foram realizadas n = 3 (Costar®, Estados Unidos). As placas foram incubadas a 23^o C por 7 dias e a carga parasitária foi determinada a partir da mais alta diluição na qual foi observado crescimento (AGUIAR *et.al.*; 2010).

4.3.1.2 Avaliação histopatológica da lesão

No dia da eutanásia dos animais, foi coletado uma fração de tecido da lesão dos animais para análise histopatológica. Os tecidos foram armazenados em cassetes e imersos em formol tamponado 10% (pH 7,2) até o processo de inclusão em parafina. Por conseguinte, o material coletado foi retirado do formol e lavado em água corrente por 2 horas. Em seguida, a cada 30 minutos, o material foi submetido à imersão em etanol nas concentrações de 70%, 80%, 90% e etanol absoluto. Após esse processo, as amostras ficaram em repouso no solvente xilol por aproximadamente 1 hora. Por fim, houve a inclusão dos tecidos em parafina para serem submetidos à microtomia (5 µm) e corados em H&E. As imagens foram obtidas em microcâmara (Q-Color5, Olympus) acoplada ao microscópio BX53 (Olympus) com software Q-Capture Pro 7.0. A reação inflamatória foi avaliada por meio de procedimento semiquantitativo avaliando a presença de leucócitos na derme e hipoderme (ALVES *et al.*, 2013). O sistema de pontuação do infiltrado inflamatório foi adaptado da seguinte forma: 0, ausente; 1, leve; 2, moderado (infiltrado inflamatório difuso ou focal moderado, incluindo áreas na derme profunda ou hipoderme); 3, intenso (infiltrado inflamatório difuso ou focal grave ao redor dos vasos, glândulas, folículos pilosos na derme profunda e /hipoderme); 4, muito intenso (infiltrado inflamatório disseminado pela derme). A extensão das áreas necróticas foi graduada de 0 (ausente) a 3 (grave) (VIANA *et al.*, 2013). A avaliação morfológica da epiderme compreendeu os seguintes parâmetros: acantose, disceratose, papilomatose, exocitose e hiperkeratose, que foram graduados em ausente (0) ou presente (1). A pontuação total variou de 0 a 10. A análise histopatológica foi realizada usando um modelo simples-cego.

4.3.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amostra da espécie de *L. (L.) amazonensis* foi descongelada e o DNA foi extraído utilizando o kit Quick-Start Protocol - September 2018 e Kit QIAamp® Blood Mini. Após esse processo, foi feita leitura do produto da extração DNA – concentração de DNA (ng/uL) – no equipamento NanoDrop (Alemanha). Em seguida, foi realizado a PCR convencional/ Hsp70 (234 pares de bases-pb) e eletroforese para confirmar a presença da banda 234 pb. Em adição foi realizado a PCR de restrição Hsp70 – 234 pb – HaeIII e BstUI, sendo essas as enzimas de restrição por cortar os produtos de amplificação da PCR convencional (GRAÇA *et al.*, 2012). Os produtos da restrição obtidos foram submetidos à eletroforese para visualização do resultado. Esta análise foi realizada em colaboração com o Laboratório de Pesquisas Clínicas do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas para identificação da espécie.

4.3.2 Estudo *in vivo* com a espécie *L. (L.) major*

Para propagação *in vitro* de promastigotas da *L. (L.) major* foi utilizado o meio de Schneider completo, enriquecido com 20% de soro fetal bovino. As promastigotas foram mantidas em cultivo até atingirem a fase estacionária de crescimento. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Camundongos fêmeas BALB/c (idade: 7 semanas) foram tricotomizados e inoculados com um volume 0,02 mL, via subcutânea, na base da cauda (seringa BD ultra-fine 0,3 mL, agulha curta 30 G), contendo 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) major*.

Após o desenvolvimento de lesões homogêneas (diâmetro médio de cerca de 8 mm), os animais foram divididos em 5 grupos de 7 animais cada e os tratamentos, conforme discriminado na **Tabela 6**, foram iniciados. Os grupos que receberam o tratamento tópico com Lip-AICIFc e tratamento oral com SEDDS-Fex por gavagem foram tratados conforme descrito no item **4.3.1**. Assim como os animais que receberam a suspensão-Fex também foram tratados por gavagem. Desse modo os grupos tratados com SEDDS-Fex e suspensão-Fex receberam diariamente esses tratamentos por 20 dias consecutivos, separadamente.

Tabela 6 – Diferentes modalidades de tratamento dos camundongos infectados com a forma amastigota de *L. (L) major*

Grupos	Tratamento	Dose
1	Controle infectado não tratado	-----
2	Lip-AICIFc	0,0248mg/kg/dia
3	Suspensão- Fex	50mg/kg/dia
4	SEDDS-Fex - 50 mg/kg/dia	50 mg/kg/dia
5	Lip-AICIFc combinação com SEDDS-Fex	0,0248mg/kg + 50 mg/kg/dia

A avaliação do tamanho da lesão, monitoramento das lesões e pesagem dos animais seguiram conforme descrito no item 4.3.1. Bem como a avaliação da carga parasitária foi mencionado no item 4.3.1.1 e avaliação histopatológica da lesão no item 4.3.1.2.

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPrism. Os dados obtidos para a carga parasitária, na lesão e no baço, e para tamanho de lesão e foram submetidos aos testes de normalidade Komolgorov-Smirnov e homocedasticidade Bartlett. Em seguida, foram avaliados por ANOVA, e, em caso de diferença estatística, os resultados foram submetidos ao teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para valores de P menores que 0,05. Para análise histopatológica, a comparação dos grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi <0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparo e caracterização das formulações Lip-AICIFc e SEDDS-Fex

Foram preparados dois lotes de cada uma das formulações: Lip-AICIFc e SEDDS-Fex, sendo primeiro lote das formulações utilizado no estudo de eficácia contra *L. (L.) amazonensis* (Lip-AICIFc 1 e SEDDS-Fex 1) e o segundo no estudo de eficácia contra *L. (L.) major* (Lip-AICIFc 2 e SEDDS-Fex 2). Os resultados dos parâmetros avaliados na caracterização química e físico-química das formulações encontram-se descritos nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7- Parâmetros avaliados para caracterização química e físico-química do Lip –AICIFc

Formulação	Diâmetro médio*	Índice de polidispersão (Ip)*	Potencial Zeta (mV)*	Concentração (µg/mL)
Lip-AICIFc1	420	0,424	-2,15	12
Lip-AICIFc 2	348	0,334	-2,54	10

* diluição realizada na proporção 1:80 com o diluente NaCl % 0,9 p/p.

Tabela 8 - Parâmetros avaliados para caracterização química e físico-química do SEDDS-Fex (10 mg/mL)

Formulação	Tamanho (nm)*	Índice de polidispersão (Ip)*	Potencial Zeta (mV)*	Teor (%)
SEDDS-Fex 1	108,6	0,225	-9,70	92
SEDDS-Fex 2	66,5	0,214	-21,6	92

* diluição foi feita na proporção 1:200 com o diluente água.

As propriedades físico-químicas e químicas das nanoestruturas como tamanho carga e composição são fatores que podem influenciar em sua interação com o organismo, podendo impactar na estabilidade, eficácia e toxicidade desses sistemas (GANTA *et al.*, 2014). Quando avaliamos o tamanho obtido para os dois lotes de Lip-AICIFc

(média 384 nm), eles foram maiores que anteriormente relatado por Lopes e colaboradores (2019) (cerca de 250 nm). Essa diferença pode ser atribuída a modificação das condições da ultracentrifugação e do aumento da concentração da AICIFc quando comparado ao estudo de 2019. Ao modificar os parâmetros do tempo, temperatura e rotação da ultracentrífuga e aumento da massa da AICIFc altera-se a força centrípeta atuante no processo. Logo, pode ocorrer uma desestabilização da membrana dos lip-AICIFc e facilitar o escape da substância bioativa presente nos lips. Em decorrência disso, a estabilidade da formulação foi afetada e pode ter ocorrido a coalescência dos lip-AICIFc, portanto, o aumento do tamanho possivelmente se justifica por essas razões. Todavia, o tamanho obtido é compatível com a abertura da membrana (0,4 μ M) utilizada para a extrusão dos mesmos. No caso das leishmanioses, a captação dos nanocarreadores por células do SFM representa uma excelente estratégia de direcionamento passivo, pois os macrófagos são as células alvo do tratamento (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005), assim o tamanho superior a 200 nm pode levar a uma maior extensão da captação por células do SFM (BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S,2007).

Já o SEDDS-Fex após diluição apresentou glóbulos com média de cerca de 100 nm, de acordo com Chatterjee *et al.* (2016), uma dispersão em nanoescala é fator relevante para melhorar a absorção do fármaco após a administração oral. Entretanto, houve uma diferença entre os dois lotes preparados, nos parâmetros tamanho e potencial zeta. Estas diferenças podem ser explicadas pela utilização do polissorbato 80 de dois fabricantes diferentes no preparo dos lotes. Os polissorbatos são ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano (RITSCHER, W.A.; KEARNS, G.L, 2004), como resultado do processo de obtenção dos polissorbatos pode haver quantidades diferentes de ácidos graxos, o levaria a diferença no potencial zeta.

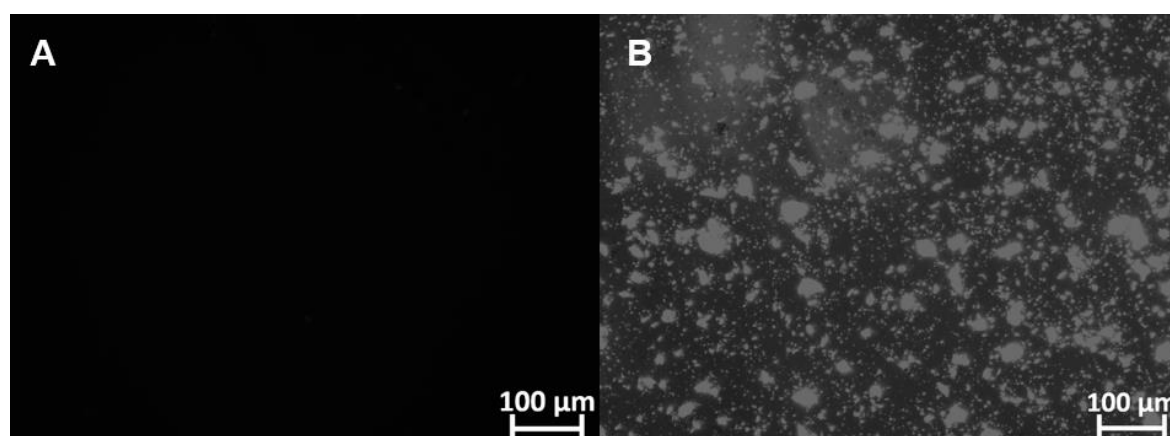
É importante ressaltarmos que apesar, dos baixos valores de potencial zeta encontrados para as duas formulações preparadas, estudos de estabilidade anteriormente conduzidos mostraram a estabilidade do Lip-AICIFc e SEDDS-Fex por 60 dias a 4^o C e 6 meses a 25^o C, respectivamente (LOPES *et al.*, 2019; DAMASIO, 2021).

O valor de IP fornece informação sobre a homogeneidade da distribuição do tamanho, as médias encontradas foram de 0,38 e 0,22; para Lip-AICIFc e SEDDS-Fex, respectivamente. Valores de IP inferiores a 0,3 indicam a obtenção de sistema

monodisperso, sendo considerado um parâmetro crítico para administração endovenosa, já para administração tópica valores superiores são aceitos (RIBEIRO *et al.* 2019).

A **Figura 11** apresenta a análise microscópica do SEDDS-Fex 2 sem diluir e da suspensão de Fex, como podemos observar foi possível solubilizar o Fex na formulação SEDDS, enquanto, na suspensão é possível verificar a presença de muitos cristais de Fex. É importante garantirmos também que a emulsão formada após a diluição do SEDDS não apresente precipitação do insumo farmacêutico ativo, pois a presença de cristais insolúveis no meio pode levar ao retardo ou diminuição da sua absorção (CERPNIJAK *et. al.*, 2013; GUPTA; CHAVHAN; SAWANT, 2011). Damasio (2021) verificou para esta mesma formulação, que em diluições de 1:200 em água ou fluídos simulados gástrico ou intestinal o Fex manteve-se solúvel.

Figura 11- Microscopia com luz polarizada da formulação SEDDS-Fex 2



(A) SEDDS-Fex 2 sem diluir, (B) Suspensão-Fex.

Assim, como as formulações preparadas Lip-AICIFc e SEDDS-Fex apresentaram características químicas e físico-químicas compatíveis para administração tópica e oral, respectivamente, foram utilizadas para os estudos de eficácia no tratamento da LT.

5.2 Avaliação da eficácia leishmanicida *in vivo*

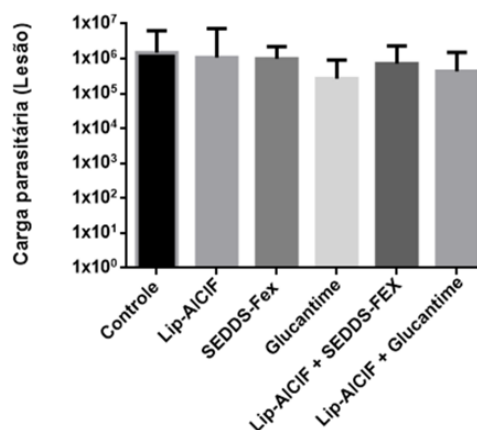
5.2.1 Estudo *in vivo* com espécie *L.(L.) amazonensis*

Estudo anterior conduzido por Lopes e colaboradores (2019) avaliou a eficácia do tratamento tópico do Lip-AICIFc em animais infectados com *L. (L.) amazonensis*. Entretanto, uma questão sobre o tratamento tópico como monoterapia para LT,

principalmente, no Novo Mundo, é a sua segurança devido ao risco de persistência dos parasitos disseminados, com o risco de desenvolvimento tardio de lesões da mucosa. A terapia combinada representa uma estratégia para o tratamento de LT que oferece vantagens sobre a monoterapia, como prevenir o surgimento de resistência, aumentar a eficácia e diminuir o tempo do tratamento (SEIFERT; CROFT, 2006; DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2015). Assim, este estudo propõe a combinação do tratamento tópico (Lip-AICIFc) com o sistêmico, sendo selecionados para administração sistêmica o Glucantime®, medicamento de referência no tratamento da LT (BRASIL, 2017) e o SEDDS-Fex uma proposta inovadora para o tratamento LT, administrado por via oral.

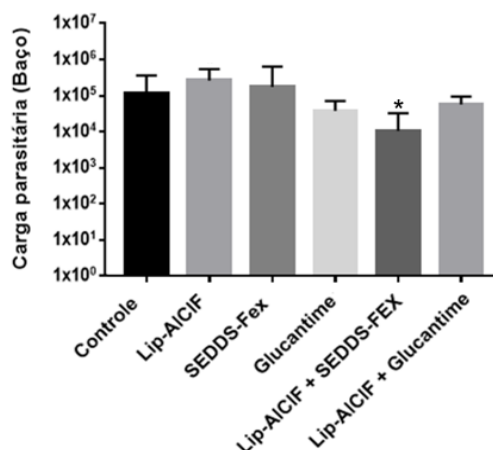
Foram utilizados como parâmetros para avaliação da eficácia dos tratamentos a determinação da carga parasitária (lesão e baço), o acompanhamento do tamanho da lesão e a avaliação histopatológica das lesões ao fim do tratamento. As **Figuras 12 e 13** apresentam a carga parasitária na lesão e no baço, respectivamente. Nenhum dos tratamentos propostos, monoterapia ou combinação, foram capazes de reduzir significativamente a carga parasitária na lesão quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$), também não houve diferença significativa quando a comparação foi realizada entre os grupos tratados ($p > 0,05$) (**Figura 12**). Quando avaliada a carga parasitária no baço foi observada diferença significativa do grupo tratado com a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex quando comparado aos grupos: o controle, Lip-AICIFc, Glucantime® e com a combinação Lip-AICIFc + Glucantime® ($p < 0,05$) (**Figura 13**).

Figura 12 – Avaliação da carga parasitária na lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*



Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) amazonensis* na base da cauda. Após o desenvolvimento das lesões ulceradas os animais foram tratados com o grupo Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Glucantime®, combinação Lip-AICIFc+ SEDDS-Fex, combinação Lip-AICIFc+ Glucantime® e Controle (animais infectados e não tratados). Um dia após a interrupção do tratamento, a carga parasitária na lesão foi determinada pelo método de diluição limitante. As barras representam as médias e os desvios padrão (n = 7). Comparações entre os grupos não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Figura 13 – Avaliação da carga parasitária no baço em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*



Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) amazonensis* na base da cauda. Após o desenvolvimento das lesões ulceradas os animais foram tratados com o grupo Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Glucantime®, combinação Lip-AICIFc+ SEDDS-Fex, combinação Lip-AICIFc+ Glucantime® e Controle (animais infectados e não tratados). Um dia após a interrupção do tratamento, a carga parasitária na lesão foi determinada pelo método de diluição limitante. As barras representam as médias e os desvios padrão (n = 7). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle, Lip-AICIFc, Glucantime® e com a combinação Lip-AICIFc + Glucantime®.

Nossos resultados diferem dos obtidos em estudo anterior, em que foi utilizado o mesmo protocolo de tratamento com Lip-AICIFc e Glucantime®. Lopes e

colaboradores (2019) mostraram uma redução significativa na carga parasitária nos dois órgãos avaliados, lesão e baço, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Neste mesmo estudo também foi avaliada a formulação lipossomal sem a presença da AICIFc, sendo que esta não foi capaz de apresentar eficácia em nenhum dos parâmetros avaliados (LOPES *et al.*, 2019). Buscando investigar os motivos da diferença entre os resultados foi realizada a identificação da espécie de *Leishmania* utilizada no presente estudo em colaboração com o Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz, através da técnica PCR (convencional e PCR restrição/Hsp70), sendo confirmada que se tratava realmente da *L. (L.) amazonensis*, entretanto, não foi possível nos certificarmos da cepa utilizada ou realizarmos testes de resistência.

É importante ressaltarmos que a capacidade de infecção da *Leishmania* depende de determinantes multigênicos e a causa precisa da sua capacidade de infecção ou resistência não é totalmente compreendida (CHANG *et al.*, 2003). Vários estudos têm mostrado que isolados e cepas de *Leishmania* são heterogêneos e polimórficos na natureza e no laboratório, em termos de patogenicidade (ESPIAU *et al.*, 2017). Assim, uma hipótese levantada para a diferença entre os estudos, seria uma maior resistência do parasito. A literatura admite o surgimento de cepas resistentes (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017), esta maior resistência do parasito pode ser explicada pelo processo de obtenção da forma amastigota utilizada na infecção. Durante o processo de manutenção das *Leishmanias* em nosso laboratório foi necessário realizar dois inóculos nos mesmos animais para que os hamsters desenvolvessem o nódulo para isolamento da forma amastigota. As lesões cutâneas desenvolvidas por estes animais são muito semelhantes às observadas em humanos (HOMMEL *et al.*, 1995). Osório e colaboradores (1998) relatam que os hamsters são capazes de montar uma resposta imune parcialmente protetora mesmo quando reinfestado por diferentes espécies de *Leishmania*.

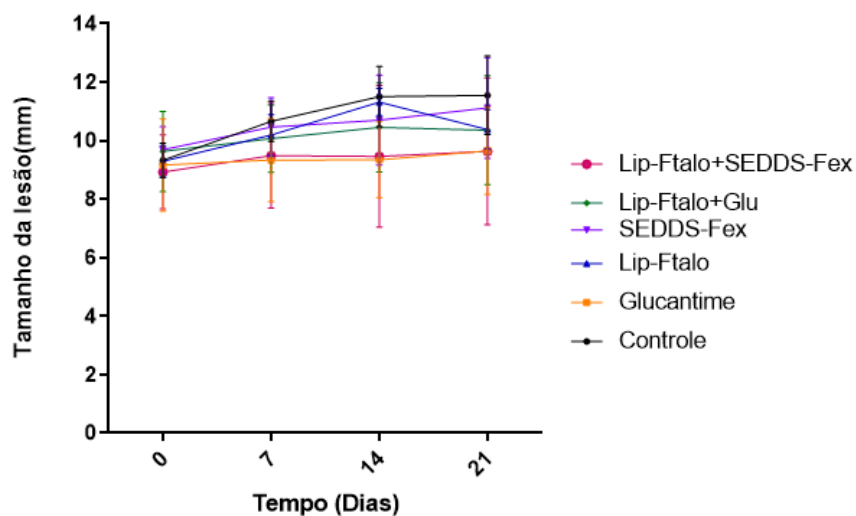
De Moraes-Teixeira e colaboradores (2019) mostraram que a suspensão de Fex foi capaz de reduzir a carga parasitária no baço apenas com a dose de 200 mg/kg/dia, após 20 dias consecutivos de tratamento, portanto, com uma dose total de Fex 4000 mg/kg. Neste sentido, apesar das limitações nosso estudo aponta para maior eficácia para a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex, quando avaliado este parâmetro, visto que houve uma redução significativa com a administração de uma dose diária 4 vezes

inferior de Fex (50 mg/kg/dia), em 10 dias de tratamento. Uma possível explicação para esta maior atividade no baço seria uma ação sinérgica ou aditiva entre a AICIFc e o Fex.

O aspecto clínico da eficácia terapêutica da LT é muito importante e devem considerados aspectos relacionados à histopatologia e à capacidade de cicatrização das lesões. A **Figura 14** mostra a evolução do tamanho da lesão após o início do tratamento em função do tempo. No início do tratamento, os animais tratados apresentavam lesões com diâmetro médio de $9,3 \pm 0,58$ mm (controle); $9,3 \pm 0,54$ mm (Lip-AICIFc); $9,7 \pm 0,79$ mm (SEDDS-Fex); $9,2 \pm 1,58$ mm (Glucantime®); $8,9 \pm 1,26$ mm (Lip-AICIFc + SEDDS-Fex) e $9,6 \pm 1,37$ mm (Lip-AICIFc + Glucantime®) sem diferença significativa entre todos os grupos ($p > 0,05$). O tamanho da lesão dos animais tratados com as combinações Lip-AICIFc + Glucantime® e Lip-AICIFc + SEDDS-Fex apresentaram estabilização no intervalo de tempo avaliado, uma vez que não houve diferença significativa no diâmetro médio das lesões entre o tempo inicial e final do tratamento ($10,4 \pm 1,86$ e $9,6 \pm 2,50$ mm, respectivamente) ($p > 0,05$), assim como os regimes monoterápicos Glucantime® e SEDDS-Fex ($9,6 \pm 1,49$ e $11,1 \pm 1,72$ mm, respectivamente) ($p > 0,05$). Em contraste, o grupo de controle mostrou um aumento gradual no tamanho médio da lesão com diferença significativa entre o tempo inicial e final de tratamento ($11,5 \pm 1,34$ mm) ($p < 0,05$). A **Tabela 9** apresenta imagens das lesões de animais no início do tratamento e no fim, é possível observar que as lesões mantiveram-se abertas, sem processo de cicatrização visível em todos os grupos. Yardley & Croft (1997) atribuem a redução/cicatrização das lesões a um efeito supressivo, porém não curativo. Os dados do presente estudo corroboram essa hipótese, já que, quando avaliada a carga parasitária na lesão, não há uma redução significativa em relação ao grupo controle, entretanto, há uma estabilização das lesões.

É importante ressaltar que camundongos BALB/c são considerados um modelo rigoroso, no qual apenas os fármacos mais ativos são eficazes (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Neste mesmo aspecto a doença se mostra mais agressiva em animais infectados com a forma amastigota, quando comparada à infecção com a forma promastigota, e os resultados da terapia podem ser marcadamente influenciados por isso (GARNIER *et al.*, 2007). Assim, qualquer melhora pode ser atribuída aos efeitos da quimioterapia.

Figura 14 - Avaliação do diâmetro médio das lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*



Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) amazonensis* na base da cauda. Após o desenvolvimento de lesões ulceradas os animais foram tratados com Lip-AICIFc, SEDSS-Fex, Glucantime®, combinação Lip-AICIFc+ SEDSS-Fex, combinação Lip-AICIFc+ Glucantime® e controle (animais infectados e não tratados). A figura apresenta a evolução do tamanho da lesão, após o início do tratamento, em função do tempo. As barras representam as médias e os desvios padrão (n = 7). Comparações entre o tamanho médio da lesão no tempo inicial (tempo zero) e tempo final (21 dias) dos tratamentos não foram estatisticamente significantes (P> 0,05)

Tabela 9 - Imagens das lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*

Grupo	Início do tratamento (Tempo 0)	Fim do tratamento (Tempo 21 dias)
Controle		

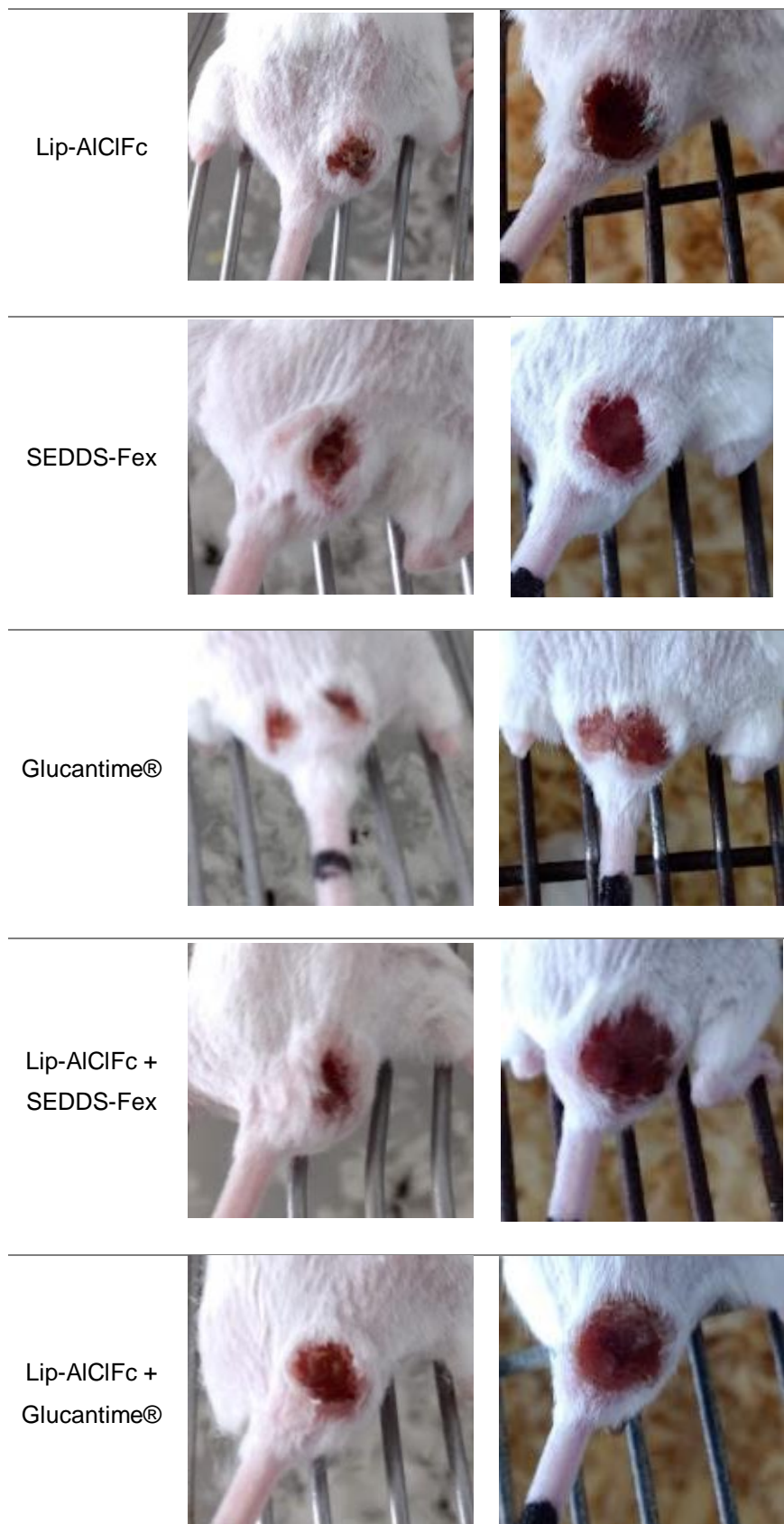
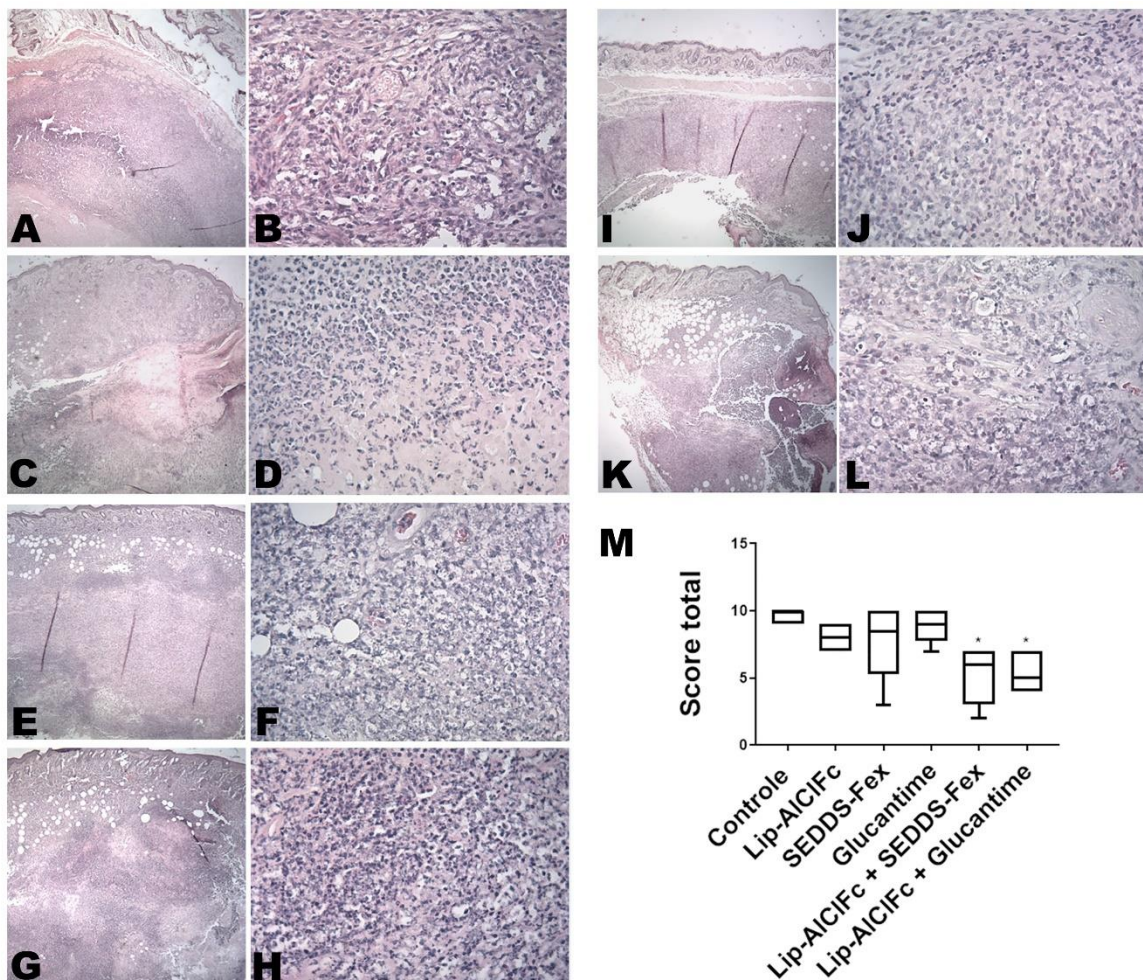


Imagem das lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* na base da cauda. As imagens foram obtidas no início e fim do tratamento dos animais. (A) Controle no início do tratamento e (B) fim do tratamento, (C) Lip-AICIFc no início do tratamento e (D) fim do tratamento, (E) SEDDS-Fex no início do tratamento e (F) fim do tratamento, (G) Glucantime® no início do tratamento

e (H) fim do tratamento, (I) Lip-AICIFc + SEDDS-Fex no início do tratamento e (J) fim do tratamento e (K) Lip-AICIFc + Glucantime® no início do tratamento e (L) fim do tratamento.

A análise histológica da pele (**Figura 15**) mostra que a infecção por *L.(L.) amazonensis* induziu alterações inflamatórias significativas no grupo controle (**Figura 15A e Figura 15B**). Foram observadas extensas áreas de necrose na derme e infiltrado inflamatório intenso apresentando tanto células polimorfo como mononucleares, com predomínio de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. Em diversas amostras, observou-se também a presença de áreas de ulceração, com descontinuidade da epiderme. No grupo que recebeu o Glucantime®, o padrão da lesão observada foi na maioria das amostras semelhante ao grupo controle. Entretanto, também foi notada a presença de corpúsculos calcificados na derme, sugestivos de calcificação distrófica, bem como regiões com maior deposição de fibras colágenas (fibrose) (**Figura 15C e Figura 15D**). No grupo que recebeu o Lip-AICIFc tópico (**Figura 15E e Figura 15F**), a maior parcela das amostras apresentou infiltrado inflamatório na derme e áreas de ulceração relativamente menores que nos grupos anteriores. Já no grupo que recebeu SEDDS-Fex, observou-se grande variabilidade no padrão das lesões, com algumas amostras apresentando grande número de neutrófilos e macrófagos, além de áreas significativas de necrose na derme, enquanto, outras apresentavam restrição do infiltrado celular e áreas de ulceração limitadas (**Figura 15G e Figura 15H**). Para as combinações Lip-AICIFc + Glucantime® e Lip-AICIFc + SEDDS-Fex, notou-se uma sutil redução das alterações inflamatórias induzidas pela infecção, com infiltrado inflamatório menos intenso, áreas de necrose e de ulceração menores que nos outros grupos. Esses resultados corroboram o score total encontrado (**Figura 15M**), onde as combinações apresentaram os valores mais baixos e diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

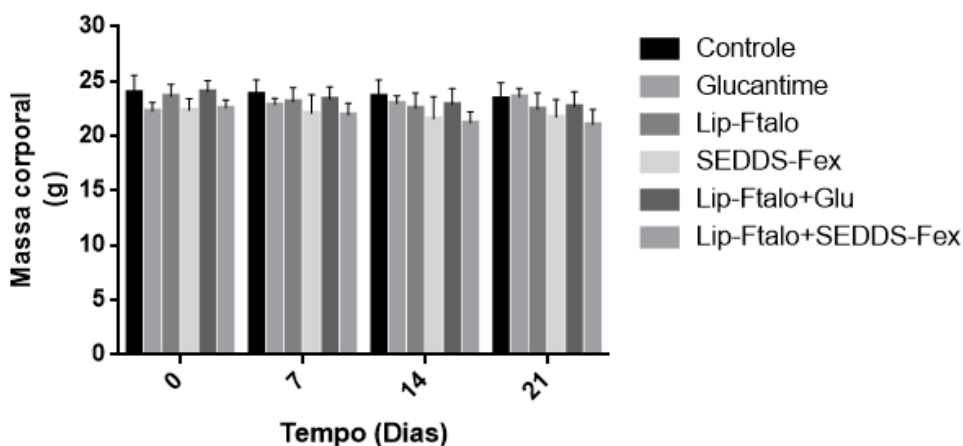
Figura 15 - Análise histopatológica das lesões de pele dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e análise do Score Total



A análise histopatológica (H&E) foi realizada nos grupos controle (A e B), Glucantime® (C e D), Lip-AICIFc (E e F), SEDDS-Fex (G e H), Lip-AICIFc + Glucantime® (I e J) e Lip-AICIFc + SEDDS-Fex (K e L). A primeira coluna à direita apresenta as imagens com aumento de 4x e a segunda coluna à esquerda a imagem com aumento de 40x. (M) Score total. Dados apresentados como mediana \pm máximo/mínimo. * Os grupos Lip-AICIFc + Glucantime® e Lip-AICIFc + SEDDS-Fex apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

Por fim, com objetivo de avaliar a toxicidade dos tratamentos, o peso e sinais de mudança de comportamento (como agitação, prostração e piloreção) dos animais foram acompanhados durante o tratamento. Não houve diferença significativa do peso dos animais nos diferentes tempos de tratamento ($P > 0,05$) (Figura 16), nem presença de outros sinais de toxicidade. Estes dados são semelhantes aos obtidos por Lopes *et al.* (2019), Morais-Teixeira *et al.* (2019) e Damasio (2021).

Figura 16 - Peso dos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* submetidos a diferentes tratamentos nos tempos: início-0,7,14 e 21 dias.



Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) amazonensis* na base da cauda. Após o desenvolvimento das lesões ulceradas os animais foram tratados com o grupo Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Glucantime®, associação Lip-AICIFc+ SEDDS-Fex, associação Lip-AICIFc+ Glucantime® e Controle (animais infectados e não tratados). Os animais foram pesados no início (0 dias) e nos dias 7, 14 e 21 após início do tratamento. As barras representam as médias e os desvios padrão. Comparação do peso de todos os grupos nos diferentes tempos não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Entendemos que seria interessante uma investigação mais profunda sobre a diferença em relação aos resultados obtidos no estudo conduzido por Lopes e colaboradores (2019), como por exemplo, a realização de ensaios para avaliar a indução de resistência do parasito, entretanto, em função da pandemia não foi possível a condução. Assim, apesar das limitações deste estudo, o conjunto de resultados obtidos aponta que a combinação do tratamento tópico Lip-AICIFc com os sistêmicos (Glucantime® ou SEDDS-Fex) pode ser promissora para o tratamento da LT.

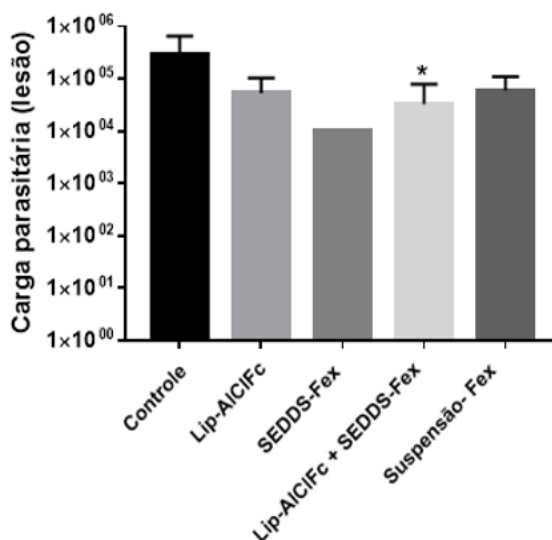
5.2.2 Estudo *in vivo* com espécie *L. (L.) major*

A *L. (L.) major* é uma das principais espécies causadoras de LT no Velho Mundo, sendo uma das espécies prevalente na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e África. A coinfeção com HIV tem levado a manifestações atípicas da LT, como foi observado em um surto relacionado a esta espécie em Burkina Faso, na África (BURZA *et al.*, 2018). Dessa forma, estes fatores mostram a importância da busca por novas alternativas terapêuticas para LT também causada por esta espécie. É importante ressaltarmos que cada espécie de *Leishmania* apresenta características bioquímicas

e moleculares específicas e, portanto, a sensibilidade aos fármacos é também diferente (ESCOBAR *et al.*, 2002). Foram encontrados estudos publicados sobre a eficácia *in vivo* do Fex e da AICIFc contra diferentes espécies causadoras de LT do Novo Mundo e LV do Novo e Velho Mundo (WYLLIE *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2019), entretanto, não foi encontrado nenhum estudo que tenha avaliado a eficácia contra *L. (L.) major*. Assim, para este estudo de eficácia terapêutica, consideramos ser interessante avaliarmos a formulação convencional (suspensão) de Fex, que foi utilizada em estudo anterior (DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2019) para espécies causadoras de LT no Novo Mundo.

Inicialmente os animais foram experimentalmente infectados com *L. (L.) major* e o desenvolvimento de lesões seguiu o prognóstico descrito na literatura (AGUIAR *et al.*, 2009). Conforme mostrado na **Figura 17**, a carga parasitária no grupo controle ($3,0 \times 10^5$) foi superior à observada em todos os grupos tratados, apresentando diferença significativa em relação ao grupo tratado com a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex ($p < 0,05$).

Figura 17 – Determinação da carga parasitária na lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* para avaliação da eficácia terapêutica de diferentes tratamentos *in vivo*



Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) major* na base da cauda. Os tratamentos utilizados foram Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex e grupo sem tratamento (Controle). Os animais foram tratados por 20 dias consecutivos, sendo os grupos Lip-AICIFc e associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex tratados em dias alternados em 10 sessões de TFD e os grupos SEDDS-Fex, Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex foram tratados por 20 dias consecutivos e por gavagem. Um dia após o fim dos tratamentos a carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante. * $p < 0,05$ quando a associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex comparado ao grupo Controle.

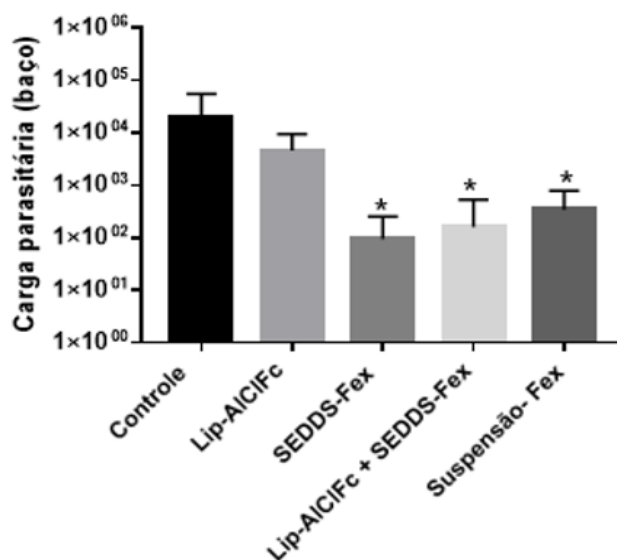
Quando avaliamos a carga parasitária no baço, apresentada na **Figura 18**, podemos observar que a carga parasitária no grupo controle foi superior a todos os grupos tratados, sendo que os grupos tratados com as monoterapias SEDDS-Fex e suspensão-Fex, assim como, o grupo tratado com a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex apresentaram uma redução significativa quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Também, foi possível observar diferença estatística quando comparamos o grupo Lip-AICIFc com os grupos SEDDS-Fex e a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos parecem apontar para uma maior eficácia leishmanicida da suspensão de Fex contra *L. (L.) major* em relação à *L. (L.) amazonensis*, já que para reduzir da carga parasitária no baço, utilizando o mesmo protocolo de tratamento, foi necessária a dose 200 mg/kg/dia de Fex na forma de suspensão no segundo caso

(DE MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2019), enquanto, neste estudo a dose de 50 mg/kg/dia foi suficiente.

Também é interessante observamos que SEDDS-Fex foi capaz de levar uma redução maior da carga parasitária, na lesão e no baço, que a suspensão Fex, provavelmente por Fex encontrar-se totalmente solubilizado quando administrado na forma de SEDDS-Fex. Tarral e colaboradores (2014) mostraram que a biodisponibilidade do Fex administrado na forma de comprimido em humanos é aproximadamente 25 % menor do que quando administrado na forma de suspensão, a absorção reduzida do Fex, na forma de comprimido, é explicada pelo tempo necessário para desintegração e dissolução, pois a taxa de dissolução do fármaco é o fator determinante para o grau de absorção dentro de um dado período de trânsito gástrico.

Figura 18 – Determinação da carga parasitária no baço de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* para avaliação da eficácia terapêutica *in vivo*

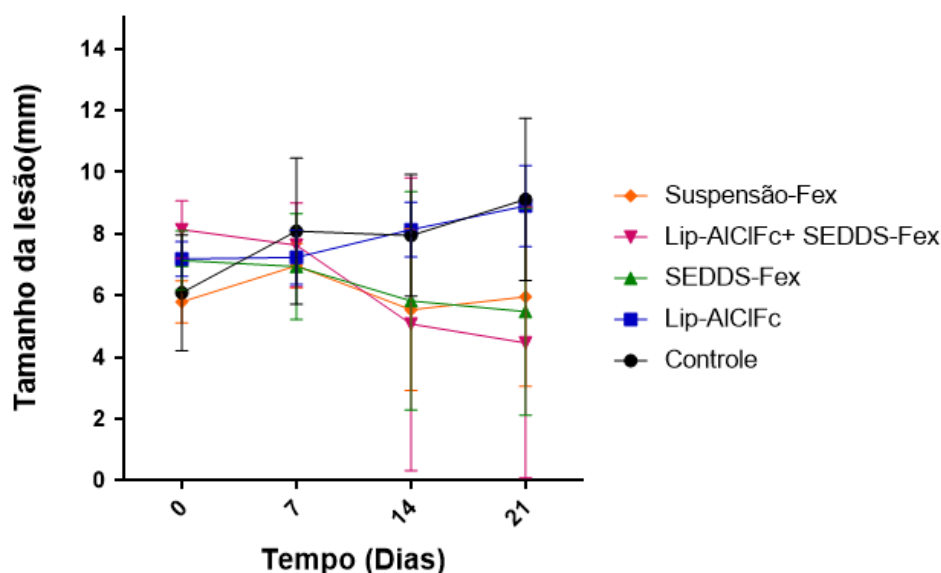


Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) major* na base da cauda. Os tratamentos utilizados foram Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex e grupo sem tratamento (Controle). Os animais foram tratados por 20 dias consecutivos, sendo os grupos Lip-AICIFc e associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex tratados em dias alternados em 10 sessões de TFD e os grupos SEDDS-Fex, Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex foram tratados por 20 dias consecutivos e por gavagem. Um dia após o fim dos tratamentos a carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante. * $p < 0,05$ quando comparado os grupos SEDDS-Fex, suspensão-Fex e a associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex com o grupo Controle.

A **Figura 19** mostra a evolução do tamanho da lesão após o início do tratamento em função do tempo. No início do tratamento, os animais tratados apresentavam lesões








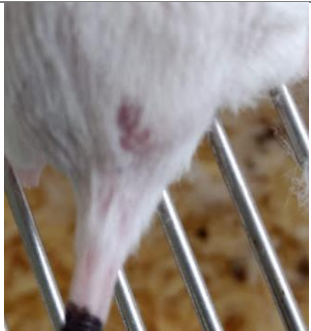
com diâmetro médio igual a: grupo controle ($6,1 \pm 1,9\text{mm}$), Lip-AICIFc ($7,2 \pm 0,6\text{ mm}$), SEDDS-Fex ($7,1 \pm 1,0\text{mm}$), combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex ($8,1 \pm 0,9\text{mm}$) e suspensão-Fex ($5,8 \pm 0,7\text{mm}$) sem diferença significativa entre todos os grupos ($p > 0,05$). As lesões dos animais tratados com as monoterapias SEDDS-Fex, suspensão de Fex e com a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex diminuíram durante o período de avaliação, até a cicatrização completa da lesão de um animal dos grupos tratados com as monoterapias e de três animais no grupo tratado com a combinação, que pôde ser observado 14 dias após o início da terapia (**Tabela 10**). Este tempo de cicatrização está em consonância ao apresentado em outros trabalhos que mostraram a eficácia de tratamentos em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* (MUSSI; FERNANDES; FERREIRA, 2007; AGUIAR *et al.*, 2009).

Figura 19 - Monitoramento do tamanho da lesão em resposta a diferentes tratamentos de camundongos fêmeas BALB/c infectados com de *L. (L.) major*



Acompanhamento do diâmetro médio das lesões em função do tempo. Os tratamentos utilizados foram Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex e grupo sem tratamento (Controle). Os animais foram tratados por 20 dias consecutivos, sendo os grupos Lip-AICIFc e combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex tratados em dias alternados em 10 sessões de TFD e os grupos SEDDS-Fex, Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex foram tratados por 20 dias consecutivos e por gavagem. Um dia após o fim dos tratamentos, as análises estatísticas mostram que no tempo inicial não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 10 - Avaliação do efeito do tratamento em camundongos BALB/c infectados com *L (L.) major*

Grupo	Início do tratamento (0 dias)	Fim do tratamento (21 dias)
Controle		
Lip-AICIFc		
SEDDS-Fex		
Lip-AICIFc + SEDDS-Fex		

**Suspensão-
Fex**

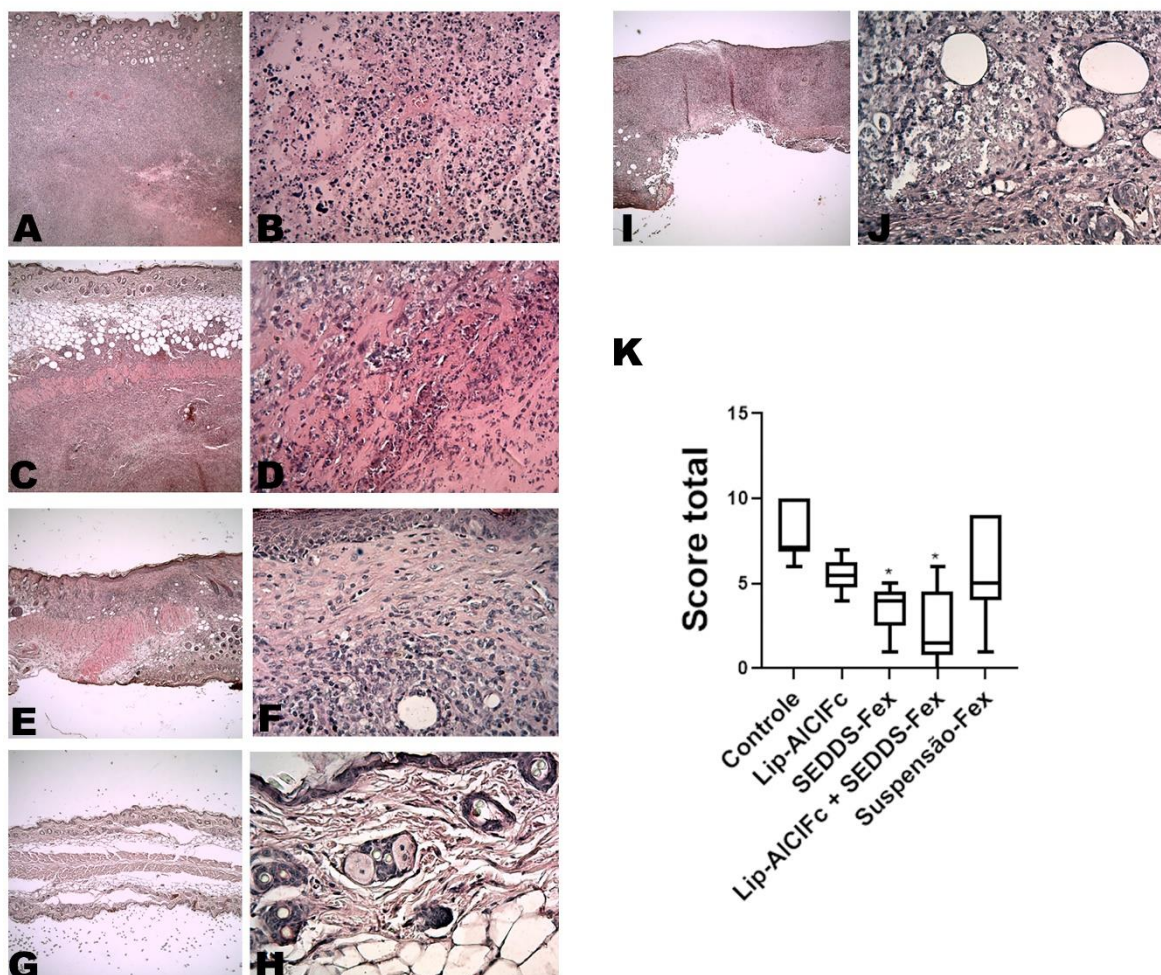


Acompanhamento da progressão das lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* na base da cauda. As imagens foram obtidas no início (0 dia) e fim do tratamento (21 dias) dos animais. Os grupos analisados foram: Controle, Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, Lip-AICIFc + SEDDS-Fex e suspensão-Fex.

A análise histopatológica das amostras (**Figura 20A e Figura 20B**) indicou, no grupo controle, uma lesão inflamatória e necrótica extensa. A lesão foi caracterizada por ampla áreas de necrose e de ulceração, bem como infiltrado inflamatório misto, com predomínio de macrófagos mononucleares em regiões mais profundas da derme, enquanto que, em áreas mais superficiais, predominaram neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Em algumas amostras, foram detectados macrófagos vacuolizados e parasitados, bem como pontos de calcificação distrófica. Também foram observadas alterações na epiderme, incluindo exocitose, acantose e disceratose. No grupo que recebeu tratamento Lip-AICIFc (**Figura 20C e Figura 20D**) as alterações detectadas foram menos intensas, sendo que não foram observadas alterações na epiderme, incluindo ausência de áreas ulceradas em quase todas as amostras. Já o infiltrado inflamatório e as áreas de necrose variaram de moderadas, em sua maioria a intensas. Características semelhantes foram vistas no grupo que recebeu SEDDS-Fex (**Figura 20E e Figura 20F**), prevalecendo o infiltrado inflamatório de moderado a intenso, não houve alterações na epiderme e a lesão necrótica foi restrita à derme. A combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex (**Figura 20G e Figura 20H**) atenuou o fenótipo da lesão, não sendo observada lesão da epiderme, ausência de necrose na maior parte das amostras. Concomitantemente, o infiltrado inflamatório mononuclear também foi restrito, variando de leve a moderado. Por fim, no grupo tratado com Suspensão-Fex (**Figura 20I e Figura 20J**) observou-se uma variação da lesão entre os animais do grupo, sendo que alguns apresentaram alterações intensas como as descritas no grupo controle, enquanto outros apresentaram lesão leve, em área limitada. O score total é apresentado na **Figura 20K**, onde podemos observar

que os grupos SEDDS-Fex e combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 20 – Análise histopatológica dos camundongos fêmeas BALB/c infectados com *L. (L.) major* e análise do Score Total



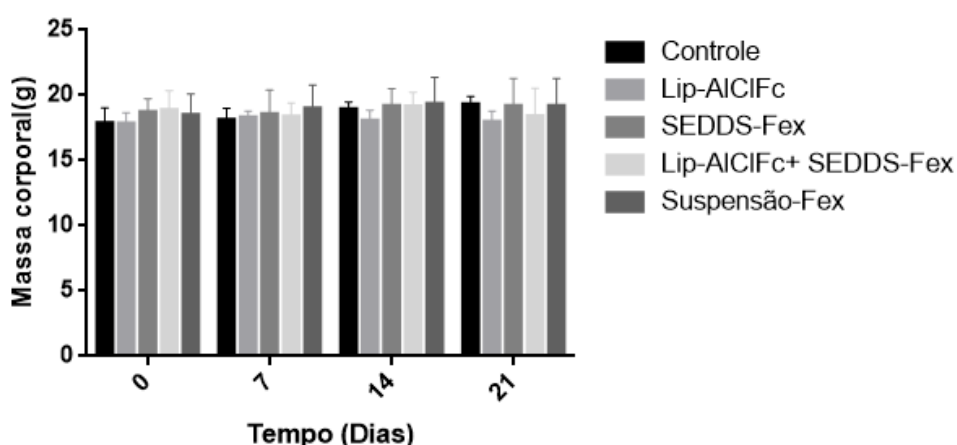
A análise histopatológica (H&E) foi realizada nos grupos controle (A e B), Lip-AICIFc (C e D), SEDDS-Fex (E e F), combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex (G e H), suspensão-Fex (I e J). A primeira coluna à direita apresenta as imagens com aumento de 4x e a segunda coluna à esquerda a imagem com aumento de 40x. (K) Score total. Dados apresentados como mediana \pm máximo/mínimo. * Os grupos tratados com SEDDS-Fex e associação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

Embora, nem sempre a melhora clínica, com redução do tamanho da lesão durante e após a terapia se correlacione com a atividade anti-leishmania (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), no presente estudo observamos tanto a redução da carga parasitária nas regiões avaliadas (lesão e baço), como a melhora clínica das lesões, com redução do tamanho e cicatrização, assim como, no aspecto histopatológico quando os animais foram tratados com a combinação de SEDDS-Fex + Lip-AICIFc, o

que indica que esta combinação pode ser promissora para o tratamento da LT causada por *L. (L.) major*.

Por fim, a **Figura 21** demonstra a variação do peso dos animais ao longo do período do tratamento, e como podemos observar não houve diferença significativa do peso dos animais nos diferentes tempos de tratamento ($P>0,05$), mesmo com o aumento de doses administradas de SEDDS-Fex. Também não houve sinais de mudança de comportamento (como agitação, prostração e piloreção).

Figura 21 – Avaliação do peso dos camundongos Balb/C infectados com *L. (L.) major* submetidos a diferentes tratamentos



Camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com amastigotas *L. (L.) major* na base da cauda. Após o desenvolvimento das lesões ulceradas os animais foram tratados com o grupo Lip-AICIFc, SEDDS-Fex, combinação Lip-AICIFc+ SEDDS-Fex, suspensão- Fex e Controle (animais infectados e não tratados). Os animais foram pesados no início (0 dias) e nos dias 7, 14 e 21 após início do tratamento. As barras representam as médias e os desvios padrão. Comparações entre o peso de todos os grupos não foram estatisticamente significantes ($p> 0,05$).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível avaliar a eficácia do tratamento tópico com Lip-AICIFc combinado a tratamentos sistêmicos em diferentes espécies causadoras de LT, sendo uma espécie do Novo Mundo e outra do Velho mundo.

Primeiramente, foram preparadas e caracterizadas as formulações Lip-AICIFc e SEDDS-Fex que apresentaram características físico-químicas condizentes com as vias de administração propostas. Em seguida, o ensaio com a espécie *L. (L.) amazonensis* demonstrou uma situação frequente na prática clínica e ressaltou a importância da busca por tratamentos mais eficazes e seguros para os pacientes. Na literatura ainda não é evidente os fatores de influência que determinam o insucesso terapêutico da LT. Entretanto, apesar do modelo experimental ser considerado de difícil tratamento para a LT e haver uma provável alteração do parasito, o grupo tratado com a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex obteve um resultado positivo na carga parasitária do baço quando comparado aos outros grupos e também na histopatologia houve diferença estatística comparado ao controle.

Ademais, no estudo *in vivo* com a espécie *L. (L.) major*, os resultados obtidos ao utilizar a combinação Lip-AICIFc + SEDDS-Fex foram eficazes na redução da carga parasitária tanto na lesão quanto no baço. Bem como os achados histopatológicos e a avaliação dos efeitos terapêuticos visto na lesão estão em concordância com esses resultados.

Portanto, a leishmaniose consiste em um desafio no ramo terapêutico devido aos diversos fatores que a influenciam. O tratamento da LT deve ser eficiente, seguro, sem hospitalização e menos invasivo. Por esse motivo, a combinação do Lip-AICIFc + SEDDS-Fex é uma estratégia promissora na busca por uma nova alternativa terapêutica para a LT.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. *et al.* Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with leishmania (*leishmania*) amazonensis. **Antimicrob agents chemother** v. 54, p. 4699-4704. 2010.
- AGUIAR, M. M. G. *et al.* Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of *Leishmania* (*leishmania*) major-experimentally infected mice leads to local and systemic reduction of parasite burdens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 1234-1240, 2009.
- AKBARZADEH, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.102-111, 2013. Springer Nature.
- AKILOV, O. E. *et al.* Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 8, p. 651– 60, 2007.
- ALVES, C. F. *et al.* American Tegumentary Leishmaniasis:effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of leishmania in skin. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 1-8, 21 maio 2013. Public Library of Science (PLoS).
- ANNUNZIO, S. R. *et al.* Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: a review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 16, p. 3861, 8 ago. 2019.
- ARRUDA, G. J. B. *et al.* Estratégias tecnológicas para formulações de anfotericina B em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, p. 59-67, 2016.
- BAHIA, M. T. *et al.* Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1870, 1 nov. 2012.
- BATES, P. A. *et al.* Revising *Leishmania*'s life cycle. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 529-530, 24 abr. 2018.
- BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife, v. 43, n. 2, p.167- 179, jun. 2007.
- BENSON, S. P. *et al.* Molecular Dynamics Simulations of Self-Emulsifying Drug-Delivery Systems (SEDDS): influence of excipients on droplet nanostructure and drug localization. **Langmuir**, [S.L.], v. 30, n. 28, p. 8471-8480, 11 jul. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico: Doenças tropicais negligenciadas 30 de janeiro – Dia mundial de combate às Doenças tropicais negligenciadas. **Boletim Epidemiológico** [Internet]; Número especial, março de 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt->

br/assuntos/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf. Acesso em: 03 jul. 2021

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução de diretoria colegiada- **RDC Nº 337, de 11 de fevereiro de 2020**. Diário Oficial da União, 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n-337-de-11-de-fevereiro-de-2020-243135104>. Acesso em: 15 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cenário atual do abastecimento dos medicamentos antileishmania no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, 2020a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p. : il. Disponível: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 03 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Caderno de indicadores: leishmaniose tegumentar e visceral**. Leishmaniose tegumentar e visceral. 2018. Disponível em: http://portalsinan.sau.gov.br/images/documentos/Agravos/LTA/Indicadores_Leishmanioses_2018.pdf. Acesso em: 03 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 56, de 30 de outubro de 2018**. Diário Oficial da União. 2018a. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543. Acesso em: 15 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. 2018b. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_Miltefosina_LeishmanioseTegumentar.pdf. Acesso em: 05 Mar. 2021.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em Saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_saude_situacao_hansenias.pdf. Acesso em: 03 jul. 2021

BURZA, S. *et al.* Leishmaniasis. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 951-970, set. 2018. Elsevier BV.

CERPNJAK, K. *et al.* Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Acta Pharmaceutica**, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 427-445, 1 dez. 2013. Walter de Gruyter GmbH.

CHANG, K.P. *et al.* Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, Chicago, v. 85, n. 3, p. 375-390, mar. 2003.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHATTERJEE, B. *et al.* Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3639–3652, 21 nov. 2016.

CHEN, Bin *et al.* Liposomal delivery of photosensitising agents. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 477-487, maio 2005. Informa Healthcare.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 111–126, 2006.

DAMASIO, D.S.N. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia de sistema auto emulsionável contendo fexinidazol no tratamento da leishmaniose visceral experimental**. 2021. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

DE MORAIS-TEIXEIRA, E. de *et al.* Combined suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], p. 254, 7 set. 2015. Oxford University Press (OUP).

DE MORAIS-TEIXEIRA, E.; RABELLO, A.; AGUIAR, M. M. G. In vitro activity and in vivo efficacy of fexinidazole against New World *Leishmania* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 8, p. 2318–2325, 1 ago. 2019.

DEEKS, E. D. *et al.* Fexinidazole: first global approval. **Drugs**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 215-220, 11 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

DNDi, Iniciativa Medicamentos Para Doenças Negligenciadas. Uma Nova Esperança para Pacientes Negligenciados. 2021 Disponível em: https://www.dndial.org/wp-content/uploads/2009/10/novaesperanca2014_compressed_pt.pdf?x96328. Acesso em: 02 abr. 2021.

DNDi. Tratamentos atuais. 2021a. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/tratamentos-atuais-leish/>. Acesso em: 12 jul. 2021.

DNDi, Iniciativa Medicamentos Para Doenças Negligenciadas. Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses, 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf. Acesso em: 05 jul. 2021.

ESCOBAR, P. *et al.* Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. *Acta tropica*, v. 81, n. 2, p. 151-157, 2002.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, jun. 2006.

ESPIAU, B. *et al.* Phenotypic diversity and selection maintain Leishmania amazonensis infectivity in BALB/c mouse model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 112, n. 1, p. 44-52, jan. 2017. FapUNIFESP (SciELO).

FIOCRUZ, Fundação Oswald Cruz. Leishmaniose. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/taxonomia-geral-7-doencas-relacionadas/leishmaniose-0>. Acessado em: 31 mar. 2021

FRÉZARD, F. *et al.* Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511–518, jun. 2005.

FRÉZARD, F.J.G. A caminho da cura da leishmaniose visceral canina. **Canal Ciência**, 4 de dez. 2015. Disponível em: <https://canalciencia.ibict.br/ciencia-em-sintese1/ciencias-exatas-e-da-terra/241-a-caminho-da-cura-da-leishmaniose-visceral-canina>. Acesso em: 15 jun. 21.

GANTA, S. *et al.* Nanoemulsions in Translational Research - Opportunities and Challenges in Targeted Cancer Therapy. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 15, n.3, p. 694-708, 2014.

GARNIER, T. *et al.* In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press (OUP), v. 60, n. 4, p. 802–810, jul 2007.

GRAÇA, G. C. *et al.* Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 5, p. 664-674, ago. 2012.

GUPTA, S.; CHAVHAN, S.; SAWANT, K. Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovirdipivoxil: design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 392, n. 1, p. 145-155, 2011.

GURSOY, R N. *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 58, n. 3, p. 173-182, abr. 2004. Elsevier BV.

HERNÁNDEZ, I.P. *et al.* In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S.L.], v. 117, p. 157-163, dez. 2012. Elsevier BV.

HOEFLER, R.; WANNMACHER, L. Combinações em doses fixas: comentários farmacológicos, clínicos e comerciais. Organização Pan-Americana de Saúde, vol. 4, nº 7, jun de 2007. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=513-combinacoes-em-doses-fixas-v-4-n-7-2006-3&category_slug=uso-racional-medicamentos-685&Itemid=965#:~:text=F%C3%A1rmacos%20em%20associa%C3%A7%C3%A3o%20podem%20gerar,com%20anti%2Dretrovirais%2C%20por%20exemplo. Acesso em: 31 mar. 2021.

HOMMEL, M. *et al.* Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89, p. 55-73, 1995.

INFOLEISH. Boletim informativo da redeLEISH - 4ª edição. Julho de 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/08/2019InformativoRedeLEISH_POR.pdf. Acesso em: 31 mar. 2021.

KAMINSKY, R *et al.* Miltefosine Zentaris. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 3, p. 550-554, 2002.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2017. 1202 p.

KAUR, Gagandeep *et al.* Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania. **Journal of Parasitology Research**, [S.L.], v. 2014, p. 1-11, 2014. Hindawi Limited.

KAWAKAMI, M. Y.M. *et al.* Efficacy of nanoemulsion with Pterodon emarginatus Vogel oleoresin for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 134, p. 111109, fev. 2021. Elsevier BV.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KOHLI, K. *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 15, n. 21-22, p. 958-965, nov. 2010. Elsevier BV.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. Stateofheart in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 66, n. 2, p.89-106, mar. 2002. Elsevier BV.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 151-162, mar. 2005.

LOPES, S. C. *et al.* Topical photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine liposomes is as effective as systemic pentavalent antimony in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 210–215, dez. 2019.

MATLASHEWSK, G. Leishmania infection and virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, p. 37-42, 2001.

MENDES, B. P. *et al.* Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*: a comprehensive study of the main transformation features in axenic culture and purification of metacyclic promastigotes by negative selection with bauhinia purpurealectin. **Parasitology**, [S.L.], v. 146, n. 6, p. 716-727, 27 dez. 2018. Cambridge University Press (CUP).

MERTINS, O. *et al.* Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ^1H e de ^{31}P . **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1856–1859, 2008.

MONTANARI, J. *et al.* Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. **Journal Of Controlled Release**, [S.L.], v. 147, n. 3, p. 368-376, nov. 2010. Elsevier BV.

MONTEIRO, N. *et al.* Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal Of The Royal Society Interface**, [S.L.], v. 11, n. 101, p. 20140459, 6 dez. 2014. The Royal Society.

MOZAFARI, M. R. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. **Cellular e Molecular Biology Letters** v. 10, n. 4, p. 9, 2005.

MUELLER, R. H.; M. 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. 161-177, 2000.

MURA, P. *et al.* Evaluation and Comparison of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Vectors to Develop Hydrochlorothiazide Effective and Safe Pediatric Oral Liquid Formulations. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 437, 24 mar. 2021. MDPI AG.

MUSSI, S. V.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania* (*Leishmania*) *major* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 100, p. 1221-1226, 2007.

NESI-REIS, V. *et al.* Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 239–245, mar. 2018.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana** /. 13. ed. São Paulo: Atheneu, 2016. 587 p.

NEVES, L. O. *et al.* Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea

ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 86, n. 6, p.1092-1101, dez. 2011. FapUNIFESP (SciELO).

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 273–284, fev. 2004.

OLIVEIRA, S. *et al.* Leishmanicidal effect of antiparasitic photodynamic therapy—ApPDT on infected macrophages. **Lasers In Medical Science**, [S.L.], v. 32, n. 9, p. 1959-1964, 27 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

OMS, Organização Mundial de Saúde. Leishmaniose. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 07 maio 2021.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington, 2019. Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis. Acesso em: 10 de maio de 2021.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. OMS destaca em Belo Horizonte possibilidade de contribuições para roteiro de combate a doenças negligenciadas. Julho de 2019a. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/28-7-2019-oms-destaca-em-belo-horizonte-possibilidade-contribuicoes-para-roteiro-combate>. Acesso em: 02 abr. 2021.

OPAS/OMS, Organização Pan-Americana de Saúde/ Organização Mundial da Saúde. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, Washington, Num.9, dez. 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>. Acesso em: 20 jun. 2021.

OPAS/OMS, Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde e Ministério da Saúde do Brasil. Curso de Leishmanioses Tegumentar no Brasil: diagnóstico e tratamento - Módulo II. Acesso em novembro de 2019.

OSPINA, V. E. *et al.* Permeação em pele humana de uma nanoemulsão de ftalocianina de alumínio clorada para a otimização de tratamentos tópicos de leishmaniose cutânea. **Revista ciência da saúde**, v. 12 no. 2, 2014.

OSORIO, Y. *et al.* Reinfection in American Cutaneous Leishmaniasis: Evaluation of Clinical Outcomes in the Hamster Model. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 353-356, jun. 1998.

PATEL, J. *et al.* Formulation and development of a self-nanoemulsifying drug delivery system of irbesartan. **Journal Of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 9, 2011. Medknow.

PERRY, M.R. *et al.* Visceral Leishmaniasis and Arsenic: an ancient poison contributing to antimonial treatment failure in the indian subcontinent. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 9, p. 1-6, 27 set. 2011. Public Library of Science (PLoS).

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: a 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1-24, 14 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS).

PORTILHO, F. *et al.* Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 41, 2013.

PINTO, C. S. *et al.* Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 24-30, jul. 2019.

REPOSITORY, Pitt Quantum. Fexinidazole. 2015. University of Pittsburgh. Disponível em: <http://pqr.pitt.edu/mol/MIWWSGDADVMLTG-UHFFFAOYSA-N>. Acesso em: 16 maio 2021.

RIBEIRO, J. B. P. *et al.* Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 282–290, mar. 2016.

RIBEIRO, J. B. P. *et al.* Study of the efficacy of N-methyl glucamine antimoniate (SbV) associated with photodynamic therapy using liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL6 mice. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 26, p. 261-269, jun. 2019.

ROCHA, M. S. T. *et al.* Photodynamic therapy for cutaneous hemangiosarcoma in dogs. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, p. 39–43, set. 2019.

ROSSI-BERGMANN, B., A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e cultura (SBPC)**, v.60, p-54-57, 2008.

RITSCHER, W.A.; KEARNS, G.L. **Handbook of basic pharmacokinetic including clinical applications**. Washington: AphA, 2004. 432p.

SANTOS, K. L. M. *et al.* Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: a mini-review. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [S.L.], v. 32, p. 102032, dez. 2020. Elsevier BV.

SHARMA, V. K. *et al.* Self-Micro Emulsifying Drug Delivery Systems: A Strategy to Improve Oral Bioavailability. **Ars Pharmaceutica**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 97-109, jun. 2016.

SILVA, E. P. O.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. Chloro-aluminium phthalocyanine loaded in ultradeformable liposomes for photobiology studies on human glioblastoma. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 6, n. 83, p. 79631-79640, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC).

SILVA, F.C.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/dgkx2>. Acesso em: 20 abr. 2021.

SMITH, M.C. *et al.* Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 409, n. 24, p. 5779-5787, 31 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

SNOEK, E. V. D. *et al.* A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 8, p. 918–922, ago. 2008.

SOARES, R.O.A.; LEON, L. Modelos de Estudo para o Desenvolvimento de Drogas AntiLeishmania. *In*: SILVA, F.C.; ALVES, C. R.(org.). **Leishmanioses do continente americano** [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, pp. 413-428. ISBN 978-85-7541-568-9.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 73-79, 2006.

TARRAL, Antoine *et al.* Determination of an optimal dosing regimen for fexinidazole, a novel oral drug for the treatment of human African trypanosomiasis: first-in-human studies. **Clinical pharmacokinetics**, v. 53, n. 6, p. 565-580, 2014.

TORRELE, E. *et al.* Fexinidazole—a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, p. e923, 2010.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

VIANA, A. G. *et al.* Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 88, n. 1, p. 32-40, fev. 2013. FapUNIFESP (SciELO).

WANG, L. *et al.* Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 330, n. 2, p. 443-448, fev. 2009. Elsevier BV.

WYLLIE, S. *et al.* The Anti-Trypanosome Drug Fexinidazole Shows Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 119, p. 119re1-119re1, 1 fev. 2012.

WHO. Fact sheet: leishmaniasis. Março 2018. Disponível em inglês em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

YARDLEY, V.; CROFT, S.L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 41, n.4, p. 752-756, 1997.