

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Sandra Milena Leal Pinto

Desenvolvimento de uma nanoformulação com Alumínio-Cloro-Ftalocianina e
Paromomicina para tratamento da Leishmaniose

Brasília-DF

2016

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Sandra Milena Leal Pinto

Desenvolvimento de uma nanoformulação com Alumínio-Cloro-Ftalocianina e
Paromomicina para tratamento da Leishmaniose

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

Brasília-DF

2016

AGRADECIMENTOS

- Ao meu esposo, meu complemento perfeito, por seu amor, paciência e fidelidade.
- À minha princesa Gabriela, exemplo de coragem e de luta, os sonhos podem ser cumpridos quando perseveramos e confiamos na mão de Deus. Pelos mais cativantes sorrisos e abraços.
- Aos meus pais por sua infinita paciência e apoio. Por sua colaboração e amor na criação de Gabi, sem sua ajuda isto não teria sido possível.
- As minhas presadas amigas Viviana Roa e Laura Herrera pelo constante apoio e amizade.
- À minha “paisana” Paolin por sua amizade, orientação e incondicional ajuda e apoio. Mulher com grandes valores e sentimentos.
- À Flor, Ada e Júlio, três anjos em minha vida, a eles por sua amizade. Deus os abençoe sempre.
- À minha irmã na fé, Maria Fernanda Díaz, por seu amor, solidariedade e palavras certas.
- Ao Mateus e a Laise pela amizade, apoio, e pelas tequilas. Vocês estarão sempre em meu coração.
- À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos, pela aceitação, orientação e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.
- À Profa. Dra. Patricia Escobar Rivero, por permitir o meu acesso ao seu Laboratório. pela amizade, por seus ensinamentos e pela confiança

depositada no momento.

- Ao Prof. Ricardo Bentes, as palavras são insuficientes para expressar minha gratidão, obrigada pela confiança incondicional, apoio, e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório com excelência.
- Ao Prof. João Paulo Longo pela confiança e apoio no momento certo.
- Ao pessoal do laboratório de Quimioterapia e os investigadores do Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales da Universidad Industrial de Santander.
- Ao pessoal do Laboratório de Nanobiotecnología do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília pela boa vontade.
- À Profa. Dra. Leonor Yamile Vargas pelo apoio e confiança, e por sua disposição para a realização da quantificação da paramomicina por HPLC.
- Ao Prof. Dr. Vladimir Kourtnezov pela cordialidade para realizar a derivatização da paramomicina.
- Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann pela orientação na síntese da nanoemulsão.
- Aos professores do programa de pós-graduação da Universidad de Brasília por seus ensinamentos e sua contribuição em meu desenvolvimento pessoal e profissional.
- À senhora Zélia, pela constante disposição em ajudar e tornar as coisas mais simples.
- À CAPES, pelo apoio econômico e por permitir o desenvolvimento deste estudo.
- À COLCIENCIAS, pelo apoio na pesquisa.

Dedico este trabalho à meus pais em gratidão aos seus ensinamentos que me permitiram perseverar e alcançar sonhos

Hoje faço uma pausa para olhar para trás por um momento, vejo o caminho e posso dizer: Deus, eu chamei e respondiste, me protegeu como o pai que você é!. Mesmo quando as lágrimas nublaram meus olhos e portas foram fechadas, não deixou de me mostrar sua lealdade, sua palavra era vida e esperança, você foi meu refúgio, minha verdade e minha força.

¿ Como posso retribuir ao Senhor por todo o bem que ele me fez?

Salmo 116: 12

RESUMO

A leishmaniose é um problema de saúde pública em países em desenvolvimento. O tratamento dessa doença baseia-se principalmente no uso de antimoniais pentavalentes, em casos de falha terapêutica drogas como o Pentostam e a Anfotericina B tem sido utilizadas. Entretanto, a elevada toxicidade desses compostos e a geração de resistência a eles tem limitado o tratamento dessa doença, o que sugere o desenvolvimento de terapias mais efetivas. Por isso, realizou-se esta tese cujo objetivo principal consistiu no desenvolvimento de uma nanoformulação contendo o fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFt) e o antibiótico Paromomicina (PM) para ser utilizada no tratamento da Leishmaniose Cutânea por meio de Terapia Fotodinâmica. A nanoemulsão O/A de AICIFt e PM foi preparada por meio do método de emulsificação espontânea, sendo que depois de caracterizada e ter a sua estabilidade determinada, foi testada quanto a capacidade de induzir citotoxicidade em promastigotas, amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e células THP-1 diferenciadas, antes e depois da Terapia Fotodinâmica, TFD, (5 joules/cm²). Os resultados foram expressos como percentagens de inibição e concentração inibitória 50 e 90 (CI₅₀, CI₉₀) e como concentração citotóxica 50 e 90 (CC₅₀ e CC₉₀). Além disso, determinou-se *ex vivo*, em pele de camundongos Balb/c, a capacidade de permeação e de retenção dos sistemas de nanoemulsão mediante o sistema de células de *Franz* e *tape stripping*, respectivamente. Adicionalmente, camundongos Balb/c foram tratados topicamente na base da cauda com os sistemas da nanoemulsão durante 15 dias, após de seis dias do término do tratamento; fígado, pele, baço e rim foram extraídos para a análise da biodistribuição da AICIFt e PM por espectrofluorometria e cromatografia líquida de alto desempenho, respectivamente. Além disso, analisou-se a medula óssea dos camundongos para avaliar a formação de micronúcleos em eritrócitos policromatófilos, além de hemograma. Os resultados mostraram sistemas de nanoemulsão O/A com diâmetros hidrodinâmicos <30nm, monodispersos e potencial zeta perto de zero. A AICIFt conservou as propriedades físico-químicas quando no nanoconjugado e mostrou-se estável por quatro meses quando conservado a 4°C. O nanossistema de AICIFt e PM inibiu >90% do crescimento de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L.braziliensis* após TFD em concentrações onde não foi observado toxicidade nas células hospedeiras. Por outro lado, em *ex vivo* e *in vivo*, a AICIFt foi incapaz de permear a pele de camundongos Balb/c. Já a PM no nanoconjugado, permeou até 86 vezes mais do que a PM livre após de 6 horas em sistemas *ex vivo*. A PM acumulou mais no baço. Os sistemas de nanoemulsão não foram genotóxico, tampouco causaram irritabilidade, vermelhidão e laceração durante e após do tratamento tópico. A análise do hemograma mostrou diminuição no número de plaquetas na maioria dos camundongos. Estes resultados, além de originais, propõem um nanoconjugado promissor para ser utilizado no modelo murino de Leishmaniasis cutânea.

Palavras-chave: Leishmaniose; terapia fotodinâmica; Alumínio-Cloro-Ftalocianina; Paromomicina; fototoxicidade; THP-1, *L. braziliensis*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is still a public health problem in developing countries, which have morbidity on the increase. Pentavalent antimonials are still the mainstay of treatment, although in cases of therapeutic failure, another drugs such as Pentostan, and Amphotericin B, among others, are considered. However, the effectiveness of this therapy is limited due to its high toxicity, the emergence of acquired resistance, route of administration and prolonged length of therapy. For the above, the search for new drugs is a focus in investigation, actually. In order to formulate an alternative antileishmanial therapy, in this thesis is proposed the use of nanobiotechnology to optimize the combined effect of photodynamic therapy with aluminium-phthalocyanine chloride (AIClFt) and Paramomycin (PM), an antibiotic used to the treatment of the leishmaniasis in the Old world. If this nanoconjugate is active against the parasite, is not toxic and its nanoconjugated are able to penetrate layers of skin of mice, it could be used as a murine model of cutaneous leishmaniasis, in subsequent studies. According to above, the main objective of this thesis was to develop a nano-formulation of aluminium-phthalocyanine chloride and Paramomycin for the treatment of cutaneous leishmaniasis using photodynamic therapy. The oil/water (O/W) nanoemulsion of AIClFt and Paramomycin was prepared using the spontaneous emulsification method. Also, nanoemulsions with each individuals compounds and vehicles were prepared. The colloidal characterization of these nanosystems was made by measuring the hydrodynamic diameter and determining polydispersity index and zeta potential by dynamic light scattering and electrophoretic mobility, respectively. Furthermore, physicochemical characterization was performed to determine the absorption and emission spectra (excited 350nm) of AIClFt present in the nanosystem. pH, reactive oxygen species and stability at 4°C during four months were also determined. Promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania braziliensis* and differentiated THP-1 cells were treated with each of different nanoemulsion systems, before and after photodynamic therapy (5 joules/cm²), during 24 hours. The results were expressed as inhibition percents and 50 and 90% inhibitory concentration (IC₅₀ and IC₉₀). Permeability and ex vivo retention in skin of Balb/c mice of nanoemulsions were tested by Franz cells and tape stripping systems, respectively. In addition, Balb/c mice were treated topically with the nanoconjugates during 15 days. 6 days after treatment finished, liver, skin, spleen and kidney were extracted in order to analyze the AIClFt and PM biodistribution by spectrophotometry and High performance liquid chromatography (HPLC), respectively. Also, bone marrow of mice was analyzed to detect micronucleous in polychromatic erythrocytes. It was obtained intracardiac blood to hematologic analysis. The O/W nanoemulsion systems showed hydrodynamic diameters <30nm, they were monodispers and its values of zeta potential were near to zero. The AIClFt retained its physicochemical properties as nanoconjugate and it was stable during 4 months at 4°C. The AIClFt and PM nanosystem was able to inhibit the growth of >90% of promastigotes and intracellular promastigotes of *L. braziliensis* after photodynamic therapy using no toxic concentrations for host cells, showing selectivity. Moreover, In ex vivo and in vivo systems, AIClFt did not able to penetrate a skin of Balb/c mice while PM nanoconjugate penetrate 86 fold

more than PM free, after 6 hours in ex vivo systems. In vivo assays, concentrations up to 292.96 μ M were detected in spleen of treated animals. The nanoemulsion system did not show genotoxicity neither irritability, redness nor tearing during and after topical treatment. Decreased platelet count was recorded in most of mice. Another blood cells were not altered. These results suggest a promising nanoconjugate to be used in the murine model of cutaneous Leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniose, photodynamic therapy; Alumínio-Cloro-Ftalocianina Paromomicina; fototoxicidade; THP-1, *L. braziliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Classificação taxonômica da <i>Leishmania</i>	9
Figura 2. Principais formas da <i>Leishmania spp</i> , corados com Giemsa	10
Figura 3. Diagrama de Jablonsky simplificado. Mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas pela luz	24
Figura 4. Morfologia de nanogotículas presentes nos sistemas NE-AICIFt obtidas em microscópio de eletrônico de transmissão	42
Figura 5. Espectros de absorção dos sistemas NE-AICIFt, NE-AICIFt-PM15% AICIFt –DMSO, nm: nanômetros	43
Figura 6. Espectros de emissão da fluorescência dos sistemas de NE-AICIFt, NE-AICIFt-PM15% e AICIFt –DMSO	44
Figura 7. Geração de ERO dos sistemas de NE	45
Figura 8. Estabilidade coloidal do sistema de nanoemulsão AICIFt-PM15%	47
Figura 9. Estabilidade do sistema de NE de AICIFt e combinado considerando a capacidade de gerar ERO	48
Figura 10. A toxicidade da nanoemulsão e seus componentes (surfactante e óleo) contra as promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .	66
Figura 11. Efeito citotóxico e fototóxico de sistemas de nanoemulsão contendo ou não Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina e dos compostos Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina livres em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .	67
Figura 12. Efeito citotóxico e fototóxico da nanoemulsão (veículo) e de seus componentes (surfactante e óleo) em amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> .	70

Figura 13. Efeito citotóxico e fototóxico de sistemas de nanoemulsão contendo Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina em amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> .	71
Figura 14. Sistema de irradiado.	82
Figura 15. Ilustração da pesagem de camundongos Balb/c tratados com sistemas de nanoemulsão	83
Figura 16. Citotoxicidade e fototoxicidade da nanoemulsão e dos seus componentes sobre células THP-1 não infectadas	88
Figura 17. Citotoxicidade e fototoxicidade dos componentes e sistemas de nanoemulsão contendo Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina sobre células THP-1 não infectadas.	89
Figura 18. Aspecto da pele dos camundongos tratados topicamente com os sistemas de nanoemulsão.	93
Figura 19. Modelo da célula de Franz utilizado na avaliação da permeabilidade <i>ex vivo</i> da PM e AICIFt livre e em nanoemulsão	104
Figura 20. Permeação <i>ex vivo</i> do antibiótico Paromomicina (PM) em pele murina	107
Figura 21. Retenção do antibiótico Paromomicina no estrato córneo e na derme de camundongos ICR	109
Figura 22. Retenção do Alumínio-Cloro-Ftalocianina no estrato córneo e derme de camundongos ICR	111
Figura 23. Biodistribuição da Paramomicina em órgãos de camundongos Balb/c	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de Paromomicina e de Alumínio-Cloro Ftalocianina AICIFt presente nos sistemas de nanoemulsão	39
Tabela 2. Caracterização coloidal dos sistemas de nanoemulsão contendo Paromomicina e ou Alumínio-Cloro Ftalocianina	41
Tabela 3. Estabilidade dos sistemas de NE em termos de caracterização fisicoquímica utilizando a água como diluente	49
Tabela 4. Estabilidade dos sistemas de NE em termos de caracterização fisicoquímica utilizando o PBS como diluente	49
Tabela 5. Concentração de Alumínio-Cloro Ftalocianina e Paromomicina e ou presente nos sistemas de nanoemulsão	50
Tabela 6. Resultados hematológicos de camundongos tratados topicamente com os sistemas de NE	90
Tabela 7. Genotoxicidade e peso de camundongos Balb/c tratados com sistemas de NE	92
Tabela 8. Permeação de Paromomicina contida em sistemas de nanoemulsão em pele murina	108
Tabela 9. Biodistribuição in vivo da PM veiculizada em sistema de NE	112

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	7
2.1 <i>Leishmanioses: epidemiologia, parasita e manifestações clínica</i>	8
2.2 <i>Fármacos empregados no tratamento da Leishmaniose Tegumentar</i>	14
2.3 <i>Nanotecnologia aplicada ao tratamento das Leishmanioses</i>	19
2.4 <i>Terapia Fotodinâmica</i>	24
3. Justificativa	28
4. Objetivos	30
5. Preparo e Caracterização dos Sistemas de Nanoemulsão	
5.1 Introdução	33
5.2 Materias e Métodos	35
5.2.1 <i>Reagentes</i>	35
5.2.2 <i>Preparo dos sistemas de nanoemulsão</i>	35
5.2.3 <i>Determinação da concentração de Alumínio-Cloro Ftalocianina e Paromomicina nos nanossistemas</i>	36
5.2.4 <i>Caracterização coloidal dos sistemas de nanoemulsão</i>	37
5.2.5 <i>Caracterização físico-química dos sistemas de nanoemulsão</i>	37
5.2.6 <i>Caracterização morfológica dos sistemas de nanoemulsão</i>	37
5.2.7 <i>Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio</i>	38
5.2.8 <i>Determinação da estabilidade dos sistemas de nanoemulsão</i>	38

5.3 Resultados	
5.3.1 Preparo dos sistemas de nanoemulsão	39
5.3.1 Caracterização dos sistemas de nanoemulsão	39
5.4 Discussão	51
6. Avaliação do Efeito Antiparasitário do Sistemas de Nanoemulsão	
6.1 Introdução	60
6.2 Metodologia	61
6.2.1 Linhagens celulares	61
6.2.2 Preparo das soluções e dos sistemas de nanoemulsão	61
6.2.3 Sistema de irradiação	62
6.2.4 Atividade antiparasitária dos sistemas de nanoemulsão	62
6.2.5 Toxicidade e fototoxicidade em células THP-1 infetadas	63
6.2.6. Análise estatística	63
6.3 Resultados	64
6.3 Discussão	72
7. Avaliação da Toxicidade dos Sistemas de nanoemulsão	
7.1 Introdução	79
7.2 Metodologia	81
7.2.1 Ensaio de toxicidade e fototoxicidade em células THP-1 não infetadas: um ensaio in vitro	81
7.2.2 Efeito genotóxico dos nanossistemas: um ensaio in vivo	81
7.2.2.1. Coleta de sangue e de medula óssea	83

7.2.3	<i>Considerações éticas</i>	84
7.2.4	<i>Análise estatística</i>	84
7.3	Resultados	85
7.4	Discussão	94
8.	Avaliação da Permeabilidade e Retenção ex vivo e Biodistribuição in vivo dos Sistemas de Nanoemulsão	
8.1	Introdução	100
8.2	Metodologia	103
8.2.1	<i>Permeação do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo</i>	103
8.2.2	<i>Retenção do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina E do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo</i>	104
8.2.3	<i>Ensaio de biodistribuição in vivo Retenção do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo presente nos sistemas de NE</i>	105
8.2.4	<i>Quantificação do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo</i>	105
8.2.5	<i>Análises estatísticas</i>	106
8.3	Resultados	106
8.4	Discussão	114
9.	Conclusões	119
10.	Referencias Bibliográficas	123

A Leishmaniose Tegumentária Americana constitui um grupo de manifestações clínicas, lesões cutâneas e de mucosas, causadas por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania* que é transmitido ao homem pela picada de insetos *Lutzomya spp* (MUSKUS & MARÍN-VILLA, 2002).

Esta doença é considerada um problema de saúde pública em aproximadamente 98 países, onde perto de 12 milhões de pessoas estão infetadas e 350.000 em risco de infecção. Nas Américas, a cada ano é diagnosticado em média de 60.000 casos de Leishmaniose, sendo o Brasil um dos 10 países com maior prevalência da forma cutânea. Adicionalmente, apesar da elevada morbidade, esta doença é considerada uma infecção negligenciada pelas indústria farmacêutica (OMS, 2014).

O tratamento atual para esta parasitose está focado no uso de antimoniais pentavalentes como o Glucantime® e o Pentostam®, os quais tem sido a droga de eleição por várias décadas. No entanto, os longos períodos de tratamento, o tipo de administração parenteral, a toxicidade, geração de cepas resistentes, a efetividade dependente da espécie e o estado imunológico do paciente, entre outros, são algumas das limitações reportadas. Consequentemente, outras drogas como pentamidina, anfotericina B, miltefosine, e paramomicina tem sido selecionadas como segunda opção nos casos em que os antimoniais têm dano terapêutico (REITHINGER *et alli*, 2007; OPS, 2013). Desta forma, a investigação focalizada ao desenvolvimento de novos tratamentos é prioritária.

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido utilizada principalmente no tratamento do câncer e de doenças da pele; esta terapia usa fotossensibilizantes os quais ao serem ativados por uma luz com um comprimento de onda específico

e na presença de oxigênio molecular geram espécies reativas de oxigênio, que ao interagir com as células alvo causam a morte da mesma (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001; BAPTISTA & WAINWRIGHT, 2011). A TFD utilizando algumas ftalocianinas tal como a Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AICIFt) tem demonstrado inibir *in vitro* o crescimento de diferentes espécies de Leishmania do Novo Mundo (ESCOBAR *et alli*, 2006; HERNÁNDEZ *et alli*, 2012). A AICIFt tem demonstrado elevada efetividade, no entanto, até agora não há uma formulação ideal que permita conservar suas propriedades físico-químicas estáveis para que ela possa ser utilizada em modelos *in vivo* e em ensaios clínicos.

Por outro lado, a Paromomicina tem sido utilizada como medicamento de eleição para o tratamento de Leishmaniose cutânea do Velho Mundo, no entanto, só não é capaz de atravessar a pele por sua falta de permeabilidade, desta forma, cremes, loções, pomadas, entre outros, têm sido desenvolvidos e testados contra diferentes espécies de Leishmania causadoras da forma cutânea. Mas, a sua efetividade variável e a sua baixa penetração na pele continuam limitando seu uso (MINODIER & PAROLA, 2007; SALAH *et alli*, 2013; JAMIL *et alli*, 2015)

Adicionalmente, considerou-se a via tópica como uma forma de administração não invasiva, que permite a entrega sistêmica de fármacos (sistema transdérmico) com menor agressividade na sua aplicação (CEVC & VIERL, 2010). Apesar de esta via de administração levar a perda de eficiência dos fármacos administrados, devido ao fato de o estrato córneo ser menos permeável, este estudo se concentrou nas nanoemulsões, pois elas desempenham papel importante no transporte de drogas (MCCLEMENTS, 2012), estes sistemas são descritos como ideais para o transporte de fármacos de uso tópico devido à sua

estabilidade, rápida permeabilidade e facilidade de ser absorvidas na pele (SONNEVILLE-AUBRUN *et alli*, 2004; GUTIÉRREZ *et alli*, 2008).

Neste contexto e mediante o uso de ferramentas nanobiotecnológicas, nesta tese considerou-se a combinação da AICIFt e Paromomicina em um mesmo sistema de nanoemulsão O/A de modo a preservar as propriedades físico-químicas do fotossensibilizante e facilitar a permeabilidade da Paromomicina.

Assim, este documento apresenta em primeiro lugar, um marco referencial contextualizando a Leishmaniose, a epidemiologia, os agentes etiológicos e o ciclo da vida, os quadros clínicos e os tratamentos, além, se fazer uma descrição sobre o uso de produtos nanobiotecnológicos a serem utilizados na terapia leishmanicida (estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*) e é descrito também o uso de alguns fotossensibilizantes utilizados na terapia fotodinâmica.

Adicionalmente, é apresentado a justificativa do trabalho realizado e o desenvolvimento dos objetivos propostos distribuídos em diferentes capítulos.

O primeiro capítulo trata do desenvolvimento, otimização, caracterização e estabilidade de uma nanoemulsão (NE) óleo/água com AICIPc e PM. O nanoconjugado foi preparado mediante o método de emulsificação espontânea mostrando diâmetro hidrodinâmico menor que 30nm, monodispersidade e potencial zeta negativos pertos de zero. A AICIPc conservou suas propriedades fotofísicas quando foi incluída no sistema de nanoemulsão, demonstrando a geração de espécies reativas de oxigênio após a ativação do fotossensibilizante; adicionalmente, se observou estabilidade coloidal do sistema durante quatro meses.

Posteriormente, foram avaliadas as propriedades antiparasitárias dos nanossistemas nas formas extracelulares (promastigotas) e intracelulares (amastigotas intracelulares) de *Leishmania braziliensis*. Os resultados mostraram >90% de inibição das duas formas parasitárias logo do tratamento com NE-PM15%, NE-AICIPc e NE-AICIPc/PM15% e 32 minutos de irradiação (5 joules/cm²) quando a PM e a AICIPc encontravam-se nas concentrações de 0.4 e 24.3 µM respectivamente. Desta forma, é demonstrado *in vitro* o efeito leishmanicida dos nanossistemas com índices de seletividade maior que 1.5.

Após, é apresentado o efeito toxicológico *in vitro* e *in vivo* dos nanossistemas. A viabilidade celular foi determinada usando a sal de tetrazolio MTT, a formação de micronúcleos *in vivo*, alteração nos tipos celulares do sangue, no peso e possíveis efeitos colaterais na pele tratada também foram avaliados. Os nanossistemas demonstraram toxicidade *in vitro* quando o surfactante utilizado (cremofor) encontrava-se concentrado, no entanto, esta fototoxicidade não foi observada nas concentrações onde os sistemas de NE apresentaram inibição do parasito. Além disso, não foi observado formação de micronúcleos na medula óssea dos camundongos Balb/c tratados com os nanossistemas e irradiados por 7 minutos (20 joules/cm²) e tampouco mudanças significativas nos tipos celulares do sangue, uma contagem baixa de plaquetas foi observado em todos os animais tratados. O peso dos animais não foi modificado. Adicionalmente, sinais de irritabilidade, vermelhidão ou laceração na pele dos camundongos não foi observado após do tratamento tópico e TFD.

Além, são mostrados os resultados da retenção, permeabilidade *ex vivo* e a biodistribuição *in vivo* da AICIPc e da PM presente nas nanoemulsões. A AICIPc

não foi capaz de permear a pele de camundongos Balb/c *ex vivo* e *in vivo*, parte dela foi retida no estrato córneo e na epiderme. Quanto à PM, esta começou a permear a pele a partir de três horas e depois de 24 horas sua permeação foi até 4 a 5 vezes maior do que quando se encontrava dissolvida em tampão fosfato-salino (PBS). Os resultados de biodistribuição da PM no baço, fígado, rim e pele de camundongos Balb/c tratados topicamente com os sistemas de NE combinado (AICIPc-PM15%) durante 15 dias mostrou que este composto acumula principalmente no baço ($p=0.004$), sendo que concentrações entre 26.87-292.49 μM foram encontradas nos órgãos.

Estes resultados demonstram que estes sistemas de NE sintetizados são bons veículos para o transporte da AICIPc e da PM, além de serem ativos contra a *L. braziliensis*, mas com baixa toxicidade, desta forma, a NE- AICIPc /PM15% torna-se em um excelente candidato a ser utilizado no modelo murino da Leishmaniose Tegumentária Americana.

Finalmente são descritas as conclusões finais do trabalho e são citadas as referências que suportam a informação apresentada e/ou discutida neste estudo.

2.1 Leishmanioses: epidemiologia, parasita e manifestações clínicas.

As leishmanioses constituem um complexo de antropozoonoses endêmicas em regiões de florestas tropicais, desertos nas Américas e na Ásia ocidental e até em áreas rurais e periurbanas, principalmente de países em desenvolvimento (DE LUCA & MACEDO, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em sua nota descritiva N° 375 (2014), a cada ano surgem no mundo entre 900 mil a 1.3 milhões de novos casos de leishmanioses, causando 20 a 30 mil mortes anualmente (OMS, 2014). Nas Américas, em 2012, foram notificados 52.919 casos. Destes, mais de 80% estão em quatro países: Brasil com 40% dos casos, Colômbia com 20%, Peru com 16% e Nicarágua com 5% (OMS, 2014).

Esse complexo de antropozoonoses é causado por protozoários da família Trypanosomatidae, pertencentes ao gênero *Leishmania*, que estão distribuídos em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (ver Figura 1). De acordo com o Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC, em inglês, 2016), nesses dois subgêneros já foram documentadas mais de 21 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem.

Apesar de morfologicamente indistinguíveis, essas espécies podem ser diferenciadas por meio da análise de isoenzimas, por métodos moleculares ou anticorpos monoclonais. No subgênero *Leishmania* estão incluídos o complexo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*) e o complexo *L. mexicana* (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) tropica*; *L. (L.) major*; *L. (L.) aethiopica*). No subgênero *Viannia* estão incluídos o complexo *L. braziliensis* (*L. (V) braziliensis* e *L. (V) peruviana*) e o complexo *L. guyanensis* (*L.*

(*V. guyanensis* e *L. (V.) panamensis*) (MUSKUS & MARÍN-VILLA, 2002; WHO, 2010).

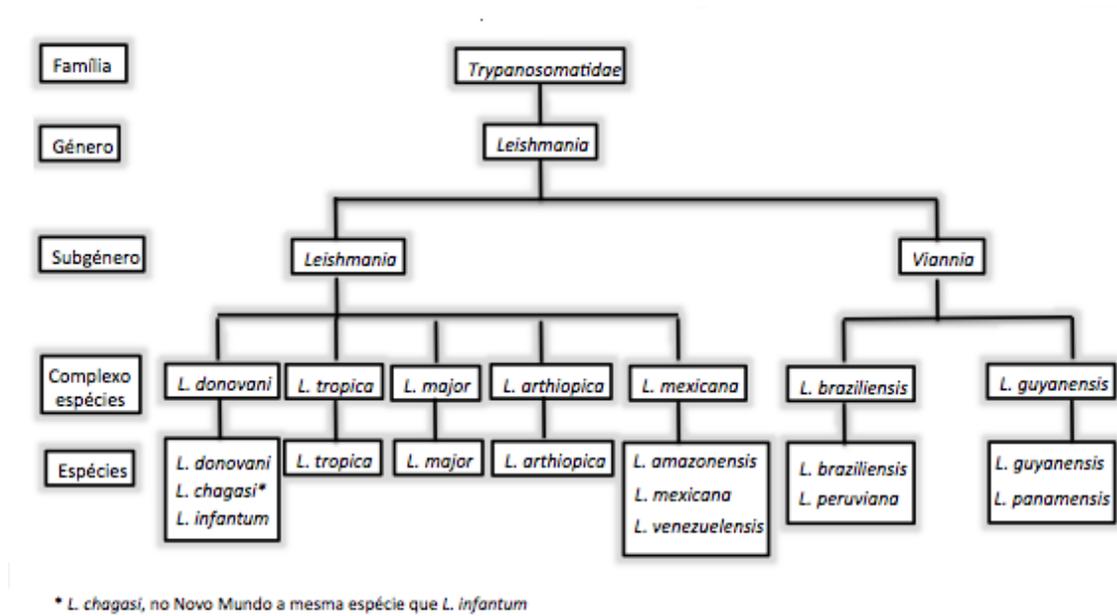


Figura 1. Classificação taxonômica da *Leishmania*. Modificado da WHO, 2010.

O protozoário *Leishmania ssp* apresenta ciclo biológico heteroxênico, ou seja, completa o seu ciclo de vida alternando-se em um hospedeiro invertebrado e um vertebrado; apresentando-se, de acordo com a fase do ciclo, sob duas formas estruturais principais: amastigotas e promastigotas. As formas amastigotas são arredondadas, imóveis e sem flagelo aparente, medem entre 2 a 4µm de diâmetro (PÊSSOA & MARTINS, 1982) e são encontradas em fagócitos mononucleados de mamíferos. As formas promastigotas são alongadas e flageladas, com grande mobilidade, medem de 14 a 20µm de comprimento (PÊSSOA & MARTINS, 1982) e são encontradas no intestino médio do inseto vetor. No invertebrado são encontradas ainda outras formas do parasita, elas correspondem a diferentes fases de diferenciação da forma promastigota, são elas: promastigota procíclica, promastigota nectomonada, promastigota haptomonada, promastigota

leptomonadas e promastigota metacíclica. A Figura 2 ilustra as principais formas do parasita no hospedeiro mamífero e no vetor (MSB, 2007; MUSKUS & MARÍN-VILLA, 2002; KAMHAWI, 2006).

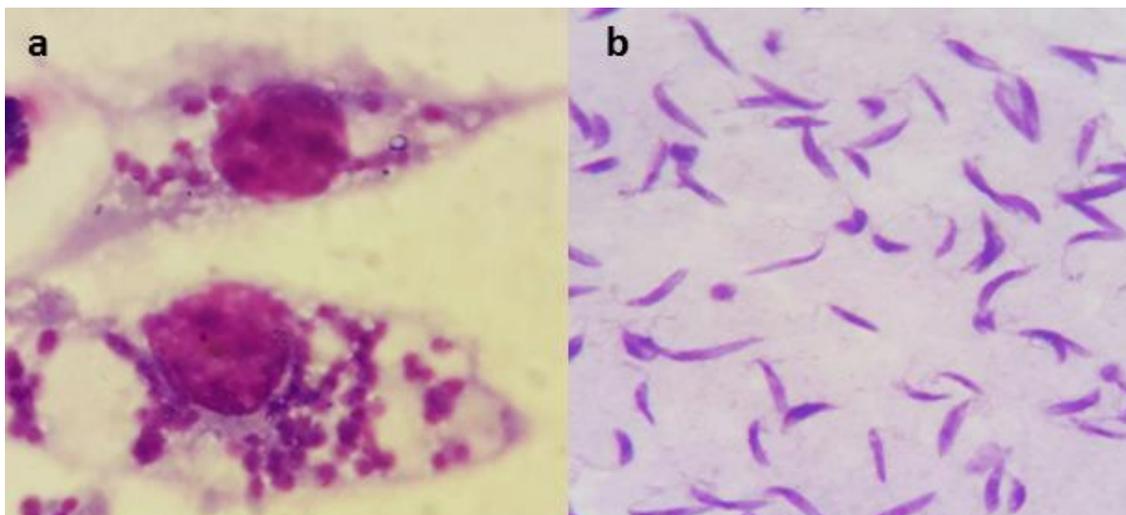


Figura 2. Principais formas da *Leishmania spp*, corados com Giemsa. (a): amastigota intracelular; (b): promastigota, formas encontradas, respectivamente, no hospedeiro mamífero (a) e no vetor (b). Fonte: Sandra Milena Leal Pinto.

A infecção do vetor, um inseto do gênero *Lutzomyia*, ocorre quando as fêmeas, durante o repasto sanguíneo, ingerem sangue de mamíferos com macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. O sangue ingerido passa para o intestino médio do inseto onde começa a ser envolvido por uma membrana, denominada de matriz peritrófica, constituída de quitina, proteínas e glicoproteínas secretadas pelas células do próprio epitélio intestinal do inseto (WALTERS *et alli*, 1993; PIMENTA *et alli*, 1997; SECUNDINO *et alli.*, 2005). Nesse ambiente ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando assim as forma amastigotas que se reproduzem por divisão binária e, devido a alteração das condições fisiológicas, como diminuição da temperatura e aumento do pH, diferenciam-se rapidamente em formas flageladas mais resistentes à ação das

enzimas digestivas, denominadas de promastigotas procíclicas. Após sucessivas divisões binárias, as formas amastigotas se diferenciam em formas flageladas, formas denominadas de promastigotas procíclicas, que também se reproduzem por sucessivas divisões binárias. Dois ou três dias depois as formas promastigotas procíclicas diferenciam-se em promastigotas nectomonadas. Estas começam a secretar a enzima quinase que rompe a matriz peritrófica (ROGERS *et alli*, 2008). Uma vez fora da matriz peritrófica as promastigotas nectomonadas aderem ao epitélio intestinal, o que impede a sua eliminação durante a excreção do sangue digerido, e se movem em direção ao intestino anterior, onde se transformam em promastigotas leptomonadas. Estas também se reproduzem por sucessivas divisões binárias, se transformam em promastigota haptomonadas e migram para o esôfago e para a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. Nesse novo ambiente, as formas promastigota haptomonadas se multiplicam e se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. As formas promastigotas metacíclicas se desligam do epitélio intestinal de onde são regurgitadas então para a probóscide, sendo inoculadas na pele de um novo hospedeiro vertebrado quando o inseto picá-lo para realizar um novo repasto sanguíneo (KAMHAWI, 2006).

Uma vez inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas podem primeiramente ser fagocitados por neutrófilos que foram recrutados para o sítio da infecção. Os neutrófilos infectados passam a emitir sinais quimiotáticos que recrutam monócitos/macrófagos. Estes iniciam o processo de fagocitose dos neutrófilos infectados em apoptose e assim as leishmanias são fagocitadas por macrófagos. Uma vez no interior dos macrófagos

as formas promastigotas iniciam a sua transformação em amastigotas – formas mais adaptadas ao pH ácido do meio e que possuem enzimas como a catalase e a superóxido dismutase em grandes concentrações, protegendo o parasita da explosão oxidativa dos macrófagos (WALLER & MCCONVILLE, 2002). Naquele compartimento ácido, as formas promastigotas se multiplicam intensamente o que causa a lise dos macrófagos. Desse modo, essas formas serão fagocitadas por outros macrófagos, macrófagos esses que poderão ser ingeridos pelo inseto vetor no momento do repasto sanguíneo (MOSSER & BRITTINGHAM, 1997; WALLER & MCCONVILLE, 2002).

Tendo em conta que existem diversas espécies de leishmanias capazes de infectar o homem, a leishmaniose é uma doença que pode apresentar-se de diferentes formas clínicas, geralmente denominadas de Leishmaniose cutânea, Leishmaniose mucosa e Leishmaniose visceral (MSB, 2014).

A Leishmaniose cutânea, LC, a forma clínica mais comum de leishmaniose, é caracterizada pela presença de lesões exclusivamente na pele, lesões essas que dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida ou do estado imunológico do paciente podem apresentar-se sob vários aspectos. Elas podem aparecer meses ou anos depois da infecção, ficando normalmente restritas no ponto de inoculação das formas promastigotas infectantes de qualquer espécie de *Leishmania*, essa forma clínica da doença é denominada de leishmaniose cutânea localizada. Mas, em 2% dos casos, em pacientes com deficiência na resposta imune celular contra antígenos de leishmanias, as lesões podem disseminar-se para vários segmentos corporais, sendo nesses casos denominada de leishmaniose cutânea difusa (MSB, 2007; MINODIER & PAROLA, 2007). As

principais espécies que causam a LC são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *Leishmania (Viannia) panamensis* (REITHINGER *et alli*, 2007; MINODIER & PAROLA, 2007).

A Leishmaniose mucosa, LM, é decorrente da disseminação, por via hematogênica ou linfática, das leishmanias inoculadas na pele para a mucosa oral e nasofaríngea e, excepcionalmente, para a mucosa da traqueia, e mais raramente para as conjuntivas oculares e para mucosas de órgãos genitais e ânus. Uma vez nesses órgãos a LM provoca a destruição, parcial ou completa, das suas membranas mucosas. A maioria dos casos, quase 90%, dessa forma clínica da leishmaniose ocorre na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2014). As principais espécies causadoras deste tipo de Leishmaniose são a *L. (V) braziliensis*, *L. (V) panamensis* e *L. (V) guyanensis*.

Nas Américas, as leishmanioses LC e LM são denominadas conjuntamente de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo que nos países onde ela ocorre constitui problema de saúde pública; o Brasil, por exemplo, no período de 2000 a 2013, apresentou média anual de 24.694 casos, com coeficiente médio de detecção de 13,5 casos por 100 mil habitantes (MSB, 2015).

Outro tipo de Leishmaniose é a Leishmaniose visceral, LV, popularmente conhecida como calazar, é a forma clínica mais severa de leishmaniose, sendo uma doença crônica e sistêmica (MSB, 2007; 2014) que acomete principalmente órgãos com grande concentração de células do sistema fagocitário mononuclear, tais como linfonodos, baço e fígado. Quando as células parasitadas com leishmanias atingem esses órgãos, por via hematogênica ou linfática, elas

proliferam levando-os à hipertrofia. As células parasitadas também podem chegar à medula óssea e uma vez lá o tecido hematopoiético é destruído e substituído por macrófagos. Além de destruir o tecido hematopoiético, promover hepatoesplenomegalia e hipertrofia dos linfonodos, a LV, que é mais frequente em crianças com idade entre um e quatro anos de vida, é caracterizada pela presença de febre, anemia, perda de peso e taquicardia. Algumas vezes, após a recuperação do paciente desenvolvem-se lesões cutâneas crônicas conhecidas como Leishmaniose dérmica pós-calazar (MSB, 2007). Países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão são os mais afetados por essa forma da doença, quase 90% dos casos notificados (WHO, 2014).

2.2. Fármacos empregados no tratamento da Leishmaniose Tegumentar

Normalmente, no tratamento da leishmaniose tegumentar, que pode consistir de terapias localizadas e/ou sistêmicas, nas quais se considera o quadro clínico e o estado imune do paciente, a espécie do parasita, além do local da lesão, como fármacos de primeira opção são empregados os antimoniais pentavalente, tais como o antimoniato de N-metilglucamina e o Estibogluconato de Sódio (OPS, 2013). Esses fármacos interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, pois inibem a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, o que ocasiona a redução da produção de ATP e GTP. As doses administradas desses antimoniais pentavalente são calculadas, de acordo com a recomendação da Organização Mundial da Saúde, em mg Sb+5/kg/dia (WHO, 2014). No Brasil é empregado como primeira opção de tratamento o antimoniato de N-metilglucamina, intravenosa ou intramuscular, na dose diária de 20

mgSb+5/kg/dia, durante 20 dias para LC e 30 dias para LM, pois o Estibogluconato de Sódio não é comercializado no Brasil (MSB, 2007; WHO 2014).

Além dos antimoniais, fármacos como o Isotionato de Pentamidina, a Anfotericina B, a Miltefosina e o Cetoconazol são utilizados no tratamento das diversas formas clínicas da leishmaniose, principalmente em casos de falha terapêutica dos antimoniais (MSB, 2006; 2014).

Nesses casos especiais, o Isotionato de Pentamidina, fármaco que bloqueia a enzima DNA topoisomerase II, fazendo com que os cortes nas moléculas de DNA não sejam reparados, levando a célula à morte, é administrado na dose de 4 mg/kg/3 doses/72 horas. A Anfotericina B, cujo mecanismo de ação decorre de sua ligação ao ergosterol, com consequente alteração da permeabilidade da membrana plasmática e do equilíbrio osmótico do parasita, no tratamento da leishmaniose é empregada na dose de 1mg/kg, diariamente ou em dias alternados. A Miltefosina, que altera as vias de sinalização celular mediadas por lipídeos, o que induz as leishmanias a apoptose, é administrada aos pacientes na dose de 1,5 a 2,5 mg/kg/dia, durante 28 dias. Já o Cetoconazol, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da biossíntese do ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana plasmática e do equilíbrio osmótico do parasita, é administrado na dose de 600 mg/dia, também durante 28 dias (ROMERO *et alli*, 2001; MOTTA *et alli*, 2006; BMS, 2007). A Miltefosina é mais administrada no caso de leishmanioses causadas por espécies tais como *L. guyanensis* e *L. panamensis* e o Cetoconazol no tratamento de infecções causadas por *L. mexicana* e *L. guyanensis*.

Vale ressaltar que essas drogas induzem severos efeitos adversos. O antimoniato de N-metilglucamina, por exemplo, induz artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, azia, dor abdominal, erupção cutânea, febre, fraqueza, dor de cabeça, tontura, insônia, choque pirogênico e edema. O Isetionato de Pentamidina induz o endurecimento e a formação abscessos no local da injeção, além de náuseas, vômitos, tonturas, mialgia, dor de cabeça, hipotensão, hipoglicemia e/ou hiperglicemia. Já os efeitos colaterais mais comuns induzidos pela Anfotericina B são febre, náuseas, vômitos, anemia hipocaliemia, flebite no local da infusão, insuficiência renal e alterações cardíacas, além do fato de ser administrado endovenosamente, o que limita o seu uso fora do ambiente hospitalar (MSB, 2015; BLUM *et alli*, 2004; CROFT *et alli*, 2006).

Além dos severos efeitos adversos, esses fármacos têm seu uso limitado, devido ao aparecimento de resistência, principalmente aos antimoniais, uma vez que muitos pacientes, devido ao fato de a terapia ser longa, abandonam o tratamento (FAGHIHI *et alli*, 2003; CROFT *et alli*, 2006; MINODIER & PAROLA, 2007; REITHINGER *et alli*, 2007). Por isso, novas terapias utilizando essas drogas antigas foram testadas de maneira a diminuir não só o tempo de tratamento como também aumentar a eficácia na eliminação da carga parasitária e diminuir os efeitos adversos. Nesse contexto, destaca-se a aplicação de injeções intralesionais de antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) descrito por Masmoudi e colaboradores (2006) e a aplicação de uma formulação tópica de Miltefosina® descrita por Schmitdt-Ott e colaboradores em 1999 e por Dorlo e colaboradores em 2012. Mesmo assim, embora a primeira vista tenham diminuído a carga parasitária, esses tratamentos geraram resistência ao parasito.

Os tratamentos que tem se mostrado mais promissores são aqueles que utilizam a combinação de drogas, como o descrito por Arevalo e colaboradores (2007); quando esses autores utilizaram a combinação de um creme dermatológico composto pelo imiquimode Modik (7.5%) e pelo antimoniato Glucantime, ou ainda, a combinação de uma droga leishmanicida com um antibiótico, como o aminoglicosídeo paromomicina (PM). Este antibiótico que tem se mostrado ativo contra protozoários, cestodos e bactérias, nas leishmanias afeta a atividade mitocondrial. Ele está disponível na forma de comprimidos, de cremes e de injeções. Um desses tratamentos foi descrito por Soto e colaboradores (1998), os autores demonstraram a cura das lesões tratadas com uma formulação tópica de PM e uma droga antimonial. Além dessa, outras combinações tem se mostrado eficazes contra as leishmanioses, como aquelas que envolvem a PM e a Miltefosina, a PM e o antimoniato de N-metilglucamina (MORAIS-TEXEIRA *et alli*, 2014). Ressalta-se o fato de que no ano de 2010, a OMS recomendou como melhor opção de tratamento da LV, no Este da África, a combinação de PM com o Estibogluconato de sódio (WHO, 2010) e que formulações tópicas de PM com veículos surfactantes, como ureia, cloreto de metilbenzotônio, ou outros antibióticos como a gentamicina ou mesmo os antimoniais, foram desenvolvidos para tratar a LC causada por espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo.

A primeira formulação tópica de PM desenvolvida foi a de um creme constituído de PM (15%) com Cloreto de Metilbenzotônio (CMB, 12%), esse creme embora tenha sido capaz de eliminar lesões causadas por *L. major*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. tropica* e *L. mexicana*, alguns pacientes apresentaram recidiva da lesão seis meses após o término do tratamento (ARANA *et alli*, 2001;

MINODIER & PAROLA, 2007). Já a formulação tópica constituída de PM (15%) e ureia (10%), embora tenha sido eficaz no tratamento de LC causada por *L. major*, não foi capaz de curar as lesões causadas por *L. mexicana* (NEVA *et alli*, 1997; IRAJI & SADEGHINIA, 2005). Essas duas formulações induziram efeitos adversos menores, mas foram menos eficazes do que o antimoníato de N-metilglucamina no tratamento da LC causada por *L. panamensis* (ARMIJOS *et alli*, 2004). Outra formulação que se mostrou eficaz foi o creme constituído de PM (15%) e 0.5% de Gentamicina (WR279.396), essa formulação curou as lesões causada por *L. panamensis* em 61% dos pacientes (Soto *et alli*, 2002). Em outro estudo, a PM e a Gentamicina foram capazes de eliminar as lesões causadas por *L. major* em 82% dos pacientes quando não estavam na mesma formulação (SALAH *et alli*, 2013). Uma formulação de PM em gel, embora tenha se mostrado mais eficaz contra a *L. amazonensis* do que os antimônios, contra a *L. braziliensis* mostrou eficácia semelhante (SANTOS *et alli*, 2005). Em 2015, Jamil e colaboradores mostraram a eficácia da PM administrada intramuscularmente (11mg/kg) durante 21 dias consecutivos em crianças e adultos contra LV, apesar de terem surgido alguns sinais de toxicidade, tais como insuficiência renal, deficientes auditivas e zumbidos (JAMIL *et alli*, 2015).

Diante do exposto, fica claro a necessidade de desenvolvimento de propostas de inovação tecnológica com fins de suplantar as dificuldades atuais encontradas no tratamento dos diferentes tipos de leishmanioses, como por exemplo, o desenvolvimento de nanossistemas que não só possam ser associados às drogas leishmanicida, mas que permitam a combinação de terapias. Nesse sentido destaca-se a nanobiotecnologia.

2.3 Nanotecnologia aplicada ao tratamento das Leishmanioses

Nanotecnologia, conhecida como o estudo, concepção, controle e manipulação da matéria em escala nanométrica, revelou-se atraente no campo da medicina como uma alternativa útil para o avanço de tratamentos dirigidos a alvos específicos, tornando-se assim, uma solução nova e acessível para melhorar o índice terapêutico de fármacos contra várias doenças (TANIGUCHI, 1974; SOTO *et alli*, 2002). Na literatura já foi relatado a aplicação da Nanotecnologia em terapias antileishmaniose, terapias essas que utilizaram diferentes nanoformulações, entre as quais se destacam os: (1) nanotubos de carbono, cilindros ou tubos ocos formados por alótropos do carbono com proporções nanométricas; (2) lipossomas, partículas esféricas constituídas de lipídeos que, graças à porção hidrofílica dos seus constituintes, retêm água na sua estrutura podendo encapsular substâncias de diversas naturezas; (3) nanopartículas.

A utilização de nanotubos do carbono no tratamento da leishmaniose foi avaliada, *in vitro*, por Saudagar e Dubey em 2012, esses autores conjugaram o Betulin, uma substância leishmanicida presente na casca das árvores de vidoeiro branco, a nanotubos de carbono (Be-NTCf). Esse nanossistema, Be-NTCf, foi mais eficaz contra formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* e mais tóxico para as células não infectadas do que o Betulin livre. Também em 2012, Prajapati e colaboradores relataram o efeito, *in vitro* e *in vivo*, de nanotubos do carbono funcionalizados com uma droga leishmanicida, a Anfotericina B (AnfB-NTCf) sobre *L. donovani*. Segundo esses autores a concentração de AnfB-NTCf necessária

para provocar a morte de 50% das células dentro de uma população (CL₅₀) é quase quatorze vezes maior do que a de AnfB livre, embora ambas formulações induzissem nível de toxicidade semelhante. Em hamsters com LV, os autores demonstraram que quando administrada oralmente a AnfB-NTCf inibiu em 99% a taxa de crescimento do parasito no baço.

A estratégia nanotecnológica para tratar a leishmaniose que envolve a utilização de lipossomas começou a ser desenvolvida já na década de 70 do século passado. Em 1978, Alving e colaboradores mostraram que drogas antimoniais eram mais eficazes quando encapsuladas em lipossomas do que quando livres. Posteriormente, Chapman e colaboradores (1984) demonstraram em cachorros com LV que após quatro injeções diárias, por via intravenosa, de uma formulação de N-metil-glucamina lipossomal (1.94mgSb/kg/dia) os parasitas presentes no baço eram eliminados. O efeito dessa formulação de N-metil-glucamina lipossomal também foi testado *in vitro* contra amastigotas intracelulares de *L. major* em 2011 por Borborema e colaboradores; os autores mostraram que a formulação de N-metil-glucamina encapsulada em lipossomas foi entre 10 - 63 vezes mais eficaz do que o fármaco livre.

Outro fármaco utilizado para tratar a leishmaniose, principalmente no tratamento da LV e da LC, que tem sido encapsulado em lipossomas é a Anfotericina B (AnfB). No ano 1986, Berman e colaboradores avaliaram a eficácia da AnfB lipossomal em hamsters e macacos (*Saimiri sciureus*) infetados com *L. donovani*; em ambas as espécies 99% dos parasitas foram eliminados do fígado e do baço. Logo depois, em 1991, Proffitt e colaboradores mostraram que a AnfB lipossomal (Ambisome) não era tóxica para camundongos e ratos. Similarmente,

em 1993, Gradoni e colaboradores demonstraram que três doses consecutivas de Ambisome durante três dias eliminaram completamente o parasita presente no baço sem induzir toxicidade. Mais tarde, em 1996, Gangneux e colaboradores demonstraram novamente a maior eficácia do Ambisome em relação à AnfB convencional contra em *L. infantum*. Nesse mesmo ano, Davidson e colaboradores publicaram um estudo clínico realizado em pacientes com LV, nele os autores mostram a alta eficácia do Ambisome quando administrado em 5-6 doses (3-4mg/kg) por 10 dias (DAVIDSON *et alli*, 1996). O Ambisome também se mostrou mais eficaz do que outras formulações lipídicas de Anfotericina B, o Amphocil e o Abelcet, (YARDLEY & CROFT, 2000). Na Europa, na África e na Ásia, a Anfotericina B lipossomal já é indicada para o tratamento de LV com doses de 20 mg/kg em pacientes imunocompetentes (BERN *et alli*, 2006). Inclusive na Índia, em 2011, Sundar e colaboradores relataram a cura de 97% dos pacientes infectados com *L. donovani* e tratados com Anfotericina B lipossomal cujas doses eram de 5mg/kg. Nas Américas, pacientes com LC causada por *L. braziliensis* apresentaram cura completa das lesões menos do um mês após do tratamento com Ambisome (SOLOMON *et alli*, 2007).

Outras drogas leishmanicidas como a Paromomicina (PM) e a Miltefosina quando encapsuladas em lipossomas mostraram efeitos diferentes, enquanto a Paromomicina lipossomal foi mais efetiva contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. major* do que a PM livre (JAAFARI *et alli*, 2009), a Miltefosina lipossomal foi tão eficaz quanto a Miltefosina livre contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. panamensis* e *L. braziliensis* (HERNÁNDEZ *et alli*, 2014),

Por outro lado, o fármaco Ftalocianina de zinco, droga que só é ativada quando irradiada, contida em lipossomas quando testado *in vitro* contra promastigotes de *L. braziliensis* matou 100% dos parasitas após irradiação por 15 minutos (MONTANARI *et alli*, 2010). Da mesma forma, a Ftalocianina de alumínio-cloro (AICIPc) contida em lipossomas foi mais eficaz do que a AICIPc livre na inibição do crescimento das formas extracelulares e intracelulares de *L. chagasi*, *L. panamensis* e *L. panamensis* (HERNÁNDEZ *et alli*, 2012).

A literatura também tem relatado o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas associadas a diversas drogas com atividade leishmanicida, tais como a Primaquina, droga que induz o aumento de peróxido de hidrogênio e é muito utilizada no combate e prevenção da malária (DURAND *et alli*, 1997a), a Metoxichalcona, composto extraído da planta *Piper aduncum* (TORRES-SANTOS *et alli*, 1999), a Artemicina, um metabólito secundário de plantas (WANT *et alli*, 2015) e a PM (HEIDARI-KHARAJI *et alli*, 2015).

Outro estudo que também utilizou uma substância de origem vegetal, a β -lapachona, substância encontrada em árvores da família Bignoniaceae, conhecidas no Brasil como ipês, foi relato por Moreno e colaboradores (2015). Nesse estudo, os autores associaram a β -lapachona a nanopartículas de quitosano-lecitina e mostraram que, embora não tenha sido capaz de eliminar o parasita, inibiu a progresso da lesão.

Além dessas, também foi testada a atividade leishmanicida de nanopartículas de prata e dióxido de titânio usando síntese verde a partir do extrato aquoso da folha de *Euphorbia prostrata*, sendo que as nanopartículas de prata mostraram-se mais ativas que as nanopartículas de dióxido de titânio contra

promastigotas e amastigotas intracelulares, respetivamente (ZAHIR *et alli*, 2015). A literatura relata também o efeito leishmanicida de nanopartículas de prata utilizando diferentes estratégias tais como aplicação de eletroporação (DOLAT *et alli*, 2015) e radiação luz ultravioleta (MAYELIFAR *et alli*, 2015).

Todas essas nanoformulações mesmo que tenham mostrado atividade leishmanicida igual ou melhor que os tratamentos convencionais, ainda apresentam eficácia que varia de acordo com a espécie do parasita. Além disso, apresentam desvantagens, principalmente no que diz respeito aos efeitos tóxicos que elas induzem, que embora menores, ainda continuam afetando os pacientes, além da necessidade de serem administradas parentalmente, o que pode, entre outros, provocar rompimento da pele, aumentando o risco de infecção por outros parasitas.

Nesse sentido, as nanoformulações de uso tópico podem constituir estratégia interessante no tratamento de leishmanioses, pois, além de menor custo, uma vez que não é necessário hospitalização, induzem menor toxicidade e são fáceis de serem aplicadas em comparação aos tratamentos parenterais (GARNIER & CROFT, 2002). Além disso, essas nanoformulações, de modo a permitir a combinação de terapias, poderiam ser constituídas, por exemplo, de uma droga com atividade leishmanicida e uma substância que seja inócua às células, mas que quando submetida à irradiação promova a morte celular; essas substâncias já são utilizadas em uma modalidade de fotoquimioterapia, mais especificamente na Terapia Fotodinâmica.

2.4 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica, TFD, é uma terapia que tem sido aplicada no tratamento de cânceres e doenças vasculares. Ela consiste na aplicação, sistêmica ou localizada, de uma substância fotossensibilizante (FS) seguida por sua excitação por uma luz de comprimento de onda específico. Dessa forma, ocorre o desencadeamento de uma reação fotoquímica entre o FS e o oxigênio molecular, sendo o resultado dessa reação a formação de espécies reativas de oxigênio (BAPTISTA & WAINWRIGHT, 2011). Esse efeito fotodinâmico ocorre por meio de duas reações, denominadas de reação do Tipo I e do Tipo II, conforme ilustrado na Figura 3.

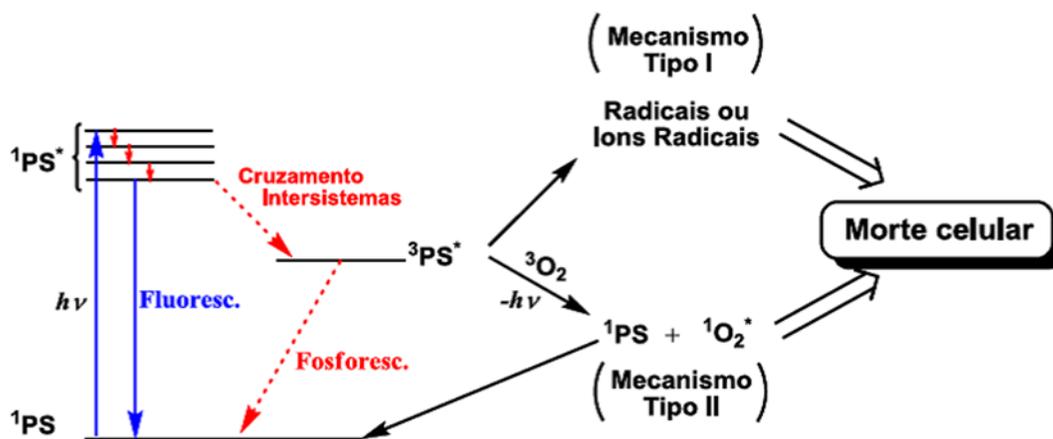


Figura 3. Diagrama de Jablonsky simplificado. Mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio mediadas pela luz. Modificado de: MacDonald & Dougherty, 2001.

Na reação do Tipo I, o FS quando irradiado absorve fótons da luz e as suas moléculas saem do estado fundamental, de mais baixa energia e passam para um estado singleto excitado. A energia do FS é transferida diretamente para um substrato orgânico como uma membrana celular ou uma biomolécula. Como resultado, esses substratos tornam-se reativos e capazes de interagir com o

oxigênio do meio, gerando espécies reativas de oxigênio tais como o ânion superóxido, $O_2^{\bullet-}$, o íon hidroxila, $OH^{\bullet-}$ e íons peróxidos, H_2O_2 . Muitas vezes, essas espécies reativas de oxigênio podem reagir com outras moléculas FS (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001).

Na reação do Tipo II, o FS excitado transfere energia diretamente ao oxigênio molecular presente nos tecidos biológicos. A partir dessa reação são formadas espécies de oxigênio no estado singleto, 1O_2 . O 1O_2 pode retornar ao estado tripleto, 3O_2 , liberando energia na forma de emissão de luz nos comprimentos de onda de 634 e 703 nm, ou ainda, por meio de ligações covalentes, oxidar biomoléculas tais como lipídios, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos (RONSEIN *et alli*, 2006; PLAETZER *et alli*, 2009). A oxidação de biomoléculas é o principal fator que induz as células à morte (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001; BAPTISTA & WAINWRIGHT, 2011). Esses dois tipos de reações podem ocorrer simultaneamente e a frequência de cada processo depende da concentração intracelular do FS.

O sucesso da TFD depende também das características do FS, um FS ideal deve apresentar algumas características tais quais: alta pureza química, alto coeficiente de absorção de luz, baixa tendência à agregação no meio aquoso, alto rendimento de produção de 1O_2 e citotoxicidade apenas quando irradiado (AKILOV *et alli*, 2006). Os primeiros FS utilizados na TFD foram os derivados de hematoporfirinas, sendo o primeiro deles o Photofrin®. Embora represente um progresso na pesquisa biomédica, eles apresentam baixa absorção no comprimento de onda de 600-800nm e, portanto, necessidade de doses altas de radiação, o que gera danos não específicos, além de serem excretados muito

lentamente pelo organismo, o que exige que o paciente permaneça ao abrigo da luz por vários dias para evitar o surgimento de lesões cutâneas (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001; BAPTISTA & WAINWRIGHT, 2011). Em razão disso, tem sido elaboradas pesquisas de modo a desenvolver FS mais eficientes, o que originou os FS de segunda geração. Esses novos FS possuem propriedades fotoquímicas e fotofísicas mais adequadas para serem utilizados na TFD; eles são ativados com comprimentos de onda entre 600-800nm, ou seja, conseguem ser excitados em planos mais profundos dos tecidos biológicos, apresentam elevado rendimento quântico na geração de 1O_2 e período de fotossensibilidade mais curto, além de serem tóxicos somente na presença da luz. Dentre os FS de segunda geração, destacam-se as ftalocianinas, compostos que podem ter a sua eficácia melhorada quando associados ao cloro ou a metais como zinco, silício e alumínio (TOMAZINI *et alli*, 2007).

Apesar de pouco conhecida do grande público, a TFD já é utilizada desde o início do século passado. Essa tecnologia foi primeiramente utilizada no tratamento de tumores malignos superficiais e, em seguida, no tratamento de infecções locais, fúngicas e bacterianas (LONGO & AZEVEDO, 2010). Recentemente, diversos estudos tem relatado a aplicação da TFD no tratamento de lesões cutâneas da leishmaniose. Nesses estudos a AICIFt tem sido o FS mais estudado, tanto em modelos *in vitro* e quanto *in vivo*. Em 2005, Dutta e colaboradores demonstraram, *in vitro*, o efeito citolítico da TFD mediada pela AICIFt em sua forma livre, dissolvida em DMSO, contra promastigotas de *L. amazonensis*. Esses mesmos resultados também foram relatados por Valdivieso e colaboradores (2008). Em 2006, Escobar e colaboradores demonstraram também a

eficácia da TFD mediada por esse mesmo FS só que na eliminação de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. panamensis*. Em 2012, Hernández demonstrou a cura total das lesões causadas pela *L. amazonensis* em hamster-sírio após TFD mediada também pela AICIFt. Também em 2012, Dutta colaboradores reportaram o efeito sinérgico de dois FS, AICIFt e Uroporfirin, contra *L. amazonensis* em modelos *in vitro* e *in vivo*. A AICIFt encapsulada em lipossomas também mostrou *in vitro* ser efetiva contra *L. panamensis* e *L. chagasi* como descrito por Hernández e colaboradores em 2012.

Ressalta-se o fato que não foram encontrados na literatura relatos sobre a utilização de TFD mediada por nanoemulsões catiônicas de AICIPc contra lesões de leishmaniose, embora elas tenham demonstrado ser fotoativas contra suspensões e biofilmes de *Staphylococcus aureus* resistentes e biofilmes de *Candida albicans* (RIBEIRO *et alli*, 2013a, b).

As Leishmanioses constituem um conjunto de manifestações clínicas produzidas por um parasito intracelular obrigatório capaz de sobreviver ao estresse da fagolisossoma intracelular fugindo da resposta imune humoral do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002). Assim, quando o parasito estabelece-se no hospedeiro pode induzir manifestações cutâneas e/ou em mucosas, estas últimas mais agressivas e crônicas, ou desenvolver-se em uma doença sistêmica caracterizada pelo alto potencial de letalidade.

A espécie de leishmania com maior prevalência no Brasil envolvida em casos de Leishmaniose Tegumentária Americana é a *L. braziliensis*, esta espécie de protozoário é capaz de induzir lesões cutâneas que podem curar espontaneamente, mas alterações no sistema imunitário do hospedeiro causariam recidivas que poderiam evoluir a mucocutâneas com tendência à cronicidade e tendo alto impacto na saúde dos pacientes e no sistema de seguridade social do país (OMS, 2010).

Além disso, tem que se considerar que além dos severos efeitos adversos, as drogas leishmanicidas têm uso limitado, pois é comum o aparecimento de resistência, principalmente aos antimoniais, drogas de primeira escolha (CROFT *et alli*, 2006; OPS, 2013).

Assim, o desenvolvimento de terapias mais efetivas, menos invasivas com o mínimo de efeitos colaterais que possam ser utilizadas no tratamento das várias formas clínicas da leishmaniose de modo que os índices de morbidade e mortalidade induzidos por essa doença possam ser reduzidos, justifica esta pesquisa.

Considerando a necessidade de se desenvolver novos materiais que possam ser utilizados no tratamento da leishmaniose de modo mais efetivo, mas que induzam menos efeitos adversos, este estudo tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma nanoformulação de Alumínio-Cloro-Ftalocianina associada ao antibiótico Paromomicina para ser utilizada no tratamento da Leishmaniose Cutânea por meio de Terapia Fotodinâmica.

Para tal foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- otimizar, caracterizar e determinar a estabilidade coloidal e físico-química dos sistemas de nanoemulsão desenvolvidos;
- avaliar o efeito antiparasitário *in vitro* dos sistemas de nanoemulsão antes e depois da TFD;
- avaliar a toxicidade dos sistemas de nanoformulação antes e depois da TFD;
- avaliar a permeabilidade, a retenção *ex-vivo* e a biodistribuição dos sistemas de nanoemulsão.

A metodologia utilizada neste estudo para que cada um dos objetivos específicos fosse alcançado e os respectivos resultados e discussão estão descritos cada um deles nos próximos capítulos (capítulos: 5, 6, 7 e 8) que constituem este documento.

5.1 INTRODUÇÃO

A produção de nanoveículos, tais como nanopartículas, nanoemulsões, microemulsões, lipossomas, nanocápsulas, nanobarras, entre outros, para o transporte de fármacos utilizados no tratamento de doenças infecciosas é cada vez mais frequente. Neste estudo foi produzido como transportador de fármacos a serem utilizados no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana um sistema de nanoemulsão, pois nanoemulsões têm sido descritas como sistemas ideais para o transporte de fármacos de uso tópico devido a sua estabilidade, rápida permeabilidade e facilidade de serem absorvidas pela pele (SONNEVILLE-AUBRUN *et alli*, 2004; GUTIÉRREZ *et alli*, 2008).

As nanoemulsões são sistemas que consistem em uma mistura imiscível de líquidos, onde um dos líquidos se dispersa no outro, formando gotículas de tamanho entre 20-300nm. Esses sistemas podem ser de óleo em água (O/A) ou de água em óleo (A/O) dependendo se a água está dispersa no óleo ou vice-versa (MCCLEMENTS, 2012). O pequeno tamanho das gotículas permite que esse sistema seja cineticamente estável contra a agregação, floculação e coalescência por vários anos.

Os sistemas de nanoemulsão podem ser gerados por processos de alta e baixa energia, os primeiros incluem o uso de ferramentas como homogeneizadores de alta pressão e sonificadores para gerar a energia suficiente e formar as nanogotículas, os segundos empregam as mesmas propriedades físico-químicas dos surfactantes, excipientes e co-surfactantes para criar um sistema na escala nanométrica (ANTON & VANDAMME, 2011).

Os métodos de baixo consumo de energia têm a vantagem da simplicidade da preparação, o método de emulsificação espontânea ocorre ao

misturar duas fases líquidas à temperatura ambiente, uma é a fase oleosa com surfactante solubilizado e outra a fase aquosa; desta forma o tensoativo (hidrofílico) presente na fase oleosa é solubilizado numa fase aquosa induzindo a formação de nanogotículas estabilizadas pelas moléculas anfifílicas.

O segundo método é o chamado método de temperatura de inversão de fases onde todos os componentes (óleo, surfactante não-iônico, água) são misturados por agitação ligeira, logo, a mistura é aquecida e o surfactante passa da fase aquosa para a fase oleosa e é solubilizado completamente nesta fase (ANTON & VANDAMME, 2009).

Neste sentido, a escolha de um sistema de nanoemulsão para veicular o antibiótico PM e o fotossensibilizante AICIFt para ser avaliado em modelo *in vitro* e *in vivo* de leishmanioses foi devido, principalmente, às características acima mencionadas tais como a estabilidade, a rápida permeabilidade e a facilidade de ser absorvido pela pele. Neste capítulo serão descritos os sistemas de nanoemulsão obtidos pelo método de emulsificação espontânea; estes nanossistemas foram devidamente caracterizados quanto à suas das propriedades físico-químicas ou coloidais que permitem obter sistemas cineticamente estáveis. A caracterização teve como base, principalmente, a determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersidade e o potencial zeta das nanogotículas, conforme descritos por Gutiérrez e colaboradores (2008). Adicionalmente, foram determinados a morfologia, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, e a capacidade do fotossensibilizante AICIFt em gerar espécies reativas de oxigênio medindo-se os espectros de fluorescência e luz visível.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes

O Kolliphor ELP, óleo de castor, 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), - Fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB), o sal de Paromomicina sulfato (PM), o fotossensibilizante Alumínio-Cloro Ftalocianina (AICIFt), ácido fosfotúngstico e o Scetato de uranila foram obtidos da Sigma-aldrich, São Paulo, Brasil. O Dimetilsulfóxido (DMSO) foi obtido da Carlo Erba (Brasil), o tolueno da J.T. Baker (Edo de México, México), o etanol e o metanol da Merck (Darmstadt, Germany).

5.2.2 Preparo dos sistemas de nanoemulsão

No presente estudo foram preparados quatro sistemas de nanoemulsão (NE): NE-AICIFt, NE-PM15%, NE-AICIFt-PM15%, veículo para serem avaliados como possíveis fármacos a serem utilizados na Terapia Fotodinâmica.

O sistema de NE-AICIFt óleo/água foi desenvolvido pelo método de emulsificação espontânea pelo professor Luís Muehlmann da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília (MUELMANN *et alli*, 2015). Em resumo, 9 g de Cremophor ELP (75%) e 3 g de óleo de rícino (25%) (SOMix) foram misturados durante 20 minutos sob agitação magnética (300rpm) a 50 °C. Posteriormente, logo após a homogeneização total dos componentes, 3.2 mL de AICIFt (1.7mM) em etanol foram adicionados ao SOMix; esta solução foi mantida sob agitação branda a temperatura ambiente. Depois durante cinco minutos de agitação, o etanol presente foi eliminado da SOMix por agitação magnética suave a 100 °C durante 15 minutos. Ao final, a concentração de AICIFt na SOMix foi de 444 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$. Posteriormente, 70 mL de tampão

fosfato salino, PBS (pH 7.2) foram adicionados à solução anterior sob baixa agitação magnética, à temperatura ambiente, o que resultou na auto emulsificação espontânea e, por tanto, no sistema de NE-AICIFt. A agitação foi mantida durante 15 minutos quando macroscopicamente o sistema se apresentou homogêneo.

Além do sistema de NE-AICIFt, foi preparada também uma NE de PM 15%, para qual 1.5 g de PM foi dissolvida na fase aquosa por agitação ligeira e imediatamente misturada com a fase oleosa utilizando os mesmos componentes do veículo da NE-AICIFt descrito acima.

Posteriormente, foi preparada a NE combinada de AICIFt e PM 15% (AICIFt-PM15%), para o qual foi dissolvido 1.5 g de PM em 10mL do sistema de NE-AICIFt, adicionando-se NaOHaq 1N até dissolução completa do sistema por agitação constante. O pH final foi 7.5 e o volume final foi ajustado a 10 mL com a NE-AICIFt.

5.2.3 Determinação da concentração de Alumínio-Cloro Ftalocianina e Paramomicina nos nanossistemas

A concentração de AICIFt no sistema NE (NE- AICIFt) foi determinada espectrofluorometricamente (Perkin Elmer) tendo em conta uma curva padrão (50-0.19 μ M) utilizando DMSO (Carlo Erba), etanol (Carlo Erba) ou PBS/SDS2% (J.T. Baker, Edo de México, México) como diluentes e um comprimento de onda de excitação de 670nm e emissão 682 nm. A concentração de PM no sistema NE (NE-PM) foi medida por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, como descrito por Lu e colaboradores em 1997.

5.2.4 Caracterização coloidal dos sistemas de nanoemulsão

Os sistemas de NE foram caracterizados imediatamente após a preparação, exceto a NE-AICIFt, que foi caracterizado dez meses após a sua preparação. A caracterização envolveu a determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão das nanogotículas por meio do espalhamento de luz dinâmica. A caracterização envolveu também a determinação do potencial zeta, por mobilidade eletroforética utilizando-se para todas estas determinações o aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Antes de cada medição os sistemas eram diluídos em água MilliQ e PBS (1:50). As amostras tiveram as variáveis aferidas três vezes.

5.2.5 Caracterização físico-química dos sistemas de nanoemulsão

Os espectros de emissão de fluorescência e absorção de luz na região visível do espectro eletromagnético (500 -750nm) foram determinados usando-se o espectrofluorímetro (Perkin Elmer). Para este teste, os sistemas de NE foram diluídos 1:100 com concentração final de 0.4 μ M de AICIFt.

Adicionalmente, o pH de cada sistema de NE foi determinado utilizando-se uma tira indicadora de pH (Merck, Darmstadt, Germany, 0-14), a qual foi mergulhada em cada sistema de NE obtendo uma mudança de cor como indicador do pH da solução.

5.2.6 Caracterização morfológica dos sistemas de nanoemulsão

A caracterização morfológica dos sistemas NE foi realizada em microscopia de eletrônica de transmissão. Inicialmente diluiu-se os sistemas (100 μ L NE + 400 μ L PBS), logo, 2 μ L da solução anterior foi adicionada sob o

FORMVAR durante dois minutos, o excesso da amostra foi tirado com papel filtro sem deixar secar por completo, posteriormente, 2 μ L de ácido fosfotúngstico (2%) ou acetato de uranila (3%) foi adicionado à amostra.

5.2.7 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio

A capacidade da AICIFt quando contida no sistema NE (NE- AICIFt) em gerar espécies reativas de oxigênio foi determinada por espectrofotometria (Thermo scientific, multiskan GO) por meio do ensaio indireto de decaimento do composto Benzofurano (DPBF), que avaliado no comprimento de onda de 410nm é proporcional à quantidade de espécies reativas de oxigênio produzidas. Desse modo, uma diluição de 1:15 (187 μ L de água milliQ e 13 μ L das NE) foi preparada de cada um dos sistemas de NE, 3 μ L de uma solução de DPBF (1,5mg/mL em etanol) foram adicionados a cada poço. A absorbância foi medida no pico máximo de absorção do DPBF (410nm) antes e depois da irradiação com luz fluorescente (5 Joule/cm²). O tempo total de irradiação foi de quatro minutos, sendo que a absorbância foi medida a cada 20 segundos. Cada medição foi realizada em duplicata.

5.2.8 Determinação da estabilidade dos sistemas de nanoemulsão

A estabilidade dos sistemas de NE foi avaliada a cada mês durante quatro meses após da preparação de cada sistema de NE os quais foram mantidos em temperatura de 4°C. No caso do sistema de NE AICIFt a avaliação foi realizada depois de 11 meses da preparação. A determinação da estabilidade dos diferentes sistemas de NE teve como base a medição do

diâmetro hidrodinâmico, do índice de polidispersão, do potencial zeta, do pH e a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Preparação dos sistemas de nanoemulsão

Os quatro sistemas de NE óleo/água preparados estão apresentados na Tabela 1. Vale destacar que ao final da preparação os nanossistemas ficaram translúcidos e transparentes. A concentração dos dois fármacos era menor quando eles estavam combinados no mesmo sistema. No sistema NE-PM a concentração de PM foi 154.5 nM, enquanto que no sistema NE-AICIFt-PM foi igual 148.8 nM. Com relação à concentração de AICIFt, no sistema NE-AICIFt foi igual a 39.38 µM e no sistema NE-AICIFt /PM15% foi igual 34.60 µM.

Tabela 1. Concentração de Paromomicina e de Alumínio-Cloro Ftalocianina AICIFt presente nos sistemas de nanoemulsão. Os sistemas foram dissolvidos 1:1000 em PBS antes da quantificação. Os resultados são a média ± desvio padrão de três medições.

Sistema de nanoemulsão	Concentração		
	PM (%) Teórica	PM (nM) Calculada	AICIFt (µM)
NE	-	-	-
NE-PM	15	154.59 ± 10008.9	-
NE-AICIFt	-	-	39.38±0.5
NE-AICIFt-PM	15	148.85 ± 6693.8	34.60±0.7

5.3.1 Caracterização dos sistemas de nanoemulsão

Os quatro sistemas de nanoemulsão foram caracterizados coloidal e fisicoquimicamente uma semana após a preparação, sendo que o sistema NE-AICIFt foi avaliado dez meses após a preparação.

Preparação e caracterização dos sistemas de nanoemulsão

Com relação à caracterização coloidal considerou-se o diâmetro hidrodinâmico (DH) das nanogotículas, o índice de polidispersão (IPD) e o potencial zeta. Os resultados estão expressos a Tabela 2.

Nessa Tabela observa-se que os diferentes sistemas de NE quando analisados uma semana após a preparação apresentaram em geral diâmetro hidrodinâmico <30 nm; quando foram diluídos em água, o DH médio variou de $24,75 \pm 0,08$ a $28,98 \pm 0,25$ nm, sendo maior o do sistema NE-PM e menor o do veículo, já quando diluídos em PBS o DH médio variou de $25,33 \pm 0,39$ a $29,84 \pm 1,30$ nm, sendo maior o do sistema NE-AICIFt-PM e menor o da nanoemulsão (NE).

O IPD médio não foi afetado pelo diluente e variou de $0,08 \pm 0,004$ - $0,22 \pm 0,01$ quando diluídos em água, sendo maior o apresentado pelo sistema NE-AICIFt e quando diluídos em PBS variou de $0,076 \pm 0,001$ a $0,245 \pm 0,01$, sendo maior o apresentado pelo sistema NE-PM.

O sistema NE-PM e a nanoemulsão (NE) mostram potencial zeta ligeiramente negativo quando diluídos tanto em água quanto em PBS. Já o sistema NE-AICIFt-PM mostrou potencial zeta perto de zero quando foi diluído em água e em PBS.

O sistema NE-AICIFt após dez meses teve o seu DH médio, o IPD e o potencial zeta diminuídos, mostrando-se, respectivamente igual a $26,05 \pm 0,31$ nm, $0,07 \pm 0,01$ e $-2,94$ mV.

Um mês após a sua preparação a maioria dos sistemas NE apresentou pH 7. Somente o sistema de NE-AICIFt-PM mostrou pH 8, provavelmente devido à presença de número maior de íons hidroxilo (OH⁻) que foram agregados no

Preparação e caracterização dos sistemas de nanoemulsão

momento de sua preparação com a adição de NaOH 1N permitindo a dissolução do sistema.

Preparação e caracterização dos sistemas de nanoemulsão

Tabela 2. Caracterização coloidal dos sistemas de nanoemulsão contendo Paromomicina e ou Alumínio-Cloro Ftalocianina. Os sistemas foram dissolvidos 1:100 utilizando PBS e água como diluentes. Os resultados são a média \pm desvio padrão de três medições consecutivas.

Sistema de Nanoemulsão (NE)	ÁGUA				PBS			
	DH* (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)	DH* (nm)	IPD	Potencial zeta (mV)		
NE	24.75 \pm 0.08	0.08 \pm 0.004	-2,77	25.33 \pm 0.39	0.084 \pm 0.003	-4,89		
NE-PM 15%	28.98 \pm 0.25	0.22 \pm 0.01	-5,46	29.67 \pm 0.39	0.245 \pm 0.01	-3,62		
NE-AICIFt-PM 15%	28.26 \pm 0.16	0.51 \pm 0.003	0.161	29.84 \pm 1.30	0.188 \pm 0.006	-0,64		
Após 10 Meses								
NE-AICIFt	26.05 \pm 0.31	0.07 \pm 0.01	-2,94	27.17 \pm 0.28	0.139 \pm 0.04	-7,25		

*DH: diâmetro hidrodinâmico; IPD: Índice de polidispersidade; PM: Paromomicina; AICIFt: Alumínio-Cloro Ftalocianina

As nanogotículas presentes nos sistemas de NE foram visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 4 mostra nanogotículas da NE-AICIFt quando se utilizou ácido fosfotúngstico como corante de contraste negativo. Tamanhos de nanogotículas <50 nm foram observados. Quanto às NE-AICIFt-PM e NE-PM15% não foram visualizadas devido à precipitação das mesmas, possivelmente devido à PM, agregados de cor branca se observaram quando foram adicionados os corantes de contraste: ácido fosfotúngstico 2% o acetato de uranila 3%.

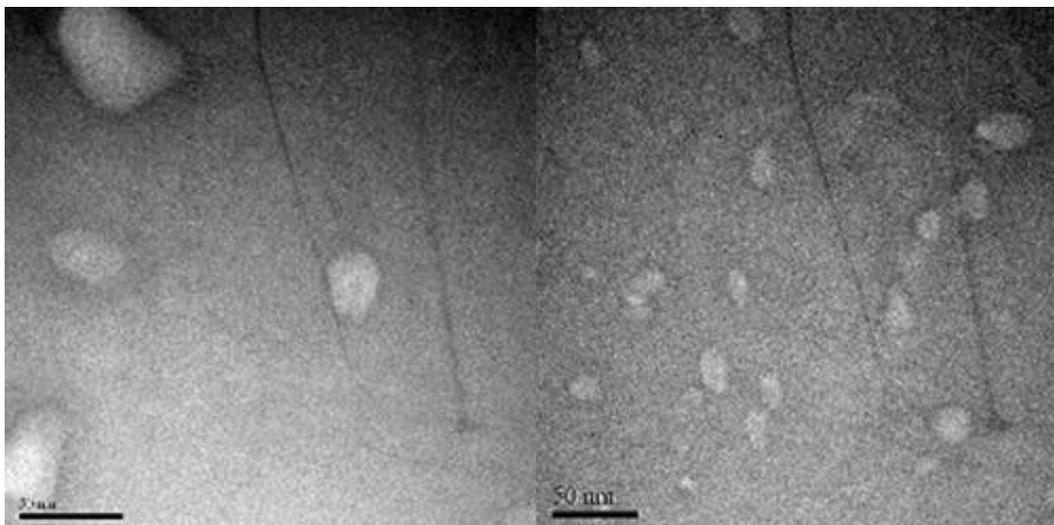


Figura 4. Morfologia de nanogotículas presentes nos sistemas NE-AICIFt obtidas em microscópio de eletrônico de transmissão. Nanogotículas de tamanho menor 50nm, não é observado coalescência e floculação.

O perfil espectral de absorção de luz e emissão de fluorescência da AICIFt livre (dissolvida em DMSO) e da presente no sistema de NE, combinada com PM15% (NE-AICIFt-PM15%) ou não (NE-AICIFt) estão ilustrados, respectivamente, nas figuras 5 e 6.

O espectro de absorção da AICIFt mostrou bandas Q com pico máximo de absorção para a AICIFt livre em um comprimento de onda de 675 nm, a AICIFt incorporada no sistema NE-AICIFt-PM15% ou no NE-AICIFt mostrou a mesma banda Q e um mesmo pico máximo de absorção de 673 nm, Figura 5.

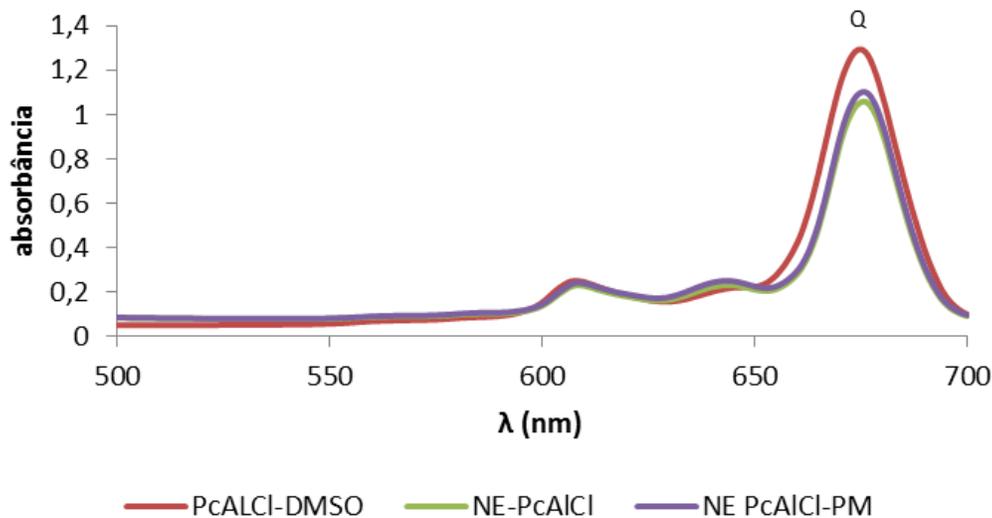


Figura 5 Espectros de absorção dos sistemas NE-AICIFt, NE-AICIFt-PM15% AICIFt – DMSO. Os sistemas dissolvidos em PBS e AICIFt livre em DMSO (1:100, 0.4 uM de AICIFt.). nm: nanômetros.

A análise da Figura 6 mostra que a AICIFt livre ou incorporada nos sistemas de NE (NE-AICIFt-PM15% e NE-AICIFt) emite luz fluorescente com pico máximo em um comprimento de onda de 681 nm quando ela foi excitada em 350 nm.

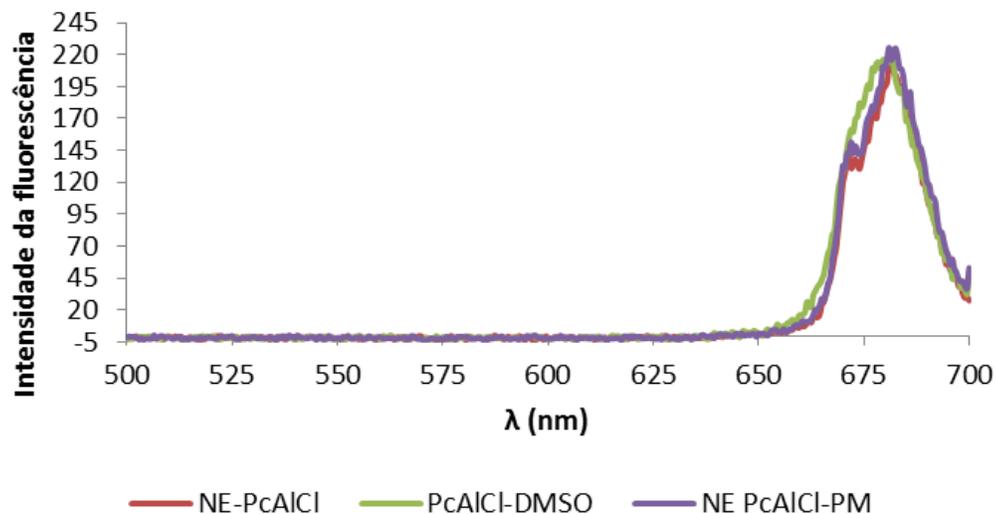


Figura 6 Espectros de emissão da fluorescência dos sistemas de NE-AICIFt, NE-AICIFt-PM15% e AICIFt -DMSO quando excitadas em 350nm, os sistemas foram dissolvidos em PBS e a AICIFt livre em DMSO (1:100, 0.4 μ M de AICIFt). nm: nanômetros.

Como citado no item 5.2.7, a capacidade da AICIFt contida no sistema NE em gerar espécies reativas de oxigênio também foi determinada neste estudo. Para tal, utilizou-se o método do decaimento da absorbância do composto Benzofurano proporcional a espécies reativas de oxigênio geradas em função do tempo de irradiação (total de 240 segundos, Figura 7).

Nessa figura observa-se que os sistemas de NE com AICIFt foram capazes de gerar oxigênio singleto, 60-80% de decaimento da absorbância do tempo zero (sem irradiação), 240 segundos após da irradiação. Os sistemas de NE que só contêm PM e o veículo não geraram espécies reativas de oxigênio.

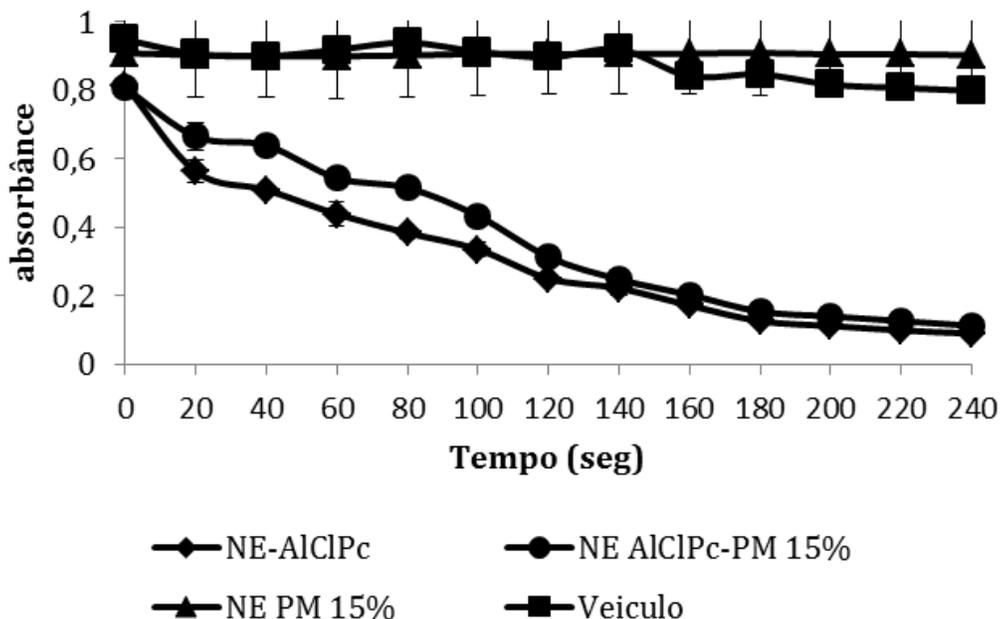


Figura 7. Geração de espécies reativas de oxigênio dos sistemas de NE. Os dados correspondem à média e ao desvio padrão de duas medições independentes em comprimento de onda de 410 nm.

Uma vez caracterizados os diferentes sistemas de NE, realizaram-se experimentos que determinassem a estabilidade de todos eles. Os resultados estão apresentados na Figura 8 e nas tabelas 3 e 4.

Em geral, todos os sistemas de NE mostraram diâmetro hidrodinâmico das nanogotículas entre 23.96 e 29.84 nm durante os quatro meses de avaliação da estabilidade, com variações baixas de 1–2 unidades. Quanto ao IPD, os sistemas de NE mostraram-se estáveis e monodispersos com valores inferiores a 0.24. Adicionalmente, não se detectou diferenças significativas ($p > 0.05$) relacionadas ao uso de diferentes diluentes (água milli Q ou PBS) para estes parâmetros.

Por outro lado, como mencionado anteriormente, os sistemas de NE mostraram potencial zeta negativo logo depois da síntese, este potencial mostrou variações nos sistemas de NE de 1-2 unidades durante os quatro

meses de avaliação de sua estabilidade. Na Tabela 3 e 4 os valores de potencial zeta são mostrados quando os sistemas foram dissolvidos nos diferentes diluentes.

Adicionalmente, para estabelecer a estabilidade dos sistemas de NE realizou-se a medição do pH. Todos os sistemas mostraram o valor de pH igual a 7, exceto o sistema de NE combinado (AICIFt -PM15%) cujo pH foi igual a 8.

A estabilidade dos sistemas de NE também foi avaliada considerando-se a sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio após quatro meses da preparação. Os dados estão expressos Figura 9. Nela pode-se observar redução da absorção do Benzofurano relacionada com a geração de oxigênio para os sistemas de NE - AICIFt e combinado (AICIFt -PM15%) após dos 4 meses da preparação.

De igual forma, a concentração de AICIFt e PM presente nos sistemas de NE foi determinada como mostra a Tabela 5, a concentração de AICIFt foi constante, sem diferenças significativas ($p>0.05$) comparada à concentração inicial, a concentração de PM, mostrou variações estatisticamente significativas ($p<0.05$)

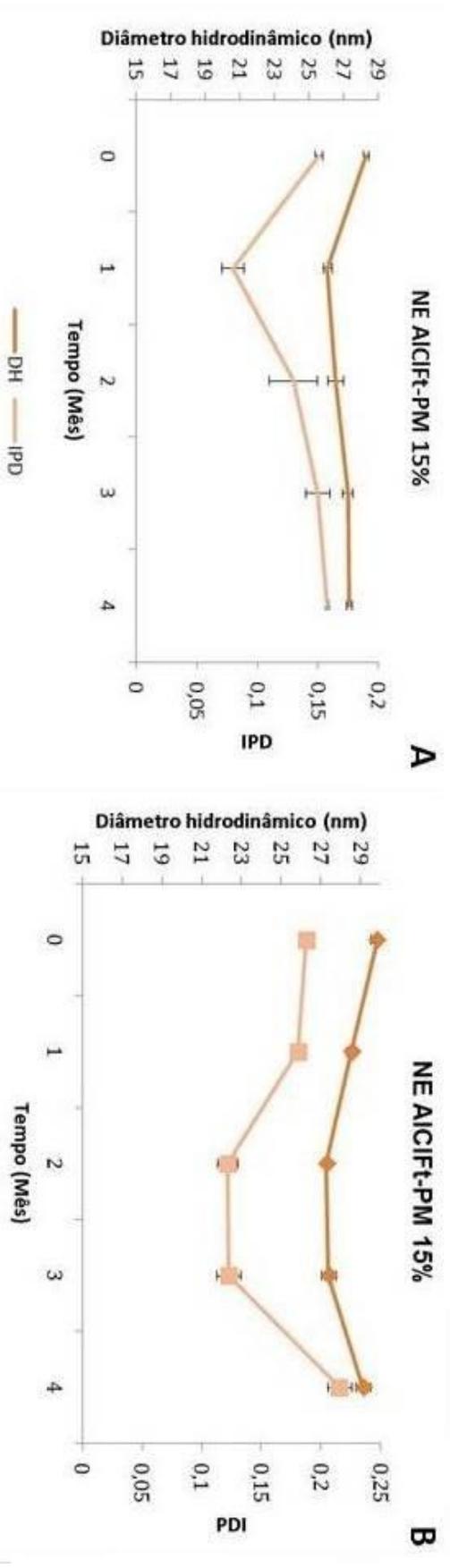


Figura 8. Estabilidade coloidal do sistema de nanoemulsão AICIFt-PM15%. Realizada cada mês e durante quatro meses após da preparação. A: Água como diluente; B: PBS como diluente. Os resultados são a média com desvio padrão de três medições consecutivas.

Tabela 3. Estabilidade dos sistemas de NE em termos de caracterização físico-química utilizando a água como diluente. Os resultados são a média \pm desvio padrão de três medições consecutivas.

AGUA	Mês 1			Mês 2			Mês 3			Mês 4		
	DH	IPD	Pz	DH	IPD	Pz	DH	IPD	Pz	DH	IPD	Pz
PM 15%	26,21 \pm 0,11	0,14 \pm 0,005	-6,03	27,44 \pm 0,13	0,17 \pm 0,01	-4,27	27,67 \pm 0,53	0,195 \pm 0,008	-5,1	26,75 \pm 0,32	0,138 \pm 0,01	-4,68
PcPM 15%	26,07 \pm 0,24	0,08 \pm 0,009	-1,96	26,54 \pm 0,46	0,13 \pm 0,02	-1,31	27,25 \pm 0,31	0,15 \pm 0,01	-0,38	27,34 \pm 0,15	0,158 \pm 0,001	-4,31
Veiculo	24,47 \pm 0,37	0,04 \pm 0,07	-5,9	24,43 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	-2,49	24,69 \pm 0,19	0,06 \pm 0,001	-4,4	24,40 \pm 0,14	0,108 \pm 0,009	-4,62
	11 meses			12 meses			13 meses			14 meses		
AIcPc	25,79 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	-3,73	26,03 \pm 0,33	0,10 \pm 0,03	-3,1	25,84 \pm 0,14	0,10 \pm 0,001	-3,71	26,11 \pm 0,33	0,091 \pm 0,008	-5,96

SNE: sistema de NE, NE AIcPc-PM; DH: diâmetro hidrodinâmico, IPD: Índice de polidispersão, Pz: potencial zeta

Tabela 4. Estabilidade dos sistemas de NE em termos de caracterização físico-química utilizando o PBS como diluente. Os resultados são a média \pm desvio padrão de três medições consecutivas.

PBS	Mês 1			Mês 2			Mês 3			Mês 4		
	DH	IPD	Pz									
PM 15%	26,72 \pm 0,13	0,132 \pm 0,001	-4,15	28,01 \pm 0,30	0,186 \pm 0,004	-1,27	28,79 \pm 0,26	0,217 \pm 0,001	-3,08	27,27 \pm 0,02	0,153 \pm 0,01	-3,98
PcPM 15%	28,57 \pm 0,27	0,181 \pm 0,001	-4,94	27,29 \pm 0,21	0,122 \pm 0,008	-0,50	27,39 \pm 0,37	0,123 \pm 0,01	-2,22	29,15 \pm 0,36	0,216 \pm 0,01	-1,81
Veiculo	25,26 \pm 0,29	0,07 \pm 0,02	-3,6	25,06 \pm 0,15	0,07 \pm 0,01	-2,03	26,69 \pm 0,12	0,075 \pm 0,01	-2,69	25,21 \pm 0,22	0,073 \pm 0,006	-3,83
	11 meses			12 meses			13 meses			14 meses		
AIcPc	26,63 \pm 0,25	0,084 \pm 0,01	-5,31	26,62 \pm 0,15	0,07 \pm 0,01	-6,06	26,59 \pm 0,17	0,106 \pm 0,01	-2,41	27,12 \pm 0,65	0,109 \pm 0,01	-4,36

SNE: sistema de NE, PcPM: NE AIcPc-PM; DH: diâmetro hidrodinâmico, IPD: Índice de polidispersão, Pz: potencial zeta

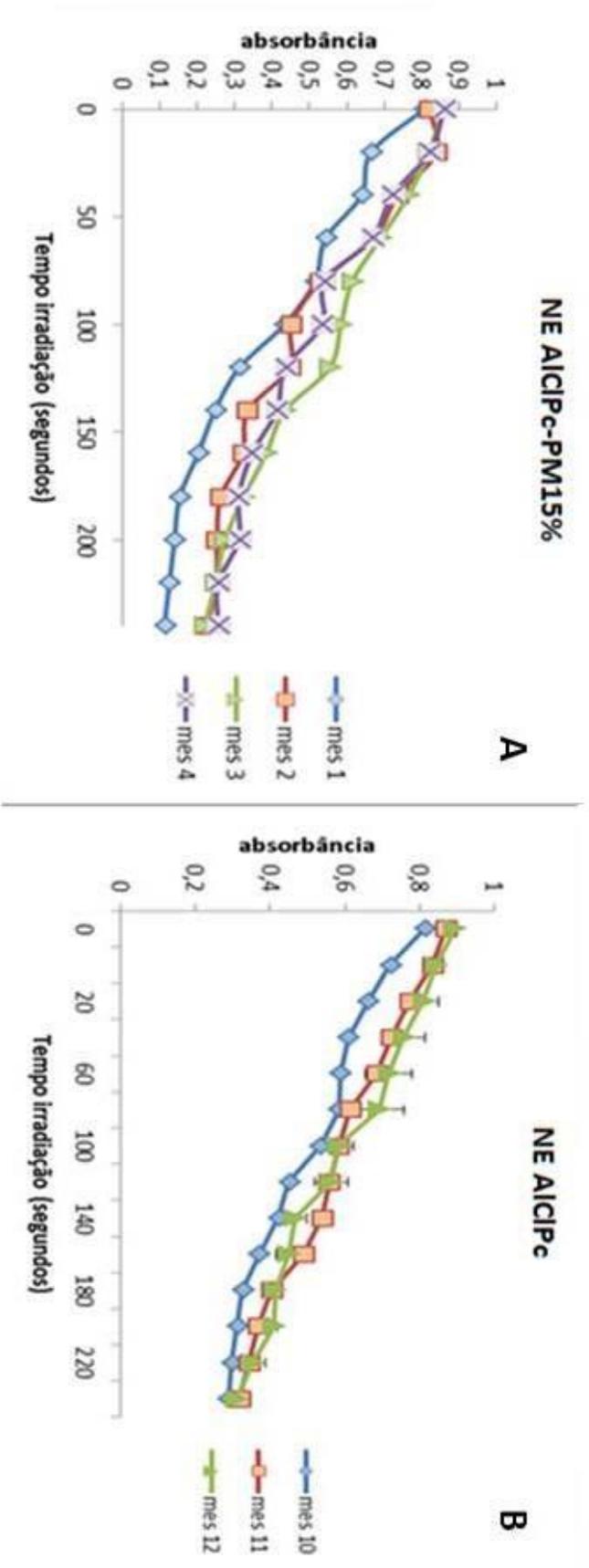


Figura 9. Estabilidade do sistema de NE de AICIFt e combinado considerando a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. (a): NE-AICIFt -PM 15% estabilidade durante 4 meses; (b): NE-AICIFt estabilidade até 12 meses após da preparação.

Preparação e caracterização dos sistemas de nanoemulsão

Tabela 5. Concentração de Alumínio-Cloro Ftalocianina e Paromomicina e ou presente nos sistemas de nanoemulsão. Os sistemas foram dissolvidos 1:10 em PBS antes de cada medição.

Sistema de nanoemulsão	AICIFt (μM)		PM (nm)	
	1º mês	4º mês	1º mês	4º mês
Nanoemulsão	-	-	-	-
AICIFt	39.38 \pm 0.5	39.2 \pm 0.26	-	-
PM 15%	-	-	154.59 \pm 10008.9	145.19 \pm 5750.3
-AICIFt-PM 15%	34.60 \pm 0.7	34.84 \pm 1.2	148.85 \pm 6693.8	148.55 \pm 8968.6

5.4 DISCUSSÃO

Tendo em conta a atividade leishmanicida *in vitro*, *in vivo* e/ou em ensaios clínicos da AICIFt e da PM, assim como os inconvenientes de cada um dos compostos quando aplicados em alvos terapêuticos, os hospedeiros mamíferos, foi pensado o desenvolvimento de um nanossistema que permitiria o transporte destes dois compostos de diferente solubilidade para serem testados em modelo *in vitro* e, posteriormente, em modelos *in vivo* da LTA causada por *L. braziliensis*.

Como foi descrito anteriormente, um dos grandes problemas da PM é a efetividade variável devido a pouca ou baixa permeabilidade da mesma. Embora várias estratégias tenham sido usadas para traspasar esta barreira, ainda não se conseguiu uma estratégia que possibilitasse a eliminação completa do parasito e assim ter-se um tratamento adequado (HEIDARI-KHARAJI *et alli*, 2016, 2015; JAMIL *et alli*, 2015). De igual maneira, embora, o uso da AICIFt contra a leishmaniose tenha se concentrado, principalmente, em estudos *in vitro* com excelentes resultados, em estudos *in vivo* a AICIFt mostrou que deve ser encapsulada em sistemas de entrega de fármacos para evitar a sua agregação em fluidos biológicos já que a AICIFt tem tendência à agregação em meio aquoso o qual limita sua aplicação clínica (HERNÁNDEZ *et alli*, 2012; MUEHLMANN *et alli*, 2015). Por isso, como citado anteriormente, nesta tese desenvolveu-se um nanossistema transportador da AICIFt e PM, tendo em conta o quadro clínico da Leishmaniose Tegumentar Americana. Lembrando que apesar de a lesão ocorrer no local da picada do vetor e curar-se espontaneamente, já foi relatado que ela pode voltar, provavelmente, devido à presença de parasitos latentes em células do sistema mononuclear fagocitário ou em linfonodos ou ainda, no caso de infecções

por *L. braziliensis*, devido à disseminação dos parasitos para as mucosas (MSB 2007; WHO 2014). Diante disso, pensou-se nas nanoemulsões como veículo transportador dos fármacos AICIFt e PM, tendo em conta também que as suas propriedades, tais como a estabilidade cinética contra a agregação, a floculação e a coalescência serem ideais para o transporte de fármacos de uso tópico, além do fato de serem facilmente absorvidas pela pele (ANTON & VANDAMME, 2011; MCCLEMENTS, 2012). Adicionalmente, pensou-se em um efeito transdérmico onde a AICIFt, mediando a Terapia Fotodinâmica, pudesse exercer um efeito local sobre a lesão e o parasito e a PM pudesse permear e exercer sua ação sistêmica, e desta forma mostrarem-se mais efetivas na eliminação dos parasitos.

Nesse sentido, e considerando os resultados dos estudos realizados com este FS no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, foi decidido elaborar a partir de um sistema de nanoemulsão de AICIFt preparado pelo professor Luís Muehlmann, um nanossistema capaz de “melhorar a atividade fotodinâmica da AICIFt” (MUEHLMANN L *et alli*, 2015). Assim, mediante modificação na preparação da mesma, foi realizada a combinação dos dois compostos com diferente solubilidade em um mesmo nanossistema O/A: nesse sistema a AICIFt lipofílica encontra-se na fase oleosa nas nanogotículas e está dispersa na fase aquosa onde encontra-se presente a PM hidrofílica.

Os sistemas de nanoemulsão desenvolvidos neste estudo mostraram ter nanogotículas de tamanhos pequenos ($DH < 30\text{nm}$), monodispersas e homogêneas ($IPD < 0.2$) e apresentaram potencial zeta negativo perto de zero. Estas características coloidais mostram que os sistemas produzidos neste estudo

podem permanecer cineticamente estáveis ao longo do tempo (meses ou anos) como o mencionado por McClements (2012), além de influenciar na liberação e na biodistribuição do fármaco (Li & Huang, 2008; MC CLEMENTS, 2012) como será discutido mais à frente.

Outros sistemas de nanoemulsão com este fotossensibilizante (AICIFt) tem sido sintetizados, como o reportado por Rodrigues e colaboradores (2012), utilizando o mesmo método de emulsificação espontânea desenvolvido neste estudo, mas com uma fase orgânica composta por Epikuron® 170 e Span 80, e uma fase aquosa de Poloxamer 188 (45 μ M) previamente dissolvido em Migliol 812N). Esses sistemas mostraram características coloidais diferentes dos sistemas deste estudo, como tamanhos das nanogotículas maiores (DH 192.27 nm), monodispersidade e cargas de superfície mais negativas (potencial zeta de -37.28 mV), sendo que ao longo de 12 semanas não mostram alteração nas suas características coloidais, ou seja, mostraram ser estáveis. Além disso, apesar do tamanho das nanogotículas (190nm) ser maior que os dos poros da célula alvo (4-30nm), o sistema foi capaz de internalizar e ser efetivo contra as células melanizadas de *Cryptococcus neoformans* (RODRÍGUES *et alli*, 2012). De outra forma, Takegami e colaboradores (2010) relataram a preparação de um sistema de nanoemulsão de AICIFt composto por uma mistura de óleo de soja, fosfatidilcolina e palmitato de sódio por meio do método de alta energia por sonicação.

Com relação ao sistema de NE- AICIFt base preparado por Muehlmann e colaboradores (ver materiais e métodos), os autores reportaram as condições de 75% de surfactante, 25% de óleo, razão surfactante/óleo (SOR): 0.75 e 444

$\mu\text{mol.kg}^{-1}$ de AICIFt como as melhores para obter um sistema de transporte ideal para esse fotossensibilizador (*Muehlmann et alli*, 2015). Além disso, os autores relataram que o nanossistema NE- AICIFt por eles desenvolvido, tanto em PBS quanto em meio de cultura, apresenta DH entre 25-26 nm, IPD <0.13 e potencial zeta ente -2.95 a -6.24mV. Neste estudo, mostrou-se reprodutibilidade dos resultados obtidos relacionados à caraterização coloidal e estabilidade do mesmo nanossistema por tempo maior do que 12 meses (ver Tabela 4).

Outro tipo de formulação de AICIFt como as vesículas de lipídeos compostas por 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2- dioleoil-sn-glicero-3-fosfocoline (DOPC) em diferentes proporções e colesterol reportadas por Calori e Tedesco mostraram DH entre 91.3 e 111.2 nm, IPD <0.18 e potencial zeta entre -9 e -21, com estas caraterísticas esses sistemas de vesículas foram estáveis só por 50 dias, nesse tempo ocorria precipitação da AICIFt provavelmente em função da quantidade do FS que foi liberado no meio aquoso; o sistema com valores de potencial zeta mais negativos (-21mV), DH menor (91.3 nm) e proporções menores de DSPC e maiores de DOPC demonstrou ser o mais estável. Os autores observaram que em sistemas biológicos de carcinoma oral de células escamosas, estes vesículas lipídicas carregadas com AICIFt são internalizadas pelas células apesar de o FS ter precipitado, fenômeno que parece ser reversível, uma vez que o sistema se encontrava em células de mamífero (CALORI & TEDESCO, 2016).

Adicionalmente, lipossomas ultra deformáveis de AICIFt (72.7 nmol/mL) compostos por uma mistura de solventes orgânicos $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{DMSO}$ (1:1:0.06, v/v) foram sintetizados e caracterizados mostrando DH de 109 nm

maiores do que nossa NE, IPD 0.15 e potencial zeta de -12.0 ± 1.21 mV, estes lipossomas foram ativos *in vitro* contra *L. chagasi* e *L. panamensis*, no entanto, mostraram ser mais tóxicos em macrófagos THP-1 do que o FS livre (HERNÁNDEZ *et alli*, 2012).

Com relação à nanoformulações de PM, Jaafari e colaboradores (2009) relataram a preparação de PM lipossomal PM (10 e 20%). De acordo com os autores a PM lipossomal por eles desenvolvida possui DH médio >100 nm e vesículas com polidispersidade variável (IPD 0.47-0.63), mesmo assim quando avaliadas em modelos *in vivo* de *L. major*, essas nanoformulações diminuíram a carga parasitaria mais do que a PM livre. Além de PM lipossomal, a literatura também relata a síntese de nanopartículas sólidas de lipídeos contendo PM (NP-PM). Essas NP-PM quando preparadas com diferentes concentrações de PM (12.5 e 15%) mostraram diferenças quanto às propriedades coloidais, o que influenciou na sua atividade contra espécies de Leishmania causadoras da Leishmaniose cutânea no Velho Mundo, além de serem tóxicas para células THP-1. Entretanto, quando apresentaram DH menores (120 e 240nm) essas NP-PM foram mais ativas contra *L. major* e *L. tropica*, independentemente da concentração de PM. Elas eram heterogêneas com IPD >0.57 , potencial zeta >507 mV (HEIDARI-KHARAJI *et alli*, 2015). Adicionalmente, Brugués e colaboradores (2015) reportaram um nanogel micelar de PM com DH de 9.9 nm, IPD 0.35 e potencial zeta de -0.49; sendo que o nanogel mostrou variabilidade das características coloidais dependente da temperatura, além do fato do pH ser ácido, entre 5.8 e 6.2. Estas propriedades permitiram a permeação e difusão da PM na pele de camundongos e orelha de porco, assim como em membranas sintéticas,

respetivamente. Esses dados citados mostram que as propriedades coloidais dos nanossistemas influenciam os efeitos biológicos, isso porque os nanossistemas devem interagir com o sistema reticulo endotelial e não só com a célula alvo no processo de internalização (HONARY & ZAHIR, 2013; ERNSTING *et alli*, 2013).

O potencial zeta descrito como potencial electrocinético em sistemas coloidais permite caracterizar a superfície desses sistemas carreadores e tem sido relacionado com a fagocitose de nanoveículos na circulação e internalização celular; partículas carregadas negativamente ($\leq 10\text{mV}$) são internalizadas mais rapidamente por células do sistema mononuclear fagocitário, possivelmente devido a forma de ligação com sítios catiônicos na forma de clusters, enquanto que partículas carregadas positivamente $>10\text{mV}$ induzem agregação de proteínas no soro, assim mesmo, nanopartículas neutras apresentam menor interação com o sistema mononuclear fagocitário e permanecem maior tempo na circulação (LI & HUANG, 2012; HONARY & ZAHIR 2013; ERNSTING *et alli*, 2013).

O aumento do DH dos sistemas de NE observado quando foram adicionados a AICIFt e a PM ocorreu, possivelmente, devido à incorporação da AICIFt nos nanossistemas e ao fato de a PM provavelmente ter sido adsorvida na superfície do nanomaterial (ver Tabela 2).

Adicionalmente, neste estudo realizou-se a caracterização morfológica dos sistemas de NE por microscopia eletrônica de transmissão. Para tal foram utilizados diferentes protocolos e corantes de contraste a fim de se obter a melhor morfologia, no entanto, observou-se que aqueles NE que contêm PM precipitaram, adquirindo macroscopicamente a cor branca e a preta microscopicamente, por isso, os nanossistemas NE- AICIFt - PM15% e NE-PM15% não foram

caracterizadas por este método. O nanossistema NE-AICIFt e o veículo (NE) mostram tamanho $<50\text{nm}$, as nanovesículas mostraram formas heterogêneas mais ou menos circulares (Figura 3), não foi observado agregação do nanossistema. Estes resultados permitem comparar os obtidos por espalhamento da luz dinâmica, onde os valores de DH foram $<30\text{ nm}$. É importante notar que a diferença nos diâmetros médios de nanopartículas por estas duas técnicas está no fato de que o espalhamento de luz dinâmico não mede o tamanho físico das partículas, dado que esta medição é feita dependente das interações das partículas e a camada de solvatação, camada ao redor da nanogotícula e que impede o contato direto entre as nanogotículas (CUADROS *et alli*, 2014). Essa camada é formada pelas cargas do meio de dispersão criando-se uma atmosfera difusa de íons a volta da partícula coloidal, o que dá origem a criação de uma dupla camada elétrica (LELE *et alli*, 2002). Esta dupla camada elétrica é que "protege" as partículas coloidais quando estas se chocam, as atmosferas das partículas coloidais têm carga do mesmo sinal e conseqüentemente se repelem, funcionando como barreiras físicas que evitam a aglutinação das partículas coloidais. A microscopia eletrônica mede o tamanho físico das nanogotículas secas, apesar de ela permitir uma medição mais direta, a preparação das amostras pode influenciar nas propriedades das nanopartículas gerando agregação das mesmas. Na maioria das vezes, o tamanho obtido por microscopia eletrônica é menor que por espalhamento de luz dinâmico (CUADROS *et alli*, 2014).

Por outro lado, os sistemas de NE que contêm AICIFt foram capazes de gerar espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido por mais de um ano

após a sua preparação. Este estresse oxidativo gerado logo depois da terapia fotodinâmica é de grande importância dado que a partir deste ânion superóxido se originam as outras espécies reativas de oxigênio que levam a células a morte. Lembrando que em sistemas biológicos estresse oxidativo está relacionado a ativação de células fagocíticas como macrófagos, estes conhecidos por serem as células alvos da *Leishmania spp*, o que corrobora o fato de que os FS são excelentes candidatos para atuar sobre este parasito intracelular como tem sido reportado na literatura (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001; AKILOV *et alli*, 2006;).

Com base no exposto pode-se concluir que os sistemas de nanoemulsão preparados neste estudo devido as suas características coloidais, físico-químicas e pela estabilidade apresentada podem constituir sistemas ideais para o transporte da AICIFt e PM para ser testados no modelo *in vitro* e *in vivo* da Leishmaniose Tegumentar Americana.

6.1 INTRODUÇÃO

Embora a eficácia da TFD como tratamento contra a leishmaniose cutânea venha sendo avaliada há vários anos utilizando FS como o ácido delta-aminolevulínico, ftalocianinas, porfirinas e fenotiazinas (DUTTA *et alli*, 2005; ESCOBAR *et alli*, 2006; AKILOV *et alli*, 2007; MATEUS *et alli*, 2014) contra diferentes espécies de leishmania, a eficácia do FS AICIFt associado a uma droga leishmanicida convencional na TFD nunca foi avaliada contra parasitos da espécie *L. braziliensis*.

Na realidade, não é conhecido o efeito combinado de nenhum FS com a PM sobre leishmanias, por isso neste estudo, como descrito no capítulo 5, desenvolveu-se e caracterizou-se um sistema de nanoemulsão contendo o FS AICIFt e a droga leishmanicida PM (NE-AICIFt-PM) para ser utilizado na TFD.

Como o nanossistema NE-AICIFt-PM mostrou ser estável coloidal e fisicoquimicamente, além de não perder a capacidade de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio até mais de um ano depois de sua preparação como descrito no capítulo anterior (Capítulo 5) a etapa seguinte deste estudo consistiu em avaliar o efeito antiparasitário desse sistema de NE-AICIFt-PM na TFD tanto nas formas extracelulares como intracelulares da *L. braziliensis*, tendo o macrófago como célula hospedeira do parasita.

Desse modo, este capítulo relata a metodologia utilizada para avaliar o efeito antiparasitário desse sistema NE-AICIFt-PM assim como os resultados obtidos e a discussão dos mesmos.

6.2 METODOLOGIA

Considerando a vasta experiência da equipe de pesquisadores do Laboratório de Quimioterapia do Centro de Investigações em enfermidades Tropicais (CINTROP) da Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia, os ensaios *in vitro* contra o parasito foram realizados naquela Instituição sob a supervisão da professora Dra. Patricia Escobar Rivero.

6.2.1 Linhagens celulares

Para avaliar o efeito antiparasitário dos sistemas de nanoemulsão na terapia fotodinâmica foram utilizadas duas linhagens celulares: (1) linhagem de promastigotas da espécie *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e (2) monócitos da linhagem THP-1 (TIB 202, ATCC).

A linhagem de promastigotas foi mantida em meio de cultura *Schneider's insect* suplementado com 10% de SBFi, 28°C. (2) Monócitos da linhagem THP-1 (TIB 202, ATCC) foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco, USA) com 10% de SBFi, no momento do ensaio com o parasito, as células foram transformadas com acetato miristato de forbol (PMA) até a formação de uma monocamada (72 horas).

6.2.2 Preparação das soluções e dos sistemas de nanoemulsão

As diluições dos sistemas de nanoemulsão (NE) foram preparadas em meio de cultura RPMI e de maneira independente: 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 para os testes em promastigotas. A PM foi utilizada nas concentrações de 150; 1500; 15000 e 75000µg/mL e a AICIFt nas concentrações de 0.04; 0,4; 4,0; e 20 µM.

Avaliação do efeito antiparasitário dos sistemas de nanoemulsão

Tendo em conta a fototoxicidade mostrada pelos sistemas de NE sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* prepararam-se diluições de 1:50 (3000 µg/mL PM e 0.8 µM AICIFt), 1:100 (1500 µg/mL PM e 0.4 µM AICIFt), 1:300 (500 µg/mL PM e 0.13 µM AICIFt) e 1:500 (300 µg/mL PM e 0.08 µM AICIFt). Por outro lado, os compostos livres (AICIFt e PM) foram preparados na maior concentração na qual estes se encontravam nos sistemas de NE: para a AICIFt = 40 µM e para PM= 15% (150 mg/mL); a partir destas soluções prepararam-se as diluições a serem utilizadas nos ensaios biológicos.

6.2.3 Sistema de irradiação

A Terapia Fotodinâmica foi realizada utilizando o fotorreator biológico (Luzchem Research Inc, Ontario, Canada) equipado com 16 lâmpadas de luz fluorescente, rotação constante das placas, emissão de luz no espectro visível (400-700 nm) e sob temperatura controlada (37 °C para as células de mamífero não infectadas, 32 °C para as células de mamífero infectadas com *L. braziliensis* e 28°C para as formas promastigotas de *L. braziliensis*). As células foram irradiadas por 32 minutos utilizando uma fluência de 5 Joules/cm².

6.2.4 Ensaios da atividade antiparasitária dos sistemas de nanoemulsão

Promastigotas em fase exponencial de crescimento (5×10^5 parasitos/mL) foram incubados a 28 °C com sistemas de NE nas diferentes concentrações. Parasitas incubados sem sistema de NE constituíram o controle negativo.

Após 24 horas de incubação, as células foram irradiadas e novamente incubadas por mais 24 horas, quando então, usando uma solução aquosa de eosina amarela como corante, se realizou a contagem direta dos parasitas

vivos em câmara de Neubauer. Esta forma de contagem baseia-se no fato de que as células mortas apresentam membranas lesadas que permitem a penetração de corantes.

6.2.5 Ensaios de toxicidade e fototoxicidade em células THP-1 infetadas

Células THP-1 (8×10^5 células/mL) diferenciadas em seu fenótipo aderente com PMA (20ng/mL) foram infectadas razão 1:10 (células:parasito) com promastigotas de *L. braziliensis* em fase latente e mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂, a umidade 95% e a temperatura de 32 °C. Após 24 horas eram adicionados às culturas os sistemas de NE em diferentes concentrações, descritas anteriormente, e as culturas eram novamente incubadas por mais 24 horas.

Após esse tempo as células eram irradiadas e novamente incubadas por mais 24 horas, quando eram então fixadas com metanol por 1 minuto e depois coradas com uma solução de Giemsa durante 13 minutos (J.T. Baker, Edo de México, México) e analisadas ao microscópio de luz (Nikon triocular E200) para a determinação da inibição parasitária mediante o contagem em 300 células infetadas e não infetadas.

6.2.6. Análise estatística

As concentrações que inibiram 50 e 90 % dos parasitos dentro de uma população (CI₅₀, CI₉₀) foram calculadas por regressão sigmoide usando o software XLfit4 a partir das percentagens de inibição de cada concentração avaliada.

Os índices de seletividade (IS) foram calculados da seguinte forma: % de inibição do parasito / % fototoxicidade em THP-1. IS >2 foram considerados seletivos. Para comparação foi utilizado o test Student's, valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6.3 RESULTADOS

O efeito dos nanossistemas sobre promastigotas de *L. braziliensis* livres está apresentado nas figuras 10 e 11.

Na Figura 10 observa-se que o óleo não tem efeito e o cremofor assim como o veículo (NE) inibiram o promastigota >99% quando diluído 10 vezes antes e depois da TFD.

Tanto a PM quanto a AICIFt livre foram capazes de inibir o crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* quando irradiadas, TFD (Figura 11). Essa inibição foi de 97.18 -100% e com IS de 5.5 e 2 quando se encontravam em concentrações de 1500 µg/mL e 0.4 µM, respectivamente no sistema de NE.

No entanto, a AICIFt livre na concentração de 0.004 µM não inibiu o crescimento do parasito, em contraste ao observado com a PM (150 µg/mL) que mostrou >73% de inibição dos promastigotas sem apresentar nessa concentração um efeito tóxico sobre as células THP-1 (Figura 11). Adicionalmente, estes compostos mostraram CI_{50} de 0.24 ± 0.009 e < 243.65 µM para AICIFt e PM livre, respectivamente.

Quando a AICIFt foi veiculada no sistema de NE observou-se aumento da inibição do crescimento do parasito depois da TFD ($p < 0.005$). Esta inibição foi de 100% mesmo quando o sistema de NE foi diluído 1000 vezes (0.004 µM

AICIFt), demonstrando maior efetividade do AICIFt quando veiculada no nanossistema NE (NE-AICIFt) quanto comparada à AICIFt livre. Além disso, o sistema NE-AICIFt foi seletivo para inibir o parasito (IS 5.04) e não foi tóxico para a célula hospedeira quando comparado à AICIFt livre (Figura 11). Adicionalmente, a AICIFt livre ou no sistema de NE demonstrou ser ativa só depois da TFD observando-se que o efeito antiparasitário é totalmente devido ao fotossensibilizador e não à fonte de luz, pois sem a irradiação a inibição é nula. A CI_{50} da NE-AICIFt não foi determinada ($CI_{50} < 0.04 \mu M$).

Por outro lado, quando a PM foi veiculada no sistema de NE não se observou diferenças significativas ($p < 0.05$) na taxa de inibição parasitaria antes e depois da TFD. O sistema de NE PM (15%) demonstrou ser capaz de inibir os promastigotas até 98% com IS de 26.7, dada a concentração de PM presente no sistema de NE (1500 $\mu g/mL$), mas, este mesmo efeito não se apresentou na concentração de 150 $\mu g/mL$.

Adicionalmente, observou-se maior seletividade para inibir o crescimento do parasito e não destruir a célula de mamífero por parte do sistema de NE de PM 15% (IS 26.7) do que a PM livre (IS 5.5). Finalmente, quando a AICIFt e a PM foram combinadas em um mesmo sistema de NE (NE-AICIFt-PM), observou-se efeito inibitório de 100% contra promastigotas de *L. braziliensis* logo após da TFD em todas as diluições testadas e com IF de 1.61 para quando o sistema de NE foi diluído 100 vezes. Por tanto, o sistema de NE combinado (NE-AICIFt-PM 15%) demonstrou ser ativo e seletivo contra promastigotas de *L. braziliensis* antes e depois da TFD. Este sistema combinado mostrou ser mais ativo quanto a NE-AICIFt ($p = 0.04$) e NE-PM 15% ($p = 0.004$).

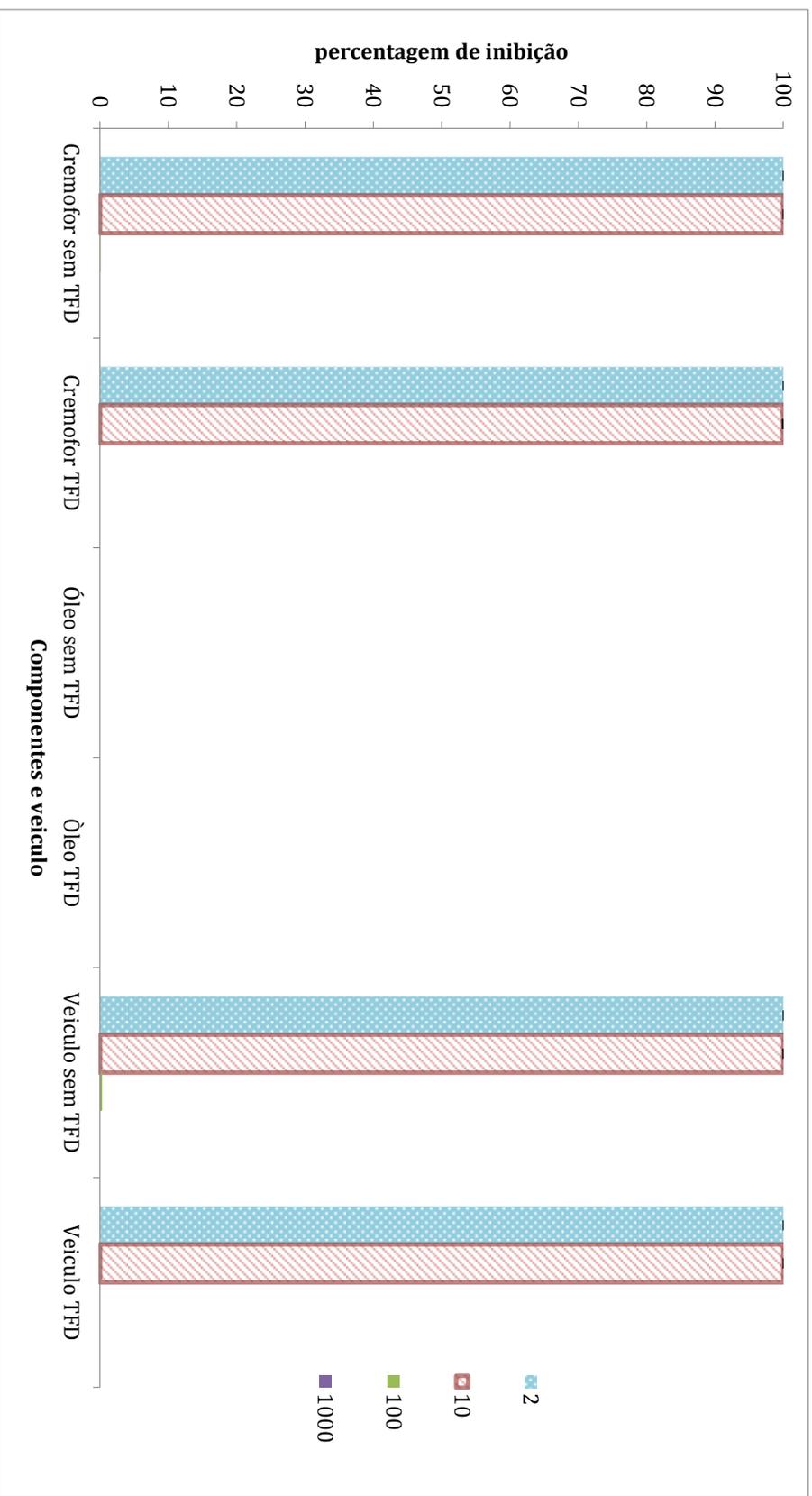


Figura 10. Efeito citotóxico e fototóxico da nanoemulsão e seus componentes (surfactante e óleo) contra as promastigotas de *L. braziliensis*. A toxicidade foi avaliada em células não irradiadas (OU/cm²) e irradiadas (5U/cm²). Os dados são a média e desvio padrão de dois experimentos independentes e eles são expressos em porcentagens de inibição. * (p=0.005) AlCIFT principalmente ativa em nanoemulsão quanto livre, TFD; ** (p=0.04) Sistema de nanoemulsão combinado + TFD mais ativo quanto a NE-AlCIFT + TFD; *** (p=0.004) Sistema de nanoemulsão combinado mais ativo quanto a NE-PM15%, TFD.

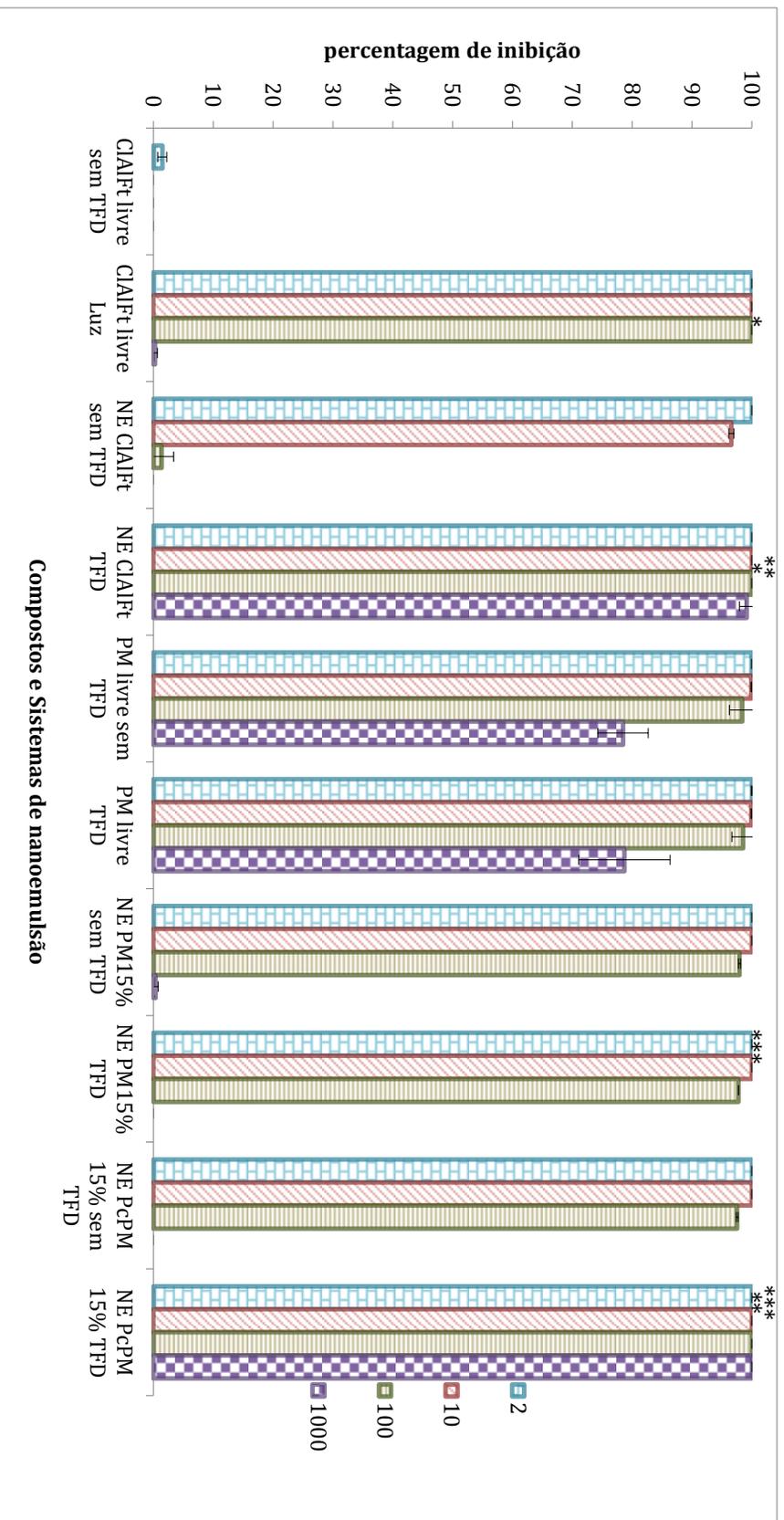


Figura 11. Efeito citotóxico e fototóxico de sistemas de nanoemulsão contendo ou não Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina e dos compostos Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina livres em promastigotas de *L. braziliensis*. A toxicidade dos sistemas de nanoemulsão contra as formas extracelulares do parasito foi avaliada em células não irradiadas (OJ/cm²) e irradiadas (5J/cm²). Os dados são a média e desvio padrão de dois experimentos independentes e eles são expressos em percentagens de inibição. * (p=0,005) AICI/Ft principalmente ativa em nanoemulsão quanto livre, TFD; ** (p=0,04) Sistema de nanoemulsão combinado + TFD mais ativo quanto a NE-AICI/Ft + TFD; *** (p=0,004) Sistema de nanoemulsão combinado mais ativo quanto a NE-PM15%, TFD.

Avaliação do efeito antiparasitário dos sistemas de nanoemulsão

O efeito dos nanossistemas em células THP-1 infectadas por amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* está mostrado nas figuras 12 e 13. Na Figura 12 observa-se que os componentes do sistema de NE e o veículo não mostraram atividade citotóxica sobre esta forma intracelular do parasito.

Já na Figura 13 observa-se a inibição de 95.7 e 71.8% de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* quando tratados com AICIFt livre na concentração de 0.8 e 0.4 μM , respectivamente e irradiados, TFD. Quando a AICIFt foi incorporada no sistema de NE, a inibição antiparasitária aumentou de 71.84 - 81.25% e de 27.65 - 58% para a AICIFt livre e no sistema de NE, respectivamente, logo depois da TFD ($p < 0.05$); quando a AICIFt encontrava-se nas concentrações de 0.4 e 0.13 μM . Além disso, apresentou índice de fototoxicidade de 1.36 quando o sistema de NE foi diluído 100 vezes (0.4 μM).

A PM livre inibiu >56.6% e >44% dos amastigotas intracelulares na concentração de 3000 e 1500 μM , respectivamente, com IS de 2.45 para esta última; esta inibição antiparasitária foi similar ($p > 0.05$) quando a PM foi incorporada ao sistema de NE, mostrando percentagem de inibição >63% e >41% nas concentrações de 3000 e 1500 $\mu\text{g/mL}$. CI_{50} de 1897.66 $\mu\text{M} \pm 179.68$ e 2966.29 $\mu\text{M} \pm 277.66$ foram determinadas para NE-PM15% e PM livre, respectivamente.

Na Figura 13 pode-se observar que a taxa de inibição de crescimento de amastigotas intracelulares logo depois da TFD chegou até 88.58% ainda quando o sistema encontrava-se diluído 500 vezes; este último foi observado igualmente na forma de promastigota (Figura 11), onde o sistema de NE diluído 1000 vezes inibiu 100% o crescimento do parasito logo depois da TFD. Este

Avaliação do efeito antiparasitário dos sistemas de nanoemulsão

sistema de NE combinado mostrou similar capacidade de inibição do que o sistema de NE de AICIFt ($p=0.17$).

Finalmente, a AICIFt e a PM quando incorporadas no sistema de NE apresentaram efeito antiparasitário maior do que na sua forma livre potencializando o efeito ($p<0.05$, ver Figura 13).

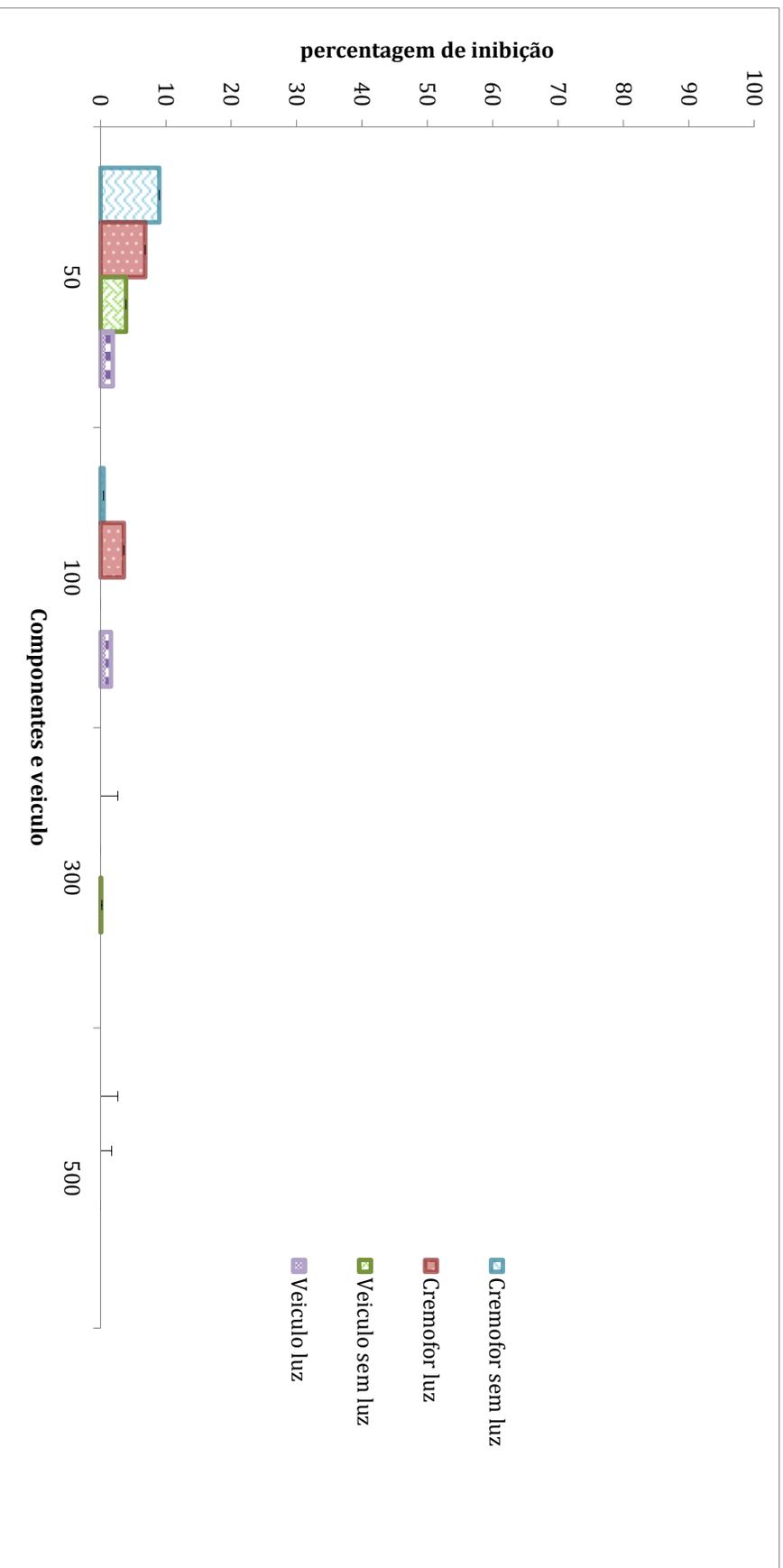


Figura 12. Efeito citotóxico e fototóxico da nanoemulsão (veículo) e de seus componentes (surfactante e óleo) em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. A toxicidade contra as formas intracelulares do parasito foi avaliada em células não irradiadas (0J/cm²) e irradiadas (5J/cm²). Os dados são a média e desvio padrão de dois experimentos independentes e eles são expressos em porcentagens de inibição.

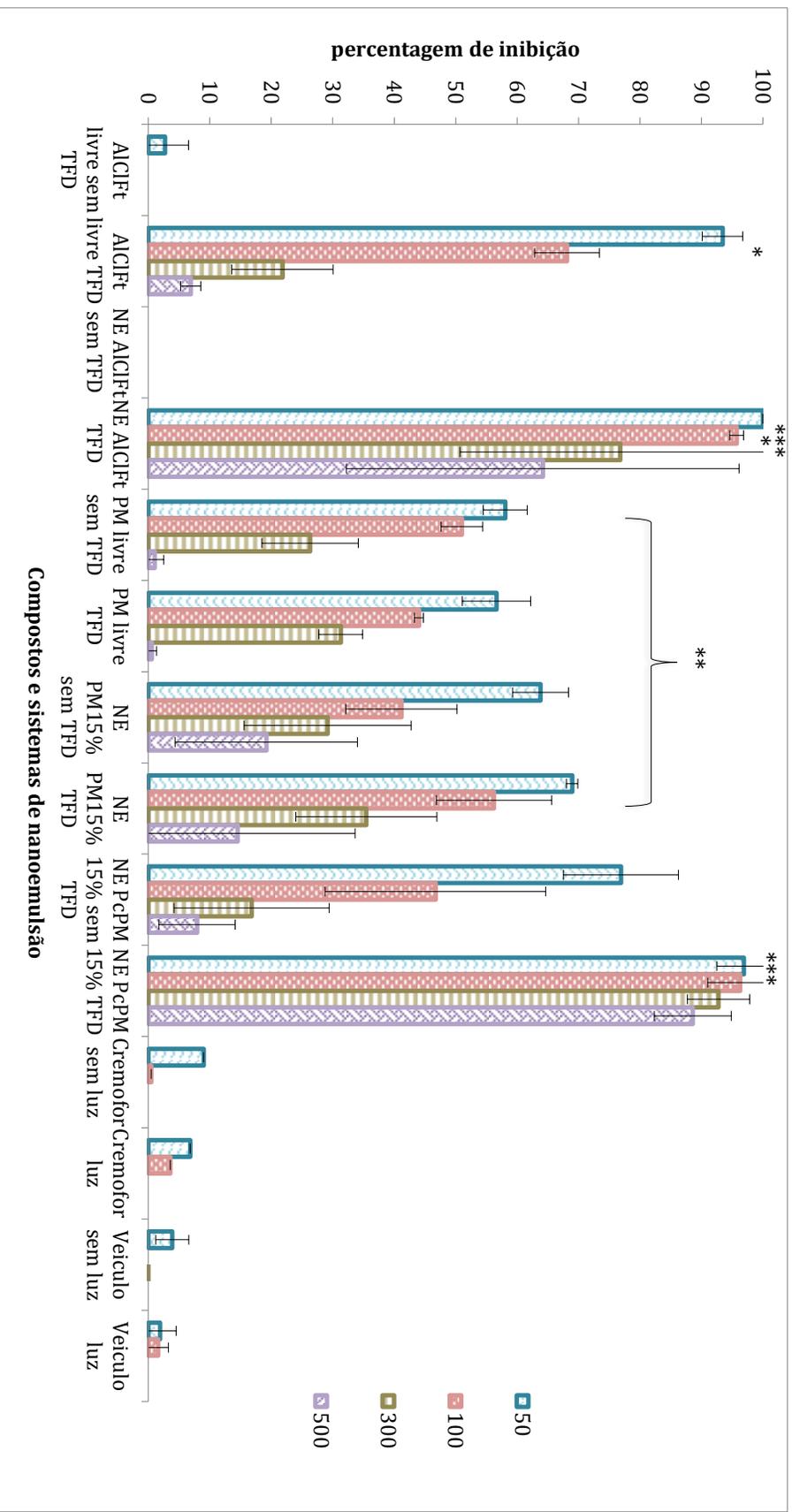


Figura 13. Efeito citotóxico e fototóxico de sistemas de nanoemulsão contendo Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Paromomicina em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. A toxicidade foi avaliada em células não irradiadas ($0\text{J}/\text{cm}^2$) e irradiadas ($5\text{J}/\text{cm}^2$). Os dados são a média e desvio padrão de dois experimentos independentes e eles estão expressos em percentagens de inibição. * $p < 0,05$ maior inibição antiparasitária da NE-AICI Ft quanto AICI Ft livre, TFD; ** $p > 0,05$ Similar atividade leishmanicida da Paramomicina; *** $p > 0,17$

6.3 DISCUSSÃO

A pesquisa de novas terapias para a leishmaniose envolve em sua primeira fase pré-clínica, os ensaios *in vitro* contra as principais formas do parasito: a forma promastigota, forma extracelular e a forma amastigota, forma residente nos macrófagos. Normalmente, o promastigota é utilizado com a finalidade de se obter um panorama geral do comportamento do fármaco em questão, mas não tem grande importância dado que a forma presente no hospedeiro doente é o amastigota intracelular sobre o qual é dirigida a terapia leishmanicida (OLIVEIRA *et alli*, 2004).

Neste estudo é apresentado sistemas de NE ativos tanto em promastigota quanto amastigota intracelular com percentagens de inibição em geral até 100% (Figuras 10 e 11). Adicionalmente, demonstrou-se que o sistema de NE foi mais ativo ($p < 0.05$) que os mesmos compostos livres. O sistema combinado (NE-AICIFt-PM) foi capaz de inibir o crescimento do parasito até mesmo quando os compostos estão mais diluídos (>90%); estes resultados mostraram que a atividade leishmanicida é potencializada quanto os dois fármacos estão juntos.

O sistema de NE combinado mostrou atividade antiparasitária antes e depois da TFD, isto provavelmente pelo efeito tanto da PM ativa sem necessidade de aplicação da irradiação e a AICIFt ativa logo da TFD. A TFD combinada com a PM já foi empregada em pacientes Iranianos com LC por *L. major* por Asilan e Davami em 2006. Os autores mostraram que os pacientes tratados com creme PM 15% mais 12% de cloreto de metilbenzetônio em uma pomada à base de parafina branca macia, tiveram menor efetividade quanto foi usada a TFD com 5-ácido aminolevulínico (5-ALA) onde as lesões foram livres de amastigotas e a cura

clínica foi observada com cicatrizes aceitável, no entanto, efeitos adversos como pruridos, queimação, vermelhidão, secreção, edema e dor foram apresentados por todos os grupos tratados. (ASILIAM & DAVAMI, 2006).

A atividade leishmanicida dos sistemas de NE demonstra que eles são bons veículos para transportar a AICIFt como foi reportado por Muelhmann e colaboradores (MUELHMANN *et alli*, 2015), tendo em conta as suas propriedades coloidais e físico-químicas, além de permitirem a permeabilidade dos compostos em sistemas *in vitro*, importante pois para exercerem efeito terapêutico esses fármacos devem atravessar as membranas celulares tridimensionais de modo a alcançar o parasito intracelular: primeiramente a membrana do macrófago ou célula alvo, depois a do fagolisossoma e finalmente a do parasito (WALLER & MCDONALD, 2002; CUNNINGHAM, 2002). Além, a ação da TFD sobre o FS é vital para a geração de ERO desencadeantes da morte do parasito. Do mesmo modo, propriedades como a carga e a estrutura do FS parecem ser fatores determinantes do efeito leishmanicida: agentes catiônicos poderiam ser mais efetivos contra a superfície negativamente carregada do parasito (AKILOV *et alli*, 2006).

A AICIFt nas concentrações avaliadas neste estudo não apresentou efeito contra o parasito quando não irradiada e a atividade da PM não foi afetada pela irradiação. A FTD é descrita por ser seletiva contra a célula alvo (KHARKWAL *et alli*, 2011), neste trabalho, o sistema de NE-AICIFt e combinado ativos na forma de amastigota intracelular mostraram IS >1.5 quando encontravam-se a AICIFt e PM na concentração de 0.4 µM e 1500 µg/mL, respetivamente. O sistema de NE-PM15% mostrou IS de 30.72. Estes resultados demonstram a seletividade

principalmente da PM contra o parasito e não contra o macrófago THP-1 utilizado como célula alvo da *Leishmania* neste estudo.

A literatura ainda não reporta estudos deste FS contra *L. braziliensis*, no entanto, outros autores tem testado o efeito *in vitro* e *in vivo* deste FS livre em *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. panamensis*. Dutta e colaboradores (2005) reportaram o efeito citolítico da TFD mediada por AICIFt ($1\mu\text{g/mL}$, 3.5Joules/cm^2) em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, perda do flagelo e da mobilidade, assim como alterações na forma do parasito (Dutta et alli, 2005). Do mesmo modo, Valdivieso em 2010 demonstrou o efeito antiparasitário da AICIFt após irradiação (5 joules/cm^2) em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. panamensis* ($\text{CC}_{50} 0.06 \pm 0.01\mu\text{M}$) para promastigotas 24 horas após irradiação. A forma intracelular foi inibida nas concentrações de 1.66 e $0.55\mu\text{M}$ 72 horas após irradiação; além de alterações na morfologia, fragmentação nuclear, perda do núcleo e/ou kinetoplasto e do potencial de membrana mitocondrial. A atividade *in vitro* da AICIFt após irradiação (10 joules/cm^2) em promastigotas de *L. panamensis* e *L. chagasi* também foi testada por Escobar e colaboradores (2006), os autores mostraram DE_{50} de 0.17 e $0.0033\mu\text{M}$ sobre esses parasitos. Por outro lado, Dutta e colaboradores reportaram o efeito sinérgico de dois fotossensibilizantes (AICIFt e Uroporfirin) em modelos *in vitro* e *in vivo* de *L. amazonensis*, eles demonstraram que esta mistura aumentava a eficácia da TFD sobre o parasito (DUTTA et alli, 2012). Em adição, dado a atividade *in vitro* demonstrada pela AICIFt contra este parasito, veículos como os lipossomas ultra deformáveis tem demonstrado ser efetivos contra *L. panamensis* e *L. chagasi*: Após irradiação (17joules/cm^2) a CI_{50} para inibir promastigotas e amastigotas

Avaliação do efeito antiparasitário dos sistemas de nanoemulsão

intracelulares de *L. panamensis* foi de 0.31 ± 0.02 e 1.49 ± 0.01 nM, respectivamente; assim mesmo, a CI_{50} para inibir formas extracelulares e intracelulares de *L. chagasi* foi de 0.03 ± 0.0003 e 0.69 ± 0.08 nM, respectivamente. Os lipossomas demonstraram ser mais efetivos para inibir o parasito que o FS livre (HERNÁNDEZ *et alli*, 2012). Neste estudo, a nanoemulsão inibiu igualmente ambas formas da *L. braziliensis*, a AICIFt livre e em NE após da TFD (5 joules/cm^2) foi eficaz contra o parasito, sendo que concentrações menores de $0.08 \mu\text{M}$ foram suficientes para inibir 50% da população do parasito

Poucos estudos *in vivo* são reportados utilizando este FS para tratar lesões cutâneas da *Leishmania spp*, Hernández (2010) testou duas formulações de AICIFt *in vitro* e em lesões causadas por *L. amazonensis* no modelo de hamster dourado: a solução (AICIFt em solução) composta por 2.5mg FS dissolvido em DMSO: tween80: agua milliQ nas proporções de 35: 7: 21.4: 42.9 e a formulação de dois (AICIFt gel) composta por carbopol 940, agua milliQ, trietanolamina e a AICIFt dissolvida em DMSO: tween80: isopropanol: propilenglicol nas proporções de 33.4: 33.4: 16.6: 16.6. *In vitro* a primeira formulação foi menos ativa do que a AICIFt livre em promastigotas, amastigotas intracelulares e amastigotas axênicos usando uma fluência de 3 joules/cm^2 . *In vivo*, a primeira formulação foi efetiva permitindo a cura das lesões após de 12 semanas do tratamento, mas a formulação dois não foi efetiva para tratar este tipo de lesões.

Por outro lado, embora se encontrasse adsorvida na superfície dos nanossistemas, a PM mostrou ser ativa contra o parasito, mas, não mais que a AICIFt como foi descrito acima. A PM tem sido testada *in vitro*, *in vivo* e em estudos clínicos principalmente em espécies da leishmania causante da LC do

Velho Mundo, ela é considerada uma excelente fármaco por sua baixa toxicidade, no entanto, a efetividade ainda das formulações atuais é muito variada (ASILIAN & DAVAMI, 2011).

Alguns estudos mostram o efeito das formulações tópicas existentes de PM em espécies causantes de LTA do Novo Mundo: a efetividade do tratamento tópico do gel hidrofílico de PM 10% para diminuir o tamanho das lesões em camundongos infetados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foi reportada por Santos e colaboradores (2005), os autores consideraram a formulação de PM mais efetiva para tratar lesões por *L. amazonensis* do que as induzidas por *L. braziliensis*, além de mais eficaz do que o antimonial usado como controle. Novos estudos usando nanoestruturas como mecanismo de transporte de fármacos têm sido reportados com PM. Brugués e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram o efeito *in vitro* em promastigotas de *L. infantum* e *L. major* (CI_{50} 12.16 e 23.31 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) de um nanogel micelar de PM, o nanogel mostrou ser mais ativo do que a PM em solução. Além dessas outras formulações como as formulações lipossomais de PM (10 e 20%) tem mostrado ser em capazes de curar lesões de LC em camundongos Balb/c mediante a aplicação tópica (50mg/2 dose dia/4 semanas), conforme descrito por Jaafari e colaboradores em 2009. Em adição, nanopartículas de PM (NP-PM) mostraram inibir espécies da *Leishmania spp*, espécies relacionadas à LC no Velho Mundo (*L. major* e *L. tropica*) (HEIDARI-KHARAJI *et alli*, 2015).

Entretanto, apesar dos estudos relatados na literatura mostrando a eficácia da AICIFt e da a PM para inibir o protozoário *Leishmania spp*, pouco é conhecido acerca do seus efeitos contra *L. braziliensis*, espécie alvo deste trabalho; aqui é

Avaliação do efeito antiparasitário dos sistemas de nanoemulsão

demostrado que cada um desses compostos individualmente destrói o parasito, a AICIFt mais que a PM. Este é o primeiro estudo onde se avalia a ação combinada da AICIFt + TFD e PM com resultados promissores. O sistema combinado de NE avaliado demonstrou ser um excelente veículo para transportar estes dois compostos tendo em conta além de sua atividade antiparasitária, suas características coloidais e físico-químicas como foi mencionado em capítulos anteriores; estes sistemas de NE poderiam ser avaliados em modelos *in vivo* de *L. braziliensis* e poderiam ser uma alternativa em médio prazo na terapia desta doença negligenciada e de alto impacto sobre a saúde pública dos países onde ela é endêmica.

7.1 INTRODUÇÃO

As pesquisas que tratam do desenvolvimento de nanossistemas a serem utilizados em sistemas biológicos, assim como as que tratam de novos fármacos, devem considerar, além da eficácia, a segurança dos mesmos (MARQUIS *et alli*, 2009; GREISH *et alli*, 2010; ARORA *et alli*, 2012). Por isso, as etapas pré-clínicas devem não só envolver a síntese de uma molécula, os testes físico-químicos da mesma, a avaliação da sua bioatividade, mas também estudos de toxicidade e genotoxicidade, entre outros (MARQUIS *et alli*, 2009; NIH, 2010).

Tendo em conta que a *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório (CUNNINGHAM, 2002), a avaliação da toxicidade dos nanomateriais que possam ser usados no tratamento desta doença é de grande importância, principalmente devido às condições onde o parasito sobrevive e prolifera no hospedeiro vertebrado. De tal forma, que a existência de uma seletividade pela eliminação do parasito e não pela célula hospedeira deve ser demonstrada.

O teste de proliferação celular *in vitro* é uma técnica que envolve manipulação mínima das células e obtenção de resultados reprodutíveis. Esta técnica envolve a quantificação do composto formazan originado pela redução do sal de tetrazólio como indicador do metabolismo celular, o qual é monitorado mediante densidade óptica (MOSSMANN, 1983).

Por outro lado, o teste de micronúcleos considerado um teste de toxicidade genética *in vivo* permite avaliar a capacidade de algumas moléculas em induzir dano genético em células, dano esse que pode ser visualizado em células em divisão celular, mais especificamente células em metáfase. Esse tipo de dano é mais facilmente visualizado em eritroblastos, pois essas células,

que se origem na medula óssea a partir de uma célula tronco hematopoiética, expulsam o núcleo e se diferenciam em eritrócitos policromáticos. Estes quando na corrente sanguínea se diferenciam em eritrócitos normocromáticos e, posteriormente em eritrócitos. Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebra podem após a mitose não serem incorporados no núcleo principal das células filhas (ARENCHIBA *et alli*, 2009).

Esses testes são aceitos e recomendados pelas agências internacionais e por instituições governamentais para avaliar a toxicidade inicial de novos produtos farmacêuticos antes do início de estudos clínicos, da comercialização e do registro dos mesmos de modo a evitar a exposição humana a substâncias tóxicas (LUZHNA *et alli*, 2013).

Com base no exposto, no presente capítulo será avaliada (1) a proliferação de células THP-1 diferenciadas em seu fenótipo aderente após exposição aos nanossistemas; (2) efeito genotóxico dos nanossistemas e (3) mudanças nas células sanguíneas em camundongos saudáveis.

7.2 METODOLOGÍA

7.2.1 Ensaios de toxicidade e fototoxicidade em células THP-1 não infectadas: um ensaio in vitro

A toxicidade e a fototoxicidade (pós-irradiação) dos sistemas de NE de AICIFt e PM sobre células da linhagem monocítica humana, células THP-1, diferenciadas com acetato miristato de forbol (PMA) em seu fenótipo aderente foram avaliadas *in vitro*.

Avaliação in vitro e in vivo da toxicidade dos sistemas de nanoemulsão

Resumidamente, células THP-1 diferenciadas (8×10^5 células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI e mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de CO₂, a umidade 95% e a temperatura de 37 °C, durante 72 horas. Posteriormente, sistemas de NE em quatro diluições (1:2, 1:10, 1:100, 1:1000) foram adicionados às culturas e estas foram novamente incubadas; células sem NE foram mantidas em meio de cultura, constituindo o grupo controle. Após 24 horas, as células foram irradiadas utilizando-se o fotorreator *LuzChem* como descrito no capítulo anterior, item 6.2.5 e novamente incubadas por mais 24 horas. Quando então foram submetidas ao ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo) (2.5mg/ml, Merck) para determinar-se a toxicidade das nanoemulsões. A densidade óptica foi determinada a 580 nm espectrofotometricamente.

7.2.2 Efeito genotóxico dos nanossistemas: um ensaio in vivo.

O possível efeito genotóxico dos nanossistemas foi avaliado por meio do ensaio de micronúcleo utilizando-se células da medula óssea de camundongos BALB/c tratados topicamente, na base da cauda (Figura 14), com cada um dos sistemas de nanoemulsão (40µL) durante 15 dias (uma dose a cada três-quatro dias).

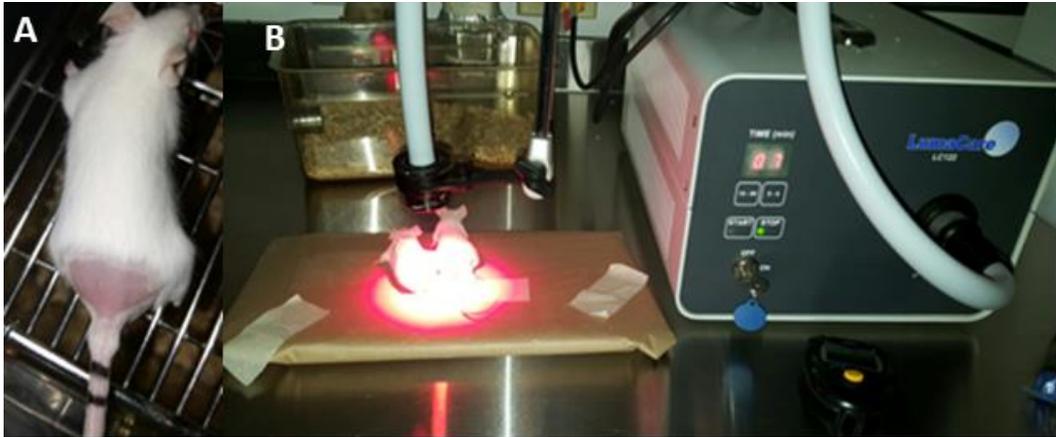


Figura 14. Sistema de irradiado. A: Tratamento realizado na base da cauda (40 μ L) dos sistemas de nanoemulsão. B: Camundongos Balb/c irradiados 20 J/cm² durante 7 minutos na base da cauda tratada com os sistemas de nanoemulsão.

Assim, quatro grupos experimentais (três animais por grupo) foram testados: grupo 1, animais tratados com NE-AICIFt; grupo 2, animais tratados com NE-PM15%; grupo 3, animais tratados com NE-AICIFt/PM15% e grupo 4, animais tratados com o veículo (NE). Após do tratamento, os animais foram mantidos no escuro por 30 minutos; posteriormente, os grupos 1 e 3 foram irradiados durante sete minutos (20 Joules/cm²) com a lâmpada LumaCare® LC-122A equipado com um filtro de fibra óptica e comprimento de onda específica de 672nm \pm 40nm (Figura 12).

Antes, durante e depois de finalizado o tratamento tópico, os camundongos eram observados considerando-se possíveis efeitos colaterais na pele tratada, tais como irritabilidade, vermelhidão ou lacerações. O registro fotográfico foi feito no dia 0 antes do tratamento e nos dias 7 e 15 de tratamento e TFD. Adicionalmente, determinou-se o peso dos camundongos antes e depois de terminado o tratamento (Figura 15).



Figura 15. Ilustração da pesagem de camundongos Balb/c tratados com sistemas de nanoemulsão.

7.2.2.1. Coleta de sangue e de medula óssea

Depois de seis dias de tratamento, os animais foram devidamente anestesiados com uma solução de ketamina (80 mg/kg de massa corpórea) e xilazina (10 mg/kg de massa corpórea), por via intraperitoneal, e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca para a realização de hemograma completo. Todas as dosagens foram realizadas em Contador automático no Laboratório Veterinário (Health animal diagnostic S.A.S, Bucaramanga, Colombia)

Cada animal teve também as epífises dos fêmures seccionadas e com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de soro fetal bovino (SFB), em temperatura ambiente, removeu-se a medula óssea para realizar-se o ensaio de micronúcleo. O material foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 5000 x g; depois disso o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 50 µl de SFB e, posteriormente 10 µl do homogeneizado foi

Avaliação in vitro e in vivo da toxicidade dos sistemas de nanoemulsão

estendido em lâmina de microscópio. Após secagem das lâminas, à temperatura ambiente, o material foi fixado em metanol por cinco minutos, quando foi então corado com uma solução composta de 1mL de Giemsa e 14mL de tampão fosfato durante 15 minutos. A frequência de micronúcleos foi determinada em 2000 eritrócitos policromáticos (2 lâminas total/animal) utilizando microscopia de luz com um aumento de 100X.

7.2.3 Considerações éticas

Os testes em animais realizados no presente estudo consideraram as disposições da Lei 84 de 1989, da República da Colômbia (Carta Nacional para a Proteção dos Animais), que refere-se ao uso de animais vivos em experimentos e pesquisas; Título V da Resolução No. 008.430 de 1993 do Ministério da Saúde sobre "investigação biomédicas envolvendo animais" e de acordo com a resolução 594 de 1996.

Além disso, o uso e o respectivo cuidado dos animais ocorreram sob as normas internacionais de "Canadian Council on Animal Care (CCAC)" guia "National Institutes de Saúde (NIH)" para o cuidado e uso de animais de laboratório e protocolos estipulados pelo Biotério do Centro de Investigação em Doenças tropicais da Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colômbia.

7.2.4 Análise estatística

As concentrações citotóxicas 50 e 90 (CC_{50} , CC_{90}) foram calculadas a partir das percentagens de citotoxicidade com as concentrações avaliadas com cada sistema de NE mediante regressão sigmoide utilizando o software XLFit4.

A normalidade dos dados do peso dos camundongos foi mensurada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p > 0.05$), posteriormente, foi realizada a análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas em um fator. O teste de Levene para o estudo da homogeneidade de variância foi utilizada: assume-se a homogeneidade da variância. Estas análises foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS 15.0 para Windows.

7.3 RESULTADOS

A toxicidade dos componentes do sistema de NE, da AICIFt e a PM livre e em sistemas de NE foram avaliadas em células THP-1 diferenciadas em seu fenótipo aderente antes e depois da TFD. Os resultados se mostram nas figuras 16 e 17.

Na Figura 16 ao avaliar os componentes do sistema de NE observa-se que o cremofor utilizado como surfactante apresentou alta toxicidade (~90%) em células THP-1 quando foi diluído até 10 vezes. Isto se reduz a 4.59 e 0% logo depois da TFD quando foram diluídos 100 e 1000 vezes, respectivamente. O óleo de rícino apresentou baixa toxicidade e fototoxicidade sobre estas células (<14%). Por outro lado, o veículo que contém tanto cremofor como óleo de rícino, demonstrou ser fototóxico induzindo 91.7 e 90.78% células THP-1 à morte quando foi dissolvido duas e dez vezes, respectivamente. Esta fototoxicidade foi de 3.2 e 0% quando foram dissolvidos 100 e 1000 vezes, respectivamente.

Já na Figura 17 observa-se que a PM livre induziu toxicidade >78% quando se encontrava na concentração de 75000 µg/mL (diluição 1:2), no

Avaliação in vitro e in vivo da toxicidade dos sistemas de nanoemulsão

entanto, esta toxicidade foi diminuída para 37, 19 e 0% quando foi diluída 10 (150000 µg/mL), 100 (1500 µg/mL) e 1000 (150 µg/mL) vezes, respectivamente. Por outro lado, a AICIFt livre induziu morte de até 50% das células após a TFD na concentração de 0,32 µM (1:100). A PM e AICIFt + TFD apresentaram CC_{50} igual a 40,02±2.8 nM e 0.33±0.02 µM, respetivamente.

Posteriormente, a AICIFt e a PM foram incluídas nos sistemas de NE de maneira independente como foi descrito em materiais e métodos. Os sistemas de NE diluídos duas e dez vezes foram tóxicos e fototóxicos para as células THP-1, correlacionando com os resultados obtidos com o veículo que também foi tóxico e fototóxico nas mesmas diluições. No entanto, os sistemas de NE de PM quando foram dissolvidos 100 vezes (1500 µg/mL) apresentaram baixa toxicidade, menor que 2%, e toxicidade nula na diluição 1:1000 (150 µg/mL). Ao avaliar a PM livre, observam-se resultados similares aos descritos anteriormente: a PM livre matou até 80% das células na concentração máxima avaliada (75000 µg/mL). No entanto, esta citotoxicidade e fototoxicidade foram menores à obtida com o sistema de NE quando diluído 10 vezes. Contudo, a PM no sistema de NE mostrou menor toxicidade e fototoxicidade (<1.87% PM-SNE versus <18.5% PM-livre) na concentração de 1500 µg/mL (1:100). Tanto a PM livre quanto a contida no sistema de NE não foram tóxicas nem fototóxicas na concentração de 150 µg/mL (1:1000) sobre as células THP-1.

Por outro lado, não se observaram diferenças significativas ($p>0.05$) em nenhuma das concentrações da AICIFt livre ou incorporada no sistema de NE logo após a TFD, quando foram avaliadas sobre células THP-1.

Finalmente, avaliaram-se os sistemas de NE combinados, antes e depois da TFD. Observou-se a mesma toxicidade e fototoxicidade causada

Avaliação in vitro e in vivo da toxicidade dos sistemas de nanoemulsão

possivelmente pelo cremofor presente no sistema de NE nas duas primeiras diluições avaliadas (Figura 17). Quando não irradiados os sistemas dissolvidos 100 e 1000 vezes não se mostraram citotóxicos. No entanto, quando irradiados os sistemas, diluídos 100 vezes, induziram fototoxicidade superior a 42.04%, tal como o observado com o sistema de NE de AICIFt logo da TFD. Quando diluídos 1000 vezes, os sistemas de NE combinados não foram citotóxicos.

A Tabela 6 ilustra os resultados da análise do sangue dos camundongos tratados topicamente com sistemas de NE. Em geral, não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros sanguíneos dos camundongos, alguns deles apresentaram valores baixos de hematócrito, hemoglobina e volume corpuscular meio (VCM) menor que o valor da referência. Adicionalmente foi observada trombocitopenia em todos os camundongos tratados. Os demais parâmetros sanguíneos permaneceram normais.

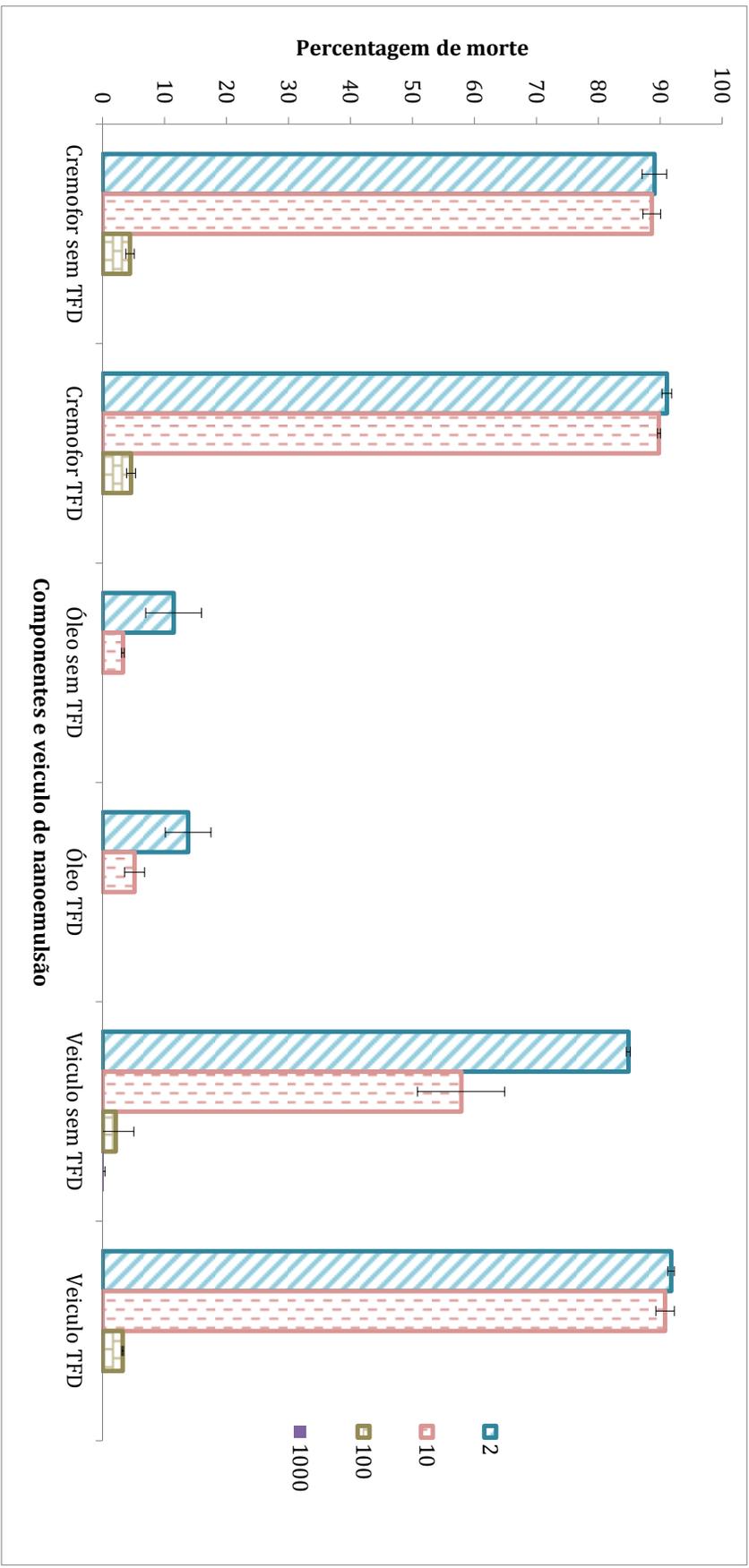


Figura 16. Citotoxicidade e fototoxicidade da nanoemulsão e dos seus componentes sobre células THP-1 não infectadas. A taxa de morte em células THP-1 não infectadas e tratadas com os sistemas de nanoemulsão e seus componentes (surfactante e óleo) foi avaliada não irradiadas (0J/cm²) quanto irradiadas (5J/cm²). Os dados são a média e desvio padrão de dois experimentos independentes.

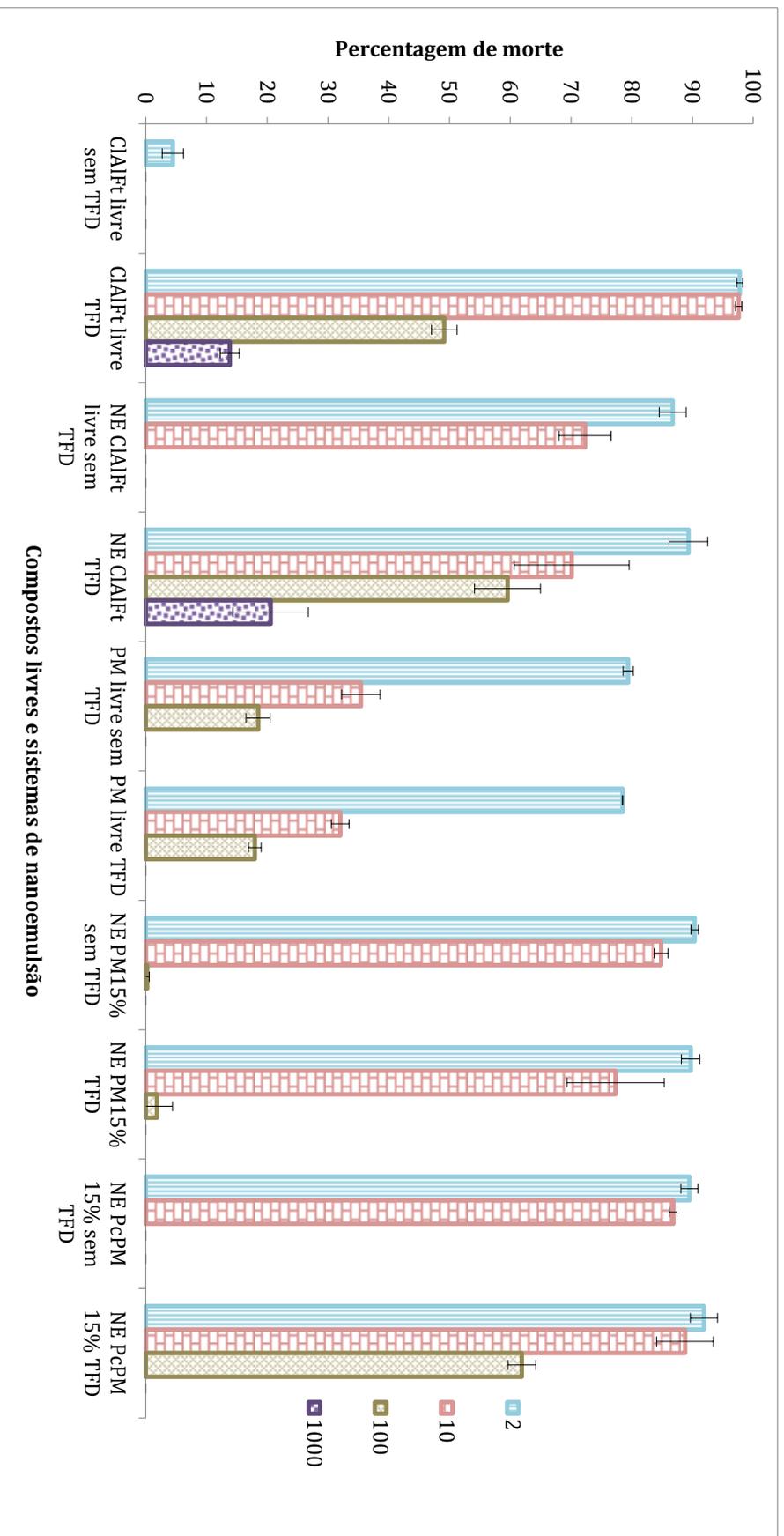


Figura 17. Citotoxicidade e fototoxicidade dos componentes e sistemas de nanoemulsão contendo Alumínio-Cloro-Ftalocianina e/ou Patromomicina sobre células THP-1 não infectadas. A taxa de morte em células THP-1 não infectadas e tratadas com os sistemas de nanoemulsão e seus componentes (surfactante e óleo) foi avaliada não irradiadas ($0\text{J}/\text{cm}^2$) quanto irradiadas ($5\text{J}/\text{cm}^2$). Os dados são a média e desvio padrão de dois experimentos independentes

Tabela 6. Resultados hematológicos de camundongos Balb/c tratados topicamente com os sistemas de nanoemulsão. A análise foi realizada por métodos automatizados seis dias depois de finalizado o tratamento. Os dados são a média \pm desvio padrão dos resultados da análise do sangue por grupo experimental.

Parâmetros hematológicos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Unidades	VR
Hematócrito	38,70 \pm 1,46	36,19 \pm 2,96	34,13 \pm 3,45	38,48 \pm 1,25	%	36-46
Hemoglobina	13,53 \pm 0,13	13,11 \pm 1,17	12,63 \pm 1,73	12,8 \pm 0,64	g/dl	12-15
Hemácias	7,55 \pm 0,36	7,37 \pm 0,24	6,67 \pm 0,62	6,60 \pm 1,30	$\times 10^9/\mu\text{L}$	5,60-7,89
VCM	53,43 \pm 0,67	50,43 \pm 4,92	54,43 \pm 3,94	43,26 \pm 7,37	fl	53,0-68,8
HCM	16,56 \pm 0,59	17,03 \pm 0,76	17,53 \pm 1,19	16,83 \pm 0,85	Pg	16,0-23,1
CHCM	32,8 \pm 1,64	35,5 \pm 0,70	32,73 \pm 1,79	33,13 \pm 0,89	g/dl	30,0-34,1
RDW-SD	23,4 \pm 2,01	22,66 \pm 3,34	21,1 \pm 1,58	21,43 \pm 2,61	fl	
Globulos brancos	4366,66 \pm 1290,99	8000 \pm 1464,24	8003,33 \pm 27,23	2436,66 \pm 399,03	\times/mm^3	2900-15300
Neutrófilos	22,33 \pm 6,08	19,33 \pm 4,41	25 \pm 4,47	26,66 \pm 6,28	%	10-30
Linfócitos	75,33 \pm 4,92	77,33 \pm 2,73	71 \pm 2,36	71 \pm 7,15	%	65-85
Eosinófilos	1,66 \pm 1,03	2,33 \pm 1,36	2,66 \pm 2,06	1,66 \pm 0,51	%	0-6
Monócitos	0,33 \pm 0,51	0,66 \pm 0,51	0,66 \pm 0,51	0,66 \pm 0,51	%	0-5
Basófilos	0,33 \pm 0,51	0,33 \pm 0,51	0,66 \pm 0,51	-	%	0-1
Bandas	-	-	-	-	%	-
Plaquetas	166633,33 \pm 768,68	325666,66 \pm 44419,44	88333,33 \pm 13662,60	115500 \pm 62008,06	\times/mm^3	450000-900000

Conforme se observa na Tabela 7 os sistemas de Nanoemulsão não se mostraram genotóxicos para camundongos Balb/c; a frequência de micronúcleos (0-3) observada nos eritrócitos policromáticos dos camundongos tratados topicamente com os diferentes sistemas foi similar ao número basal de micronúcleos detectada em camundongos Balb/c (ARENCEBIA *et alli*, 2009).

Ainda na mesma tabela observa-se que o tratamento tópico com os diferentes sistemas não afeta o peso dos animais ($F=3,371$, $p=0.075$), tampouco foi estabelecido um efeito significativo das interações nos diferentes sistemas de NE e o tempo de tratamento ($F=1.287$, $p=0.318$).

Tabela 7. Genotoxicidade induzida pelos sistemas de Nanoemulsão e rastreamento do peso dos camundongos no início e final do tratamento. Os dados são a média \pm desvio padrão dos resultados obtidos por grupo experimental.

Grupo experimental	Frequência de MC-EPC (%)	Peso inicial (Gramas)	Peso final (Gramas)
1 (NE-AICIFt)	0.15 \pm 0.04	26.73 \pm 1.36	27.4 \pm 1.34
2 (NE PM 15%/AICIFt)	0.16 \pm 0.05	25.16 \pm 2.56	26.13 \pm 2.84
3 (NE PM 15%)	0.16 \pm 0.02	22.53 \pm 1.67	24.23 \pm 1.38
4 (veículo)	0.06 \pm 0.02	22.36 \pm 0.85	23.4 \pm 0.44

MC-EPC: micronúcleos presentes em eritrócitos policromatófilos; EP: eritrócitos policromatófilos.

Adicionalmente, não foram observados sinais de irritabilidade, vermelhidão ou lacerações na pele dos camundongos tratados topicamente com os sistemas de NE (ver figura 15)

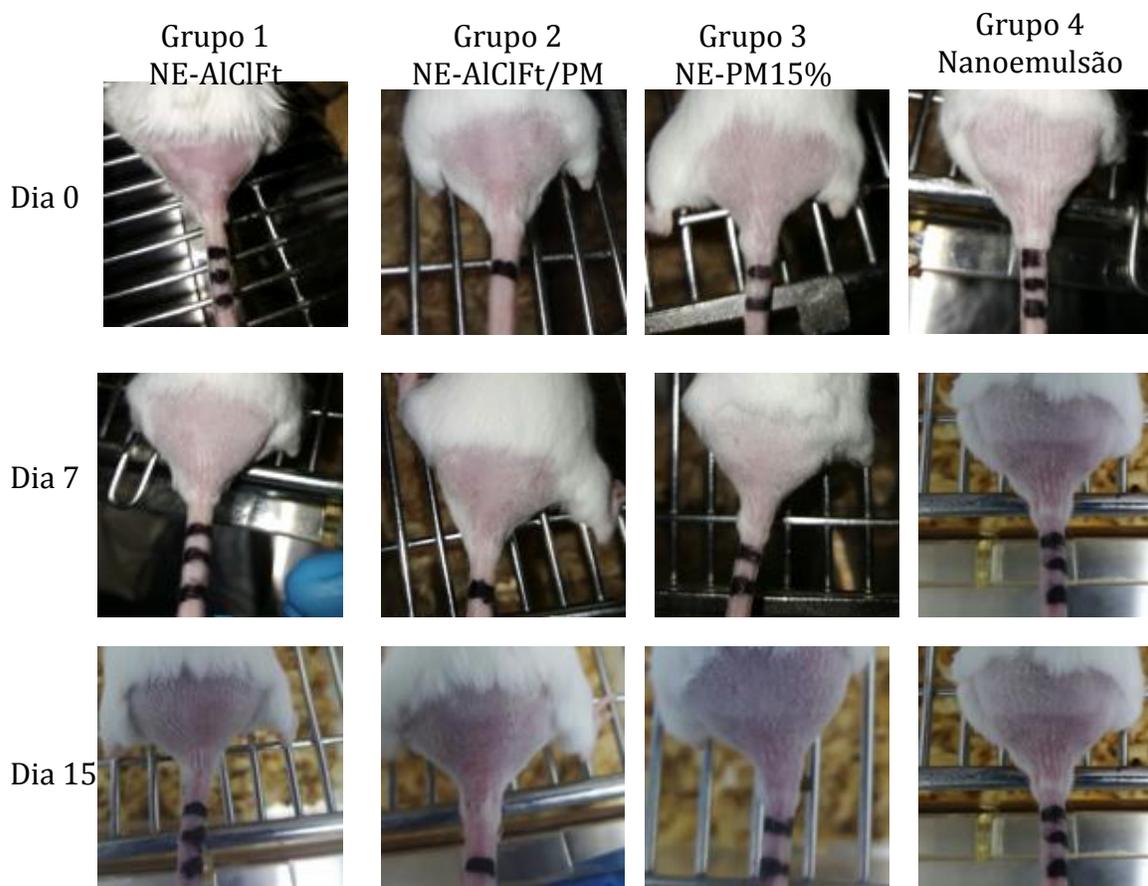


Figura 18. Aspecto da pele dos camundongos tratados com os sistemas de nanoemulsão. Sinais de irritabilidade, vermelhidão ou lacerações na pele (base da cauda) de camundongos Balb/c tratada topicamente durante 15 dias com os sistemas de nanoemulsão foram avaliados antes (dia 0), durante (dia 7) e no fim do tratamento (dia 15).

7.4 DISCUSSÃO

Ao avaliar-se a citotoxicidade dos compostos livres e incorporados em sistemas de NE sobre células THP-1 transformadas antes e depois da TFD observou-se que a AICIFt após da TFD induz CC_{50} similar estando livre ou no sistema de nanoemulsão (CC_{50} 0.33 ± 0.02 versus 0.35 ± 0.09 , respectivamente); neste caso, a toxicidade induzida pela NE poderia ser devido ao cremofor utilizado; este induziu toxicidade $>88\%$ quando concentrado, o que já era

esperado dada sua natureza de surfactante (Figura 16). A fototoxicidade da AICIFt livre e lipossomal sobre as mesmas células THP-1 transformadas foi reportada em 2012 por Hernández e colaboradores, esses autores mostraram que a CC_{50} induzida pela AICIFt livre e lipossomal após a TFD (17Joules/cm²) é igual a 22.50 ± 0.33 e 1.35 ± 0.01 nM, respectivamente, mostrando que o veículo foi mais tóxico do que a AICIFt livre.

Fotossensibilizantes como a ftalocianina apresentam máxima absorção no espectro na denominada banda Q (600-690nm) o que permite uma maior penetração do FS nos tecidos. Esta característica faz da AICIFt um excelente composto ativo para ser internalizado pelas células alvo (MACDONALD & DOUGHERTHY, 2001). Demidova e Hamblin (2004) reportam um receptor classe A tipo “scavenger” que estaria envolvido na união macrófago-FS, isso poderia estar relacionado com a fototoxicidade da AICIFt +TFD sobre as células THP-1 como foi observado no trabalho independente da presença do cremofor e também teria influência na internalização celular do FS. A localização subcelular dos FS é importante para microrganismos intracelulares obrigatórios cuja localização dentro da célula pode ser citoplasmática (*T. cruzi*) ou nos compartimentos celulares (*Leishmania spp*). Desta forma, FS como porfirinas, derivados benzoporfirínicos, Fotofrin® e Foscan®, entre outros, são reportados por localizarem-se nos lisossomos, nas mitocôndrias, na membrana plasmática, no complexo de Golgi ou no retículo endoplasmático (CASTANO *et alii*, 2004). No caso da AICIFt a sua localização mostrou ser citoplasmática e mitocondrial em células THP-1 (VALDIVIESO, 2010).

A PM livre e a contida em NE, não induziu toxicidade celular (CC50>141.30nM).

É importante destacar que a toxicidade do cremofor foi baixa quando ele foi dissolvido >10 vezes, concentrações que não afetaram a atividade sobre o parasito, dado que sendo o sistema de NE diluído, a inibição parasitaria ainda foi observada (figura 11 e 14). Adicionalmente, nas diluições onde o cremofor não foi fototóxico (1:100), IS de 30.72, 1.60 e 1,55 foram calculados para os sistemas de NE de PM15%, AICIFt , AICIFt -PM15%, respetivamente.

Neste sentido, os sistemas de NE apresentam seletividade pela inibição do parasito na forma intracelular e não pela célula hospedeira.

A toxicidade *in vivo* da PM foi descrito por Kalantari e colaboradores (2014), esses autores reportaram que PM lipossomal não é tóxica para o fígado e rins de ratos Wistar.

A avaliação da genotoxicidade dos sistemas de NE foi realizada no modelo murino de camundongos Balb/c, pois este modelo já foi considerado como ideal para ensaios de genotoxicidade devido à susceptibilidade dos animais a substâncias com ação genotóxica (ARENCIBA *et alli*, 2011). Este método permite observar lesões criptogénicas nos cromossomas em um sistema vivo, os sistemas de NE e o veiculo não induziram a formação de micronúcleos na medula óssea dos camundongos Balb/c tratados; a percentagem de micronúcleos (0-0.3%) encontra-se dentro dos valores normais para estes animais (ARENCIBA *et alli*, 2003; 2011).

Adicionalmente, tendo em conta o efeito *in vitro* do cremofor nas células THP-1, foi avaliada a aparência da pele dos camundongos tratados topicamente

com os sistemas de NE e irradiados a fim de observar qualquer sinal de irritabilidade, vermelhidão ou laceração. Neste sentido, durante e depois de finalizado o tratamento, não foram observadas reações cutâneas nem mudanças no peso dos camundongos, o que se mostra interessante, pois poderia indicar que a nanoemulsão e as condições da terapia como tempo do tratamento, intensidade da irradiação, local anatômico da aplicação foram bem sucedidos mantendo a qualidade de vida dos animais.

Finalmente, foi realizado o hemograma dos camundongos a fim de conhecer possíveis alterações nos tipos celulares do sangue ou outros parâmetros sanguíneos. Parâmetros como hemoglobina, hematócrito e VCM (índice eritrocitário que reflete o tamanho dos eritrócitos, LEON *et alli*, 2011) foram encontrados com valores inferiores aos de referência; estes dados não teriam um valor diagnóstico significativo; Leon e colaboradores (2001) indicaram que estes parâmetros do sangue podem estar diminuídos com a idade em ratos Sprague dawley, o qual poderia se relacionar com os roedores.

No entanto, a diminuição no número de plaquetas em todos os camundongos examinados ($75000-370000x/mm^3$) foi observada (Tabela 6). Alteração na quantidade de plaquetas é conhecida como trombocitopenia, estas estruturas estão envolvidas no processo de coagulação do sangue, uma diminuição no número delas facilitaria uma hemorragia, formação de hematomas ou pontos vermelhos na pele. A trombocitopenia tem distintas causas: a) produção insuficiente b) destruição ou utilização c) distribuição ou armazenamento inadequados no organismo (rpto plaquetário), d) perda acelerada; e) menor frequência induzida por fármacos que tem capacidade de destruí-las ou

interromper o processo de geração das mesmas no organismo (DANIELETTO *et alli*, 2016; ARCILA *et alli*, 2010). Já foi reportado que alguns antibióticos como Vancomycin, Penicilina, Trimetoprim e Ripampicina, assim como o Alopurinol, o Diazepan, entre outros, podem causar trombocitopenia em pacientes (DANIELETTO *et alli*, 2016; GRANA *et alli*, 1995). Além disso, é importante ter em conta também que condições alimentares, ambiente, local e método de extração do sangue influenciam nos parâmetros hematológicos (BALKAYA *et alli*, 2001).

Em vista que todas as amostras de sangue analisadas mostraram as mesmas alterações, poder-se-ia sugerir que o tratamento com estes sistemas de NE e com o veículo estariam tendo algum efeito colateral sobre a série plaquetária; no entanto, na pele tratada dos camundongos não foi observado sinal de pontos vermelhos na pele ou hemorragia. A literatura menciona que pequenos animais apresentam agregação leucocitária dado que os leucócitos tem tendência a unir-se com as plaquetas, o qual se traduz em aumento da contagem de leucócitos e diminuição plaquetária (ARCILA *et alli*, 2010), isto poderia ser devido ao equipamento automatizado (citometria do fluxo) utilizado para fazer o hemograma que discrimina por tamanho mas não por células, de tal forma que estas análises devem ser feitos manualmente, no entanto, a agregação plaquetária é contundente como foi observado nos esfregaços de sangue analisados neste estudo. É sugerido que estes resultados devem confirmar-se realizando um seguimento do hemograma durante o tratamento.

8.1. INTRODUÇÃO

A manifestação clínica mais comum da LTA é a forma cutânea, isso permite pensar que os tratamentos tópicos devam ser os de primeira escolha, pois além de atingirem facilmente o local afetado, não provocam toxicidade sistêmica como o tratamento administrado via parenteral (GUY *et alli*, 1987; BOCXLAER *et alli*, 2016). Ressalta-se o fato de que o principal inconveniente dos cremes e géis utilizados para tratar topicamente a LC no Velho Mundo são principalmente a irritação e a dificuldade de permeação do fármaco na pele (SOTO *et alli*, 1998; SALAH *et alli*, 2013; JAMIL *et alli*, 2015; BOCXLAER *et alli*, 2016).

A pele é formada por duas camadas principais de células, uma mais interna, de origem mesodérmica - a derme, e uma mais externa, de origem ectodérmica - a epiderme. A derme é formada por tecido conjuntivo, rico em vasos sanguíneos, nervos, glândulas sebáceas e as sudoríferas (LIUZZI *et alli*, 2016). A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, cujas células estão dispostas em estratos sendo eles do mais profundo para o superficial: (a) o estrato basal – composto por células cilíndricas em intensa atividade mitótica que se diferenciam em queratinócitos; (b) o estrato espinhoso – constituído por quatro a seis camadas de queratinócitos; (c) o estrato granuloso – constituído de células cujo citoplasma contém grânulos de queratina-hialina; (d) estrato córneo – composto por queratinócitos achatados, mortos, anucleados e com o citoplasma repleto de queratina. Este último estrato é considerado uma barreira pouco permeável para o ambiente externo, tornando-se o principal obstáculo para a entrada de

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

substâncias para o interior do corpo (ROSS & PAWLINA, 2007; LIUZZI *et alli*, 2016). O veículo utilizado para transportar o fármaco de interesse deve ser capaz de ultrapassar essa barreira e alcançar o local de ação (ROSS & PAWLINA, 2007; LIUZZI *et alli*, 2016). Além disso, a que se considerar que a ação terapêutica de um determinado fármaco administrado topicamente vai depender, além do sistema de transporte do fármaco, do princípio ativo e da sua interação com a pele (FINNIN & MORGAN, 1999; BOCXLAER *et alli*, 2016).

A via transdérmica é uma forma de administração não invasiva de fármacos através da pele que permite a liberação sistêmica dos mesmos (BERNER & JOHN, 1994). A agressividade mínima na aplicação, com redução da dor no caso de uma injeção, a administração dirigida de fármacos e maior farmacocinética são algumas das vantagens descritas desta via (CEVC & VIERL, 2010; LIUZZI *et alli*, 2016). No entanto, um dos problemas ao se utilizar o tratamento transdérmico é a perda da eficiência dos fármacos, principalmente devido à barreira pouco permeável do estrato córneo (VILLARINO & LANDONI, 2006; ENGESLAND *et alli*, 2016). Portanto, deve-se ter em conta que a difusão passiva dos fármacos através da pele vai depender de vários fatores tais como do peso molecular inversamente proporcional ao coeficiente de permeação, do grau de solubilidade ou lipofilicidade do fármaco, do coeficiente de partição octanol/água que favorece a permeação (~ 2) e da integridade do estrato córneo, entre outras (ENGESLAND *et alli*, 2016). Outros autores descrevem que a absorção transdérmica de um fármaco exige o acesso da barreira da pele, o qual ocorre em diferentes passos: 1) da penetração do estrato córneo.

2) da permeação onde a molécula passa de um estrato ao outro e 3) da reabsorção ao alcançar a derme e do sistema vascular (LIUZZI *et alli*, 2016).

Com base no exposto, as nanoemulsões podem constituir importantes veículos carreadores de fármacos como foi descrito anteriormente dada sua estabilidade, rápida permeabilidade e facilidade de serem absorvidas pela pele (SONNEVILLE-AUBRUN *et alli*, 2004; GUTIÉRREZ *et alli*, 2008; LIUZZI *et alli*, 2016).

Assim, é importante avaliar a permeação e a retenção dos fármacos cuja via de aplicação é tópica a fim de predizer a absorção percutânea no homem. Os métodos de células de Franz e estrato córneo com fita são as técnicas mais utilizadas para predizer estes mecanismos e são recomendadas pelo Comité Científico da Segurança dos Consumidores e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico da Comissão Europeia (Ng *et alli*, 2010; LIUZZI *et alli*, 2016).

De esta maneira, neste trabalho foi avaliada a permeabilidade e a retenção *ex vivo* em pele de camundongos Balb/c, assim como a biodistribuição em um sistema vivo da AICIFt e da PM presente no sistema de NE.

8.2 METODOLOGÍA

8.2.1 Permeação do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo.

Para este ensaio colocou-se pele dorsal de camundongos tipo ICR entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz (ver Figura 18). A área

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

de difusão entre os compartimentos foi de 0.19635 cm². Assim, 300µL do sistema de NE foi colocado no compartimento doador e 3 mL de PBS/SDS 2% ou tampão triz (triz base, Na₂HPO₄, NaHPO₄) pH 7.8 foram adicionados a solução receptora para os sistemas de NE que contêm AICIFt e PM, respectivamente. A solução receptora foi mantida em temperatura de 32 °C com agitação constante (barra magnética) 600 rpm. As 0, 3, 6, 10 e 24 horas retirou-se 300 µL do compartimento receptor para determinar a concentração de AICIFt e/ou PM e o mesmo volume foi substituído por uma solução nova para o seguinte tempo de amostragem. A quantidade de AICIFt e/ou PM que foi capaz de permear a pele foi determinada fluorometricamente e por HPLC, respectivamente, e expressa em µM/cm².

Além disso, a taxa de aumento da permeação dos compostos presentes nos sistemas de NE e livres (solvente PBS) foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$TA = \frac{\text{massa/área média do composto presente no sistema de NE}}{\text{Massa/área média do composto livre (PBS)}}$$

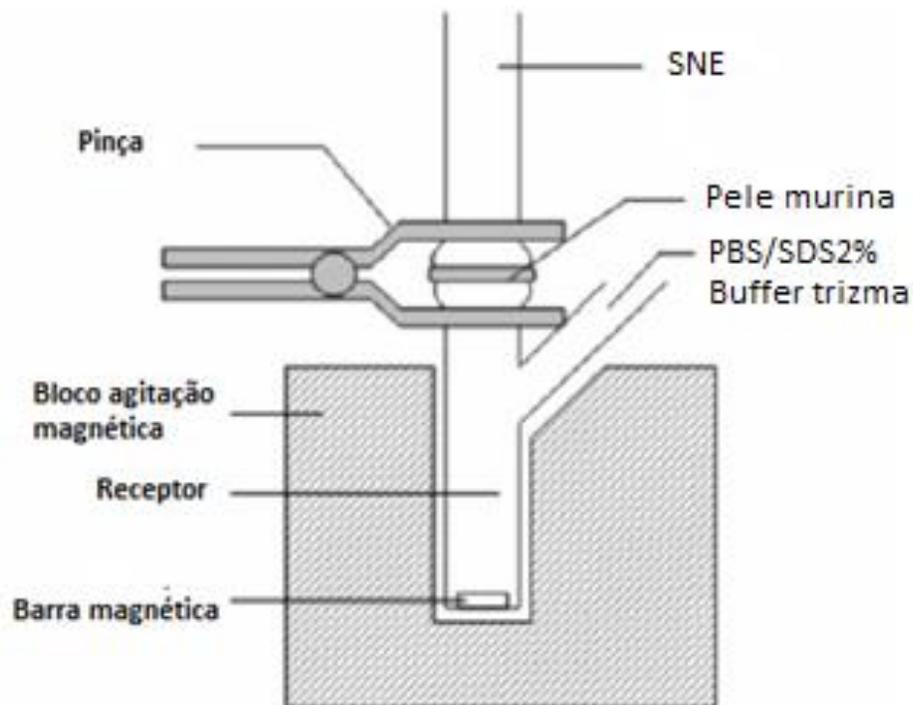


Figura 19. Modelo da célula de Franz utilizado para a avaliação da permeabilidade *ex vivo* da PM e AICIFt livre e em nanoemulsão. Área de difusão 0.19635 cm². SNE: sistema de nanoemulsão (compartimento doador). Fonte: Modificado de Ng S-F *et alli*, 2011.

8.2.2 Retenção do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo

Ao final do ensaio de permeação a pele foi completamente removida das células de Franz, a superfície foi lavada cuidadosamente com solução salina para o início do ensaio de retenção por meio do tratamento da pele exposta ao sistema de NE com fitas adesivas para remover o estrato córneo (*tape stripping*, escrito em inglês). A pele foi fixada sobre uma superfície plana e 15 pedaços de fitas adesivas (Scotch Magic 3M,USA) foram colocados individualmente durante 30 segundos com a ajuda de um peso de 519,5 gr sobre a área de difusão para remover o estrato córneo. Para extrair a AICIFt e a PM das fitas foi adicionado 3mL de etanol e tampão triz, respectivamente. A

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

pele remanescente foi cortada em pedaços e macerada com os solventes extratores acima mencionados.

8.2.3 Ensaio de biodistribuição in vivo Retenção do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo presente nos sistemas de NE

Camundongos Balb/c fêmeas com 10 semanas de idade foram adquiridos do Instituto Nacional da Saúde, Bogotá Colômbia. Dois dias antes do início do tratamento, os animais foram tricotomizados na base da cauda. Para tal, quatro grupos experimentais de três camundongos cada um foram organizados da seguinte maneira: Grupo 1: NE AICIFt + TFD; Grupo 2: NE AICIFt-PM15% + TFD; Grupo 3: NE PM15%; Grupo 4: Veículo. O tratamento foi aplicado durante 15 dias, sendo administrado nos dias 4, 7, 11 e 15. Seis dias após o término do tratamento os animais foram sacrificados (anestesia e deslocamento) e o fígado, o baço, os rim e a pele tratada foi extraídos para a posterior quantificação da AICIFt e PM.

8.2.4 Quantificação do Fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina e do antibiótico Paromomicina em pele murina: ensaio ex vivo

Para este ensaio 20-25 mg de cada órgão foram dissolvidas em 3mL de solvente extrator (etanol absoluto, DMSO, ácido acético) para o caso da AICIFt e em 500mL de tampão triz para quantificar a PM. A sonicação foi realizada durante 1 minuto, duas vezes. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10min a 10000 rpm, quando então os sobrenadantes foram extraídos. A concentração da AICIFt e da PM foi determinada por espectrofluorometria e HPLC como descrito no capítulo 5.

8.2.5 Análises estatísticas

Para determinar a permeabilidade e a retenção dos princípios ativos presentes nos sistemas de NE os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA)

Adicionalmente, o teste de Kruskal Wallis para amostras independentes foi utilizado para analisar a biodistribuição da PM nos diferentes órgãos, as diferentes comparações múltiplas foram determinadas usando o teste de U de Whitney. Estas análises foram realizadas com um intervalo de confiança de 95% utilizando o software SPSS 15.0 para Windows. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A percentagem da dose aplicada da PM foi determinada tendo em conta a dose encontrada nos órgãos extraídos: dose aplicada / dose final * 100.

8.3. RESULTADOS

A AICIFt não foi capaz de permear a pele quando contida nos sistema de NE nem quando estava livre dissolvida em DMSO.

O resultado de permeação ex vive da PM contidas nos sistemas de NE e dos compostos livres na pele de camundongos em diferentes intervalos de tempo está ilustrado na Figura 19.

Nessa figura observa-se que a permeação da PM presente nos sistemas de NE ocorreu a partir das três horas de início do ensaio e que a PM livre iniciou sua permeação logo depois de seis horas.

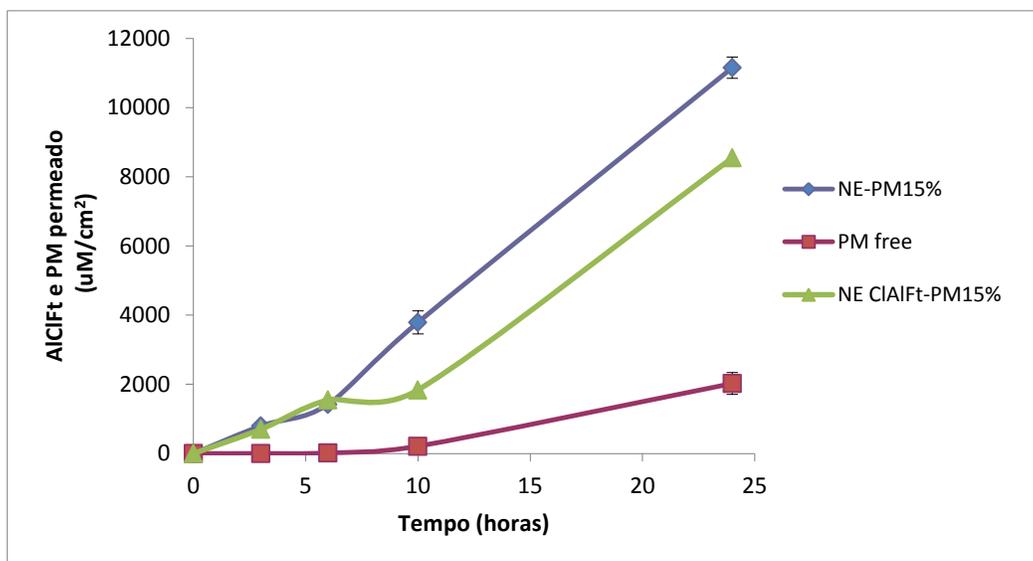


Figura 20. Permeação ex vivo do antibiótico Paromomicina (PM) em sistemas de NE e livre dissolvida no PBS em pele murina. Os resultados são a média e desvio padrão de três experimentos.

A Tabela 8 mostra a taxa de permeação da PM para ambos os sistemas de NE (NE-PM15% e NE AICIFt/PM15%). Os resultados indicam que a PM no sistema de NE é capaz de permear a pele murina logo depois de 24 horas até 4 a 5 vezes mais do que quando dissolvida em PBS. Além disso, observa-se nessa mesma tabela que a taxa de permeação de PM é maior quando a mesma está no sistema de NE de PM15% do que quando no sistema de NE combinado (NE AICIFt -PM15%, $p=0.001$). A quantidade de PM permeada em ambos os sistemas de NE foi, respectivamente, 13 e 17 vezes menor à PM inicial presente nos sistemas de NE.

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

Tabela 8. Permeação de Paromomicina contida em sistemas de nanoemulsão em pele murina utilizando o sistema de células de Franz. Os resultados são a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Tempo (horas)	PM ($\mu\text{m}/\text{cm}^2 \pm \text{DS}$)			RA	
	NE-PM15%	PM 15%	NE-AICIFt-PM 15%	(NE-PM15%)	(NE- AICIFt PM15%)
0	-	-	-	ND	ND
3	796.14 \pm 63.9	-	700.03 \pm 48.50	ND	ND
6	1422.02 \pm 112.88	17.87 \pm 6.05	1546.74 \pm 42.25	79.54	86.52
10	3790.36 \pm 334.53	212.12 \pm 44.18	1838.16 \pm 82.24	17.86	8.66
24	11152.5 \pm 303.60	2023.83 \pm 315.93	8544.31 \pm 1039.26	5.51	4.22

PM: Paromomicina; AICIFt: Alumínio-Cloro-Ftalocianina; ND: não determinado; RA: ratio de aumento da permeação.

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

A Figura 20 ilustra os resultados da retenção dos compostos na pele dos camundongos. Nessa figura observa-se que a PM ficou mais retida na derme comparada a estrato córneo em ambos os sistemas de NE ($p < 0.05$). A quantidade de PM retida no estrato córneo foi maior quando esta estava contida no sistema de NE combinado ($p < 0.001^*$) comparado ao sistema de NE de PM15%. No entanto, a retenção de PM na derme foi NE-PM15% > NE-PcPM15% > PM livre ($p < 0.001^{**}$). A PM diluída em PBS ficou mais retida nas primeiras camadas do estrato córneo como observado na Figura 17, sugerindo que grande parte da PM não é capaz de atravessar o estrato córneo e o composto poderia ficar na solução remanescente na câmara doadora.

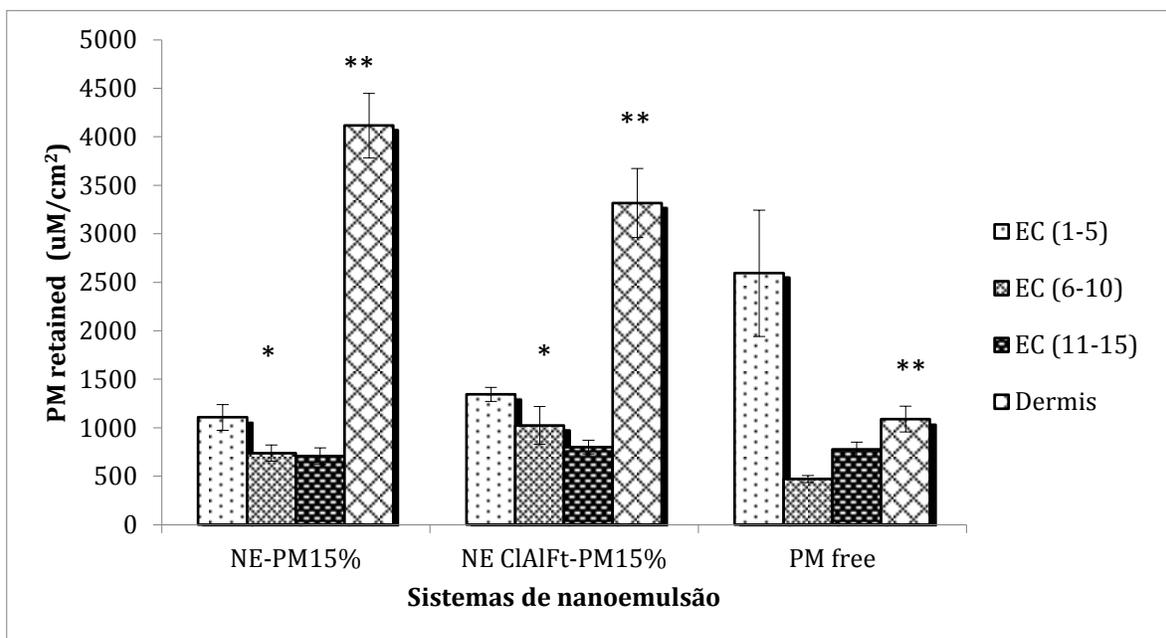


Figura 21. Retenção no estrato córneo (EC) e na derme de camundongos ICR do antibiótico Paromomicina (PM) em sistemas de NE e livre dissolvida no PBS, um ensaio *ex vivo*. Os resultados são a média e desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0.001$ em relação à quantidade de PM retida no EC; ** $p < 0.001$ PM nos sistemas de nanoemulsão principalmente retida na derme quanto a PM livre.

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

Por outro lado, a retenção de AICIFt (Figura 21) foi maior no estrato córneo, sendo a ordem de concentração igual a AICIFt livre>NE-AICIPc>NE-PcPM15% ($p<0.0001^*$), indicando provavelmente a incapacidade de este fotossensibilizador em atravessar a epiderme quando diluído em DMSO, dado que grande parte da AICIFt encontrava-se no compartimento doador da célula de Franz. A maioria da AICIFt que permeou a pele ficou retida nas camadas mais externas do estrato córneo. Quando contida no sistema de NE, a retenção da AICIFt foi maior no estrato córneo quando no sistema combinado (NE-PcPM15%) comparado com o sistema de NE-AICIPc. A retenção de AICIPc na derme foi NE-AICIPc>NE-PcPM15%>AICIPc livre ($p<0.0001$), o qual poderia mostrar a eficiência do sistema de NE para facilitar a penetração da AICIPc no tecido. No entanto, não existiu passagem transdérmico deste composto até às 24 horas do ensaio.

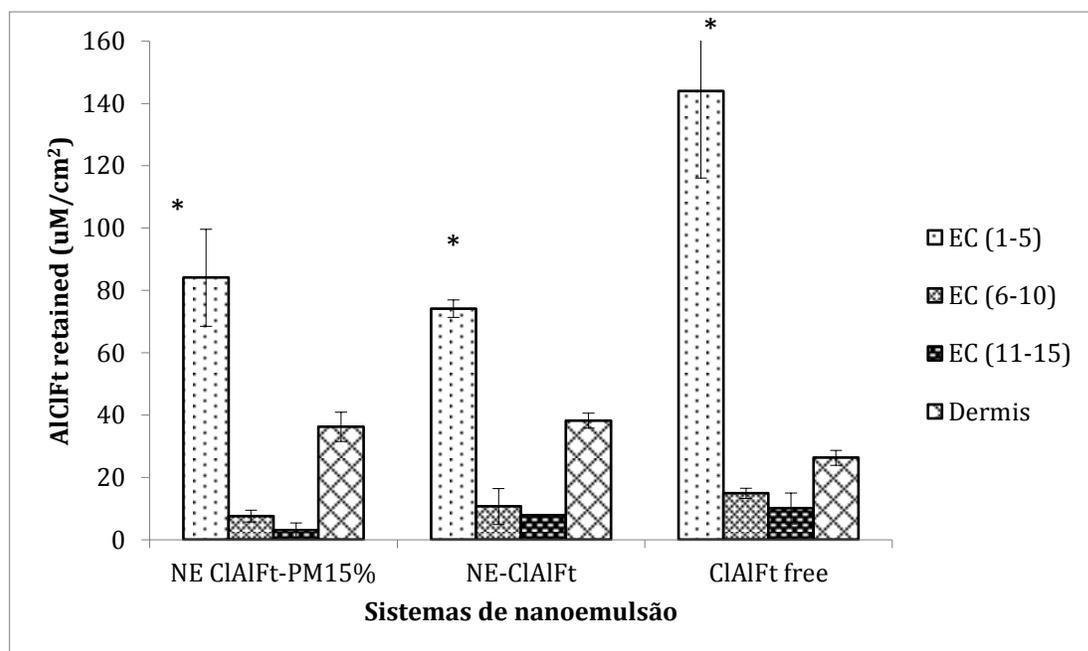


Figura 22. Retenção no estrato córneo (EC) e na derme de camundongos ICR do AICIFt em sistemas de NE e livre dissolvida no DMSO, um ensaio *ex vivo*. Os resultados são a média e desvio padrão de três experimentos independentes ** $p<0.001$.

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

A distribuição da AICIFt e da PM *in vivo* em órgãos de camundongos Balb/c saudáveis foi determinada seis dias após o término do tratamento com os sistemas de NE. A AICIFt Não foi detectada em nenhum dos órgãos extraídos. Os resultados da biodistribuição da PM estão mostrados na Figura 22. Nela observa-se que a concentração de PM detectada nos diferentes órgãos variou de 27.26 a 292.49 μM . A PM acumulou mais no baço dos camundongos quanto estava no nanossistema combinado (NE-AICIPc/PM15%, $p=0.004$). Quando se encontrava no sistema NE-PM15% o acúmulo de PM foi igual nos diferentes órgãos ($p=0.33$). No entanto, a concentração da PM no baço dos camundongos tratados com o nanossistema combinado é maior do que a detectada no rim e pele dos animais tratados com NE-PM15% ($p=0.004$); assim mesmo, foi evidenciada maior acúmulo da PM no rim dos camundongos tratados com NE-PM15% do que no rim e na pele dos animais tratados com NE-AICIPc/PM no ($p=0.025$) (Figura 22).

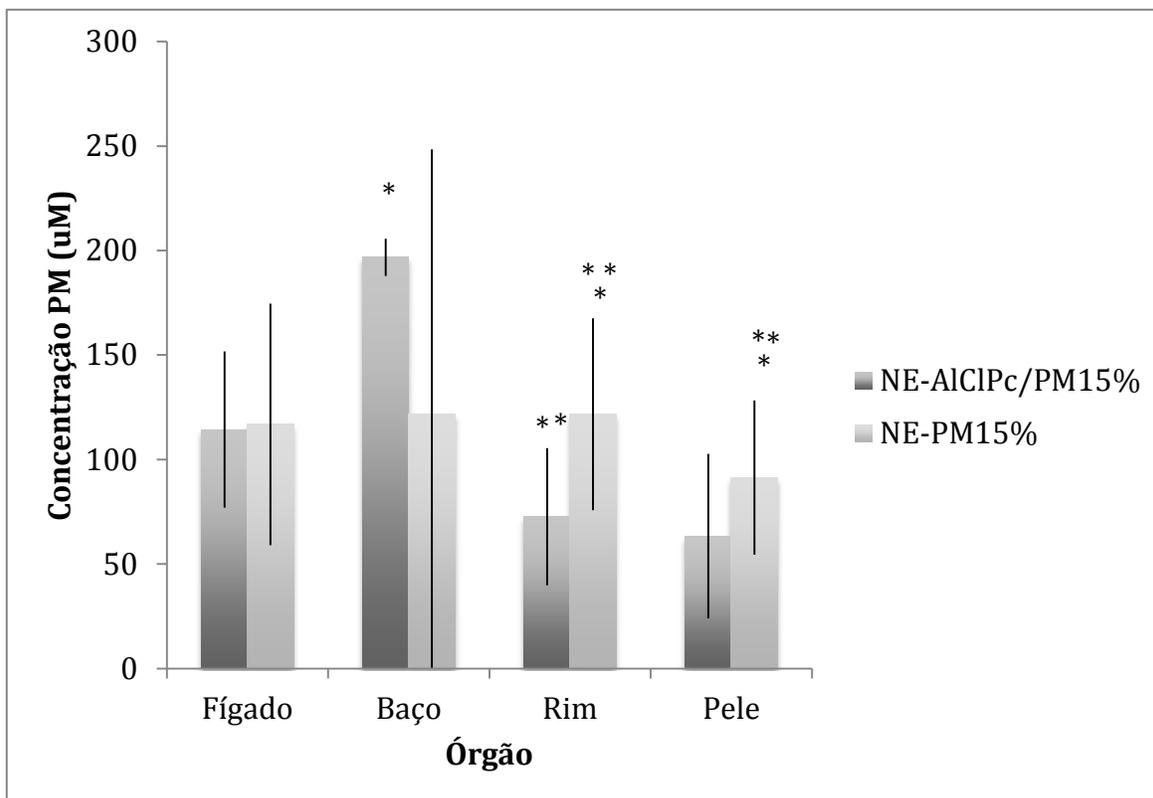


Figura 23. Biodistribuição da Paramomicina em órgãos de camundongos Balb/c tratados topicamente com os sistemas de nanoemulsão. * $p=0.004$ A PM foi determinada principalmente no baço quanto os outros órgãos, ** $p=0.025$ A quantidade de PM encontrada nos rins e na pele foi similar.

8.4 DISCUSSÃO

A pele é considerada a principal barreira entre o corpo e o meio externo (ENGESLAND *et alli*, 2016), pois o estrato córneo da epiderme é pouco permeável uma vez que o citoplasma das células apresenta-se repleto de queratina. Estas características fazem com que a epiderme exerça papel importante na permeabilidade ou penetrabilidade das drogas de aplicação tópica (LIUZZI *et alli*, 2015).

As nanoemulsões têm sido reportadas na literatura como excelentes veículos de fármacos para aplicação transdérmica; elas são usadas em

cosméticos para cuidados pessoais, na liberação transdérmica de fármacos como o Imipramide e o Doxepin com fins anestésicos e antialodínicos, no transporte de fitofármacos, lecitina, ketoprofeno, entre outros (HOELLER *et alli*, 2009; SAKEENA *et alli*, 2010; LU *et alli*, 2014).

Neste estudo a AICIFt não foi capaz de permear *ex vivo* e nem *in vivo* a derme de camundongos Balb/c, ela ficou retida no estrato córneo da epiderme. Resultados similares foram obtidos em estudos de permeação da AICIFt em pele dorsal de rato Wistar e pele abdominal humana por Ospina e Rico seus respectivos colaboradores em 2013. Eles prepararam por técnicas de alta energia (ultrasonicação) uma NE de AICIFt, os resultados mostraram que esse FS não penetra na derme quando empregado topicamente, ele retido no estrato córneo da epiderme. Além disso, os autores não observaram alterações histopatológicas na pele.

Nesse contexto e tendo em conta que na derme é onde se encontram os macrófagos colonizados pelo parasito (CUNNINGHAM, 2001) e sabendo que os FS de segunda geração como a AICIFt após da TFD é absorvida entre 600-690nm o qual permite uma máxima penetração nos tecidos (MACDONALD & DOUGHERTY, 2001), os resultados obtidos nesta tese são importantes para conseguir ter um efeito local na lesão sem toxicidade sistêmica possivelmente; além, a lipofilicidade ($\log P$ 7.3) e o peso molecular (574.96 g/ml) da AICIFt faz com que ela permaneça no estrato córneo e não permeie até estratos inferiores hidrofílicos (AKILOV *et alli*, 2006). Ainda, a derme e epiderme nas lesões da LC

encontra-se destruído (BOCXLAER *et alli*, 2016), assim, o acesso da AICIFt até o alvo de ação poderia ser mais simples.

Por outro lado, tal como foi descrito ao longo deste documento, um dos inconvenientes do tratamento com PM para a LC é a sua dificuldade em penetrar na pele, tendo assim sua efetividade variável, (RAVIS *et alli*, 2013). Esta droga só não é absorvida oralmente por isso não deve ser administrada parentalmente, além disso, ela não é capaz de atravessar a pele (RAVIS *et alli*, 2013). Por isso, veículos como cremes, pomadas, géis, lipossomas, nanopartículas de PM, entre outras, tem sido testados e se mostrado efetivos (SALAH *et alli*, 2013; MORAIS-TEXEIRA *et alli*, 2014; HEIDARI-KHARAJ *et alli*, 2016; JAAFARI *et alli*, 2009). Do mesmo modo, a AICIFt, apesar de ser uma molécula lipofílica, precisa de um veículo para ser aplicada em modelos *in vivo* e conseguir alcançar o alvo terapêutico (AKILOV *et alli*, 2006; MUEHLMANN *et alli*, 2015). Desta forma é necessário um veículo que permita a boa interação entre a pele e os compostos ativos.

Os resultados mostrados neste estudo mostram melhor permeação da PM em NE (até 17.8 vezes mais) do que quando em solução após das 10 horas. Além disso, foi observado permeação desse fármaco a partir das 3 horas do tratamento da pele saudável de camundongo (Tabela 8). Por conseguinte, se observou que a PM em NE foi mais retida na derme do que no estrato córneo. Ferreira e colaboradores (2004) avaliaram a permeação e a retenção na pele saudável de camundongos e pele sem estrato córneo de PM contida em lipossomas, eles observaram baixa permeabilidade da PM lipossomal (0.2-1.5% da dose aplicada)

Avaliação da permeabilidade, retenção ex vivo e biodistribuição in vivo dos sistemas de nanoemulsão

na pele saudável após de 10 horas e uma retenção entre 3.3- 3.5%. No entanto, a quantidade da PM foi três vezes maior quanto se encontrava em solução. Na pele sem estrato córneo, a permeação foi maior do que na pele saudável, mas menor quando em solução (71.6-74.9% PM lipossomal versus 91.5% PM em solução). Do mesmo modo, a difusão em membranas sintéticas (metilcelulosa, nylon e polissulfona) de nanogel de PM foi reportada por Brugués e colaboradores (2015), esses autores observaram que todas as membranas permitiram a difusão da PM logo depois de 1.5 h e que a difusão foi de 100 e 84% para as membranas de nylon e metilcelulosa, respectivamente; 70% de difusão foram observadas após das seis horas com a membrana de polissulfona, não foi observada permeação na pele de camundongo e orelha de porco.

No ensaio *in vivo*, foram encontrados nos órgãos removidos concentrações entre 27.26 -292.49 μ M de PM nos animais tratados com os sistemas de NE, corroborando os resultados de permeação desta droga obtidos nos órgãos alvo da *Leishmania spp* no caso do baço, fígado e pele. Este resultado é interessante para avaliar este sistema de NE em camundongos infectados com *L. braziliensis*, desta forma, a liberação transdérmica da PM poderia considerar-se exitosa, por tanto, é importante conhecer o efeito sobre o parasito *in vivo* a fim de saber se a quantidade da PM permeada é suficiente para ter um efeito antiparasitário. Resultados similares da biodistribuição da PM em camundongos Balb/c saudáveis foram obtidos por Gaspar e colaboradores (2015) quando avaliaram a biodistribuição da PM encapsulada em diferentes tipos de lipossomas e aplicada intravenosamente. Os autores mostraram acúmulo de PM de até 10% da dose

injetada no baço, no fígado e nos pulmões; quando a PM era encapsulada em lipossomas de polietilenglicol (PEG) 24 horas depois de injetado permaneceu no sangue e nos pulmões. Estes resultados tiveram um efeito terapêutico melhor em modelo murino infectado por *L. infantum*.

A PM também foi encontrada no rim dos camundongos, o que sugere que a eliminação da droga esta ocorrendo por esta via. De acordo com a literatura a PM é eliminada pelos rins sem ser metabolizada, este último poderia estar causando toxicidade (RAVIS *et alli*, 2013). Entretanto, é necessário realizar estudos de toxicidade renal e de farmacocinética para mostrar essa toxicidade. Com o uso de um sistema de NE para veicular a AICIFt e a PM pretende-se obter um efeito transdérmico ao executar a aplicação, desta forma, esperava-se que ao testar duas substâncias na mesma nanoformulação a AICIFt mostraria um efeito local com a utilização de terapia fotodinâmica e a PM um efeito sistêmico, de modo a otimizar o tratamento tópico para a LTA e alcançar o parasito tanto na derme, onde estão os macrófagos infectados, quanto nos órgãos do sistemas reticulo endotelial (alvo do parasito) (CUNNINGHAM, 2001). Por conseguinte, os resultados apresentados demonstram que este sistema de NE desenvolvido é ideal para o transporte destes dois compostos, pois permitiu a permeabilidade e a retenção *ex vivo* e *in vivo* da PM e AICIFt, respetivamente, e a forma de aplicação tópica não invasiva e sem dor é uma vantagem. Por tanto, sugere-se estes nanosistemas como uma boa estratégia para ser usados em modelos *in vivo* da LTA.

- O interesse no desenvolvimento de um tratamento ideal para a LTA, uma doença de alto impacto na saúde pública de diversos países, mas negligenciada pela indústria farmacêutica, originou este estudo. Desta forma, com os resultados obtidos neste trabalho devem contribuir na geração de novo conhecimento mediante o aporte de uma nova estratégia para o tratamento desta doença, ressalta-se que este é o primeiro estudo que utiliza a Alumínio-Cloro-Ftalocianina e o antibiótico Paromomicina veiculados em uma mesma nanoemulsão a serem utilizados no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana por meio de Terapia Fotodinâmica.
- Por métodos de baixa energia foi preparada uma nanoemulsão com Alumínio-Cloro-Ftalocianina e o antibiótico Paromomicina. Este sistema de nanoemulsão, assim como os preparados com as drogas independentes e o veículo mostraram tamanhos de nanogotículas pequenos com DH <30nm, monodispersas e com carga negativa perto de zero. Além disso, esses nanosistemas mostraram ser estáveis contra a agregação e precipitação durante quatro meses e a NE-AICIPc durante 14 meses.
- O fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina manteve as suas propriedades fotofísicas após ser incorporado no sistema de nanoemulsão, mostrando máxima absorção a 673nm e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio. Além da estabilidade quanto à concentração de AICIPc e PM nos nanosistemas após de quatro meses foi demonstrada.

- Os nanossistemas mostraram atividade leishmanicida *in vitro* contra as formas extracelulares e intracelulares da *L. braziliensis*; espécie altamente prevalente no Brasil e responsável por causar manifestações de tipo mucocutâneo. Inibição de 100 e >92% do crescimento do parasito após do tratamento com o sistema combinado e TFD foi determinado em promastigotas e amastigotas intracelulares, respetivamente.
- A avaliação da toxicidade do tratamento neste estudo é importante neste tipo de modelo experimental da Leishmaniose, dada sua condição de ser causada por um parasito intracelular obrigatório. Desta forma, neste estudo foi observada uma parcial seletividade *in vitro* (IS >1.5) dos nanossistemas pelo parasito e não pela célula hospedeira (macrófago THP-1). Adicionalmente, no modelo murino, os camundongos tratados com sistemas de NE não evidenciaram sinais de irritabilidade, vermelhidão, laceração no local da aplicação do tratamento (base da cauda), o tratamento não afetou o peso dos camundongos, os tipos celulares do sangue, nem induziu micronúcleos nos eritrócitos policromatófilos como evidência da genotoxicidade *in vivo*.
- O fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianina em nanoemulsão não permeou, *ex vivo*, a pele dos camundongos Balb/c, foi retida na derme e no estrato córneo da epiderme. Já, o antibiótico Paromomicina foi capaz de permear a pele dos animais, embora uma pequena quantidade tenha ficado retida na derme e no estrato córneo da epiderme.
- Após seis dias do fim do tratamento, o antibiótico Paromomicina foi detectado em órgãos do sistema reticulo endotelial (Baço e Fígado), rim e

pele de camundongos Balb/c. O fotossensibilizante Alumínio-Cloro-Ftalocianine não foi observada em nenhum dos órgãos. Neste contexto, poderia se sugerir que o uso combinado do FS e a PM em uma mesma NE + TFD poderiam exercer um efeito local e sistêmico ao mesmo tempo, aumentando possivelmente a efetividade do tratamento contra o parasito. Este sistema poderia ser utilizado no modelo murino de LTA.

- Finalmente, este estudo propôs um tratamento promissor que poderia ser usado para a Leishmaniose com vantagens como estabilidade do nanosistema, baixa toxicidade, efetividade leishmanicida, aplicação tópica indolor, simples e tratamento de curto prazo. No entanto, é importante notar que a experimentação *in vivo* tanto contra o modelo da LTA como outros testes de toxicidade devem ser realizados.

- AKILOV OE, KOSAKA S, O'RIORDAN K, SONG X, SHERWOOD M, FLOTTE TJ, FOLEY JW, HASAN T. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. **Chem Biol.** v. 13, n. 8, p. 839-847, 2006.
- AKILOV OE, KOSAKA S, O'RIORDAN K, HASAN T. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. **Exp Dermatol.** v. 16, p. 651-660, 2007a.
- AKILOV OE, KOSAKA S, O'RIORDAN K, HASAN T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. **Photochem Photobiol Sci.** v. 6. p. 1067-1075, 2007b.
- ALVING CR, STECKT EA, CHAPMAN WL, WAITS VB, HENDRICKST LD, SWARTZ GM, HANSONT WL. Therapy of leishmaniasis: Superior efficacies of liposome encapsulated drugs. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA.** v. 75, n. 6, p. 2959-2963, 1978
- ANTON N, VANDAMME TF. The universality of low-energy nano-emulsification. **Int J Pharm.** V. 377, p. 142-147, 2009.
- ARANA BA, MENDOZA CE, RIZZO NR, KROEGER A. Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** vol. 65, n. 5, p. 466-470, 2001.
- ARCILA VH, CONDE CA, NIETO JE, GARCIA FH. Comparison of hematology reference values of strain wistar/UIS (*Rattus norvegicus*) with parameters established in standards laboratories. **Revista spei domus.** v. 6, n. 12, p. 45-51, 2010.
- ARENCIBIA DA, ROSARIO LA, RODRIGUEZ Y, LÓPEZ Y, DÍAZ D. Frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones NMRI y Balb-C de ambos sexos. **Revista de toxicología en línea,** p. 8-22, 2013.
- ARENCIBIA DF, VIDAL A, ROSARIO LA, SUÁREZ YE, DELGADO L. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. **VacciMonitor.** v. 20, n. 1, p. 28-33, 2011.

- AREVALO I, TULLIANO G, QUISPE A, SPAETH G, MATLASHEWSKI G, LLANOS-CUENTAS A, POLLACK H. Role of Imiquimod and Parenteral Meglumine Antimoniate in the Initial Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Clin Infect Dis.** v. 44, p. 1549–1554, 2007.
- ARMIJOS RX, WEIGEL MM, CALVOPIÑA M, MANCHENO M, RODRIGUEZ R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica.** v. 91, p. 153-160, 2004.
- ARORA S, RAJWADE JM, PAKNIKAR KM. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 258, p. 151–165, 2012.
- ASILIAN A, DAVAMI M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. **Clin Exp Dermatol.** v. 31, p. 634-637, 2006.
- BALKAYA M, VOYVODA H, ÜNSAL C, ÇELER H. Some hematological and biochemical characteristics of male and female Sprague-Dawley rats. Disponible en: <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2001-1/Makale-5.pdf>, 2001.
- BAPTISTA MS AND WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malária, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Braz J Med Biol Res.** v. 41, p. 44: 1-10, 2011.
- BARBERIS F, VÉLEZ ID. Opciones terapéuticas para el manejo de la Leishmaniasis cutánea americana. **Rev Panam Infectol.** v. 16, n. 2, p. 113-123, 2014.
- BERMAN JD, HANSON WL, CHAPMAN WL, ALVING CR, LOPEZ-BERESTEIN G. Antileishmanial activity of liposome-encapsulated amphotericin B in hamsters and monkeys. **Antimicrob Angents Chemother.** v. 30, n. 6, p. 847-851, 1986.
- BERN C, ADLER-MOORE J, BERENQUER J, BOELAERT M, DEN BOER M, DAVIDSON RN, FIGUERAS C, GRADONI L, KAFETZIS DA, RITMEIJER K, ROSENTHAL E, ROYCE C, RUSSO R, SUNDAR S, ALVAR J. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clin Infect Dis.** v. 43, n. 7, p. 917-924, 2006.
- BERNER B E JOHN BA. Pharmacokinetic Characterisation of Transdermal Delivery Systems. **Clin. Pharmacokinet.** v. 26, n. 2, p. 121-134, 1994

- BORBOREMA SET, SCHWENDENERB RA, JUNIOR JAO, DE ANDRADE JUNIORD HF, DO NASCIMENTO N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (*Leishmania*) major-infected macrophages. **Int J Antimicrob Ag**. v. 38, p. 341– 347, 2011.
- BOCXLAER KV, YARDLEY V, MURDAN S, CROFT SL. Drug permeation and barrier damage in *Leishmania*-infected mouse skin. **J Antimicrob Chemother**. doi:10.1093/jac/dkw012, 2016.
- BLUM J, DESJEUX P, SCHWARTZ E, BECK B, HATZ C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **J Antimicrob Chemother**. v. 53, p. 158–166, 2004
- BRUGUÉS AP, NAVEROS BC, CALPENA CAMPMANY AC, PASTOR PH, SALADRIGAS RF, LIZANDRA CR. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped in stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. **Nanomedicine**. v. 10, n. 2, p. 227-240, 2015.
- CALORI IR, TEDESCO AC. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride- formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. **J Photochem Photobiol B**. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.050. 2016.
- CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN M. Mechanism in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v. 1, p. 279-293, 2004
- CARVALHO FS, WENCESLAU AA, ALBUQUERQUE GR, MUNHOZ AD, GROSS E, CARNEIRO PLS, OLIVEIRA HC, ROCHA JM, SANTOS IA, REZENDE RP. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. **Genet Mol Res**. V. 14 (4), p. 12062-12073, 2015.
- CHAPMAN WL, HANSON WL, ALVING CR, HENDRICKS LD. Antileishmanial activity of liposome encapsulated meglumine antimoniate in the dog. **Am J Vet Res**. v. 45, n. 5, p. 1028-1030, 1984.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), Parasite *Leishmania*. Page last reviewed: November 2, 2015.
- CEVC G, VIERL U. Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. **J Control Release**. v. 141, p. 141: 277–299, 2010.

- CROFT SL, SEIFERT K, YARDLEY V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res.** v. 123, p. 399-410, 2006.
- CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev,** v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.
- CUADROS-MORENO A, CASAÑAS R, SAN MARTÍN-MARTÍNEZ E, YAÑES J. Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Lat. Am. J. Phys. Educ.* v. 8, n. 4, 2014.
- CUNNINGHAM AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Exp Mol Pathol.** v. 72, p. 132-141, 2002.
- DANIELETTO CF, FERREIRA GZ, FARAH GJ, CUMAN RK. Vancomycin-induced thrombocytopenia: a rare adverse effect in a patient -submitted to bone graft in the jaw. **Spec Care Dentist.** doi: 10.1111/scd.12182, 2016.
- DAVINSON RN, DE MARTINO L, GRANDONI R, GIACCHINO R, GAETA GB, PEMPINELLO R, SCOTTI S, CASCIO A, CASTAGNOLA E, MAISTO A, GRAMICCIA M, DICAPPRIO D, WILKINSON RJ, BRYCESON ADM. Short course treatment of visceral leishmaniasis with liposomal amphotericin B (Ambisome). **Clin Infect Dis.** v. 22, p. 938-943, 1996.
- DE LUCA PM, MACEDO AB. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Front Immunol.** v. 7, n 151. doi: 10.3389/fimmu.2016.00151.
- DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. Macrophage-targeted photodynamic therapy. **Int J Immunopathol Pharmacol.** v. 17, n. 2, p.117-26, 2004.
- DE MORAES M, DE VASCONCELOS RC, MUELHMANN LA, DE ACEVEDO RB, LEMOS TM, COSTA ADE L. Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 12, n. 4, p. 592-597, 2015.
- DE MORAIS-TEIXEIRA E, KOLOS M, FONSECA L, ROMANHA AJ AND RABELLO A. In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World Leishmania species. **J Antimicrob Chemother.** v. 69, p. 150-154, 2014.
- DE OLIVEIRA CI, TEXEIRA MJ, GOMES R, BARRAL A, BRODSKYN C. Animal models for infectious disease caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discov Today Dis Models.** v. 1, n. 1, p. 81-86, 2004.
- DOLAT E, RAJABI O, SALARABADI SS, YADEGARI-DEHKORDI S, SAZGARNIA A. Silver nanoparticles and electroporation: Their

- combinational effect on *Leishmania major*. **Bioelectromagnetics**. v. 36, n. 8, p. 586-596, 2015.
- DORLO T, BALASEGARAM M, BEIJNEN JH, DE VRIES PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemoth**. doi:10.1093/jac/dks275.
- DUTTA S, RAY D, KOLLI BK, CHANG KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49, n. 11, p. 4474-4484, 2005.
- DUTTA S, WAKI K, POO CHANG K. Combinational Sensitization of *Leishmania* with Uroporphyrin and Aluminum Phthalocyanine Synergistically Enhances their Photodynamic Inactivation in vitro and in vivo. **Photochem Photobiol**. v. 88, n. 3, p. 620–625, 2012.
- DURAND R, PAUL M, RIVOLLET D, FESSI H, HOUIN R, ASHER A, DENIAU M. Activity of pentamidine-loaded poly (D,L-lactide) nanoparticles against *Leishmania infantum* in a murine model. **Parasite**. v. 4, n. 4, p. 331-336, 1997a.
- DURAND R, PAUL M, RIVOLLET D, HOUIN R, ASTIER A, DENIAU M. Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. **Int J Parasitol**. v. 27, n. 11, p. 1361-1367, 1997b.
- EL-ON J, JACOBS GP, WITZTUM E, GREENBLATT CL. Development of tropical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. **Antimicrob agents chem**. v. 25, n. 5, p. 745-751, 1984.
- EL-ON J, CAWICH F, EVANS DA, WEINRAUCH L. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis in Belize: in vitro and in vivo studies with *Leishmania mexicana*. **Int J Parasitol**. v. 23, n. 1, p. 121-127, 1993.
- ERNSTING MJ, MURAKAMI M, ROY A, DAR-LI S. Factor controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **J Control Release**. v. 172, n. 3, p. 782-794, 2013.
- ENGESLAND A, ŠKALKO-BASNET N, FLATEN GE. In vitro models to estimate drug penetration through the compromised stratum corneum barrier. **Drug Dev Ind Pharm**. Doi: 10.3109/03639045.2016.1171334, 2016.

- ESCOBAR P, HERNÁNDEZ IP, RUEDA CM, MARTÍNEZ F, PÁEZ E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. **Biomédica**. v. 26, n. 1, p. 49-56, 2006.
- FAGHIHI G, TAVAKOLI-KIA R. Treatment of cutaneous leishmaniasis with either topical paromomycin or intralesional meglumine antimoniate. **Clin Exp Dermatol**. v 28, p. 13-16, 2003.
- FELIU N, FADEEL B. Nanotoxicology: no small matter. **Nanoscale**. v. 2, p. 2514–2520, 2010.
- FINNIN BC, MORGAN TM. Transdermal Penetration Enhancers: Applications, Limitations, and Potential. **J. Pharm. Sci**. v. 88, n. 10, p. 955-958, 1999.
- FERREIRA LS, RAMALDES GA, NUNAN EA, FERREIRA LA. In vitro skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis. **Drug Dev Ind Pharm**. v. 30, n. 3, p. 289-96, 2004.
- GANGNEUX JP, SULAHIAN A, GARIN YJ, FARINOTTI R, DEROUIN F. Therapy of visceral leishmaniasis due to *leishmania infantum*: experimental assesment of efficacy of Ambisome. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 40, n. 5, p. 1214-1218, 1996.
- GARNIER T, CROFT SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Curr Opin Investig Drugs**. v. 3, n. 4, p. 538-544, 2002.
- GASPAR R, OPPERDOES FR, PREAT V, ROLAND M. Drug targeting with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: in vitro activity of primaquine-load nanoparticles against intracellular *leishmania donovani*. **Ann Trop Med Parasitol**. v. 86, n. 1, p. 41-49, 1992.
- GASPAR MM, CALADO S, PEREIRA J, FERRONHA H, CORREIA I, CASTRO H, TOMÁS AM, CRUZ ME. Targeted delivery of paromomycin in murine infectious diseases through association to nano lipid systems. **Nanomedicine**. v. 11, n.7, p. 1851-1860. 2015.
- GRANA C, GARCIA M, TALÉNS B, VERA M. Trombocitopenia asociada a heparina: diagnostico clinico y de laboratorio. tratamiento y alternativas terapeuticas. **Farm Hosp**. v. 19, n. 4, p. 184-192, 1995.
- GONÇALVES GS, FERNANDES AP, CARVALHO EC, CARDOSO JE, DE OLIVEIRA-SILVA F, MACIEL FC, RABELLO A, MIRANDA LA. Activity of a paramomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta tropica**. v. 93, p. 161-167, 2005.

- GRADONI L, DAVIDSON RN, ORSINI S, BETTO P, GLAMBENEDETTI M. Activity of liposomal amphotericin B (Ambisome) against leishmana infantum and tissue distribution in mice. **J Drug Target.** v. 1, n. 4, p. 311-316,1993.
- GREISH K, THIAGARAJAN G, GHANDEHARI H. Nanotoxicity: Methods and Protocols. Capítulo 12: In Vivo Methods of Nanotoxicology. Doi 10.1007/978-1-62703-002-1-17, 2012
- GUY RH, HADGRAFT J, BUCKS DA. Transdermal drug delivery and cutaneous metabolism. **Xenobiotica.** v. 17, n. 3, p. 325-342, 1987.
- GUTIÉRREZ JM, GONZÁLEZ C, MAESTRO A, SOLÉ I, PEY CM, NOLLA J. Nano-emulsions: New applications and optimizations of their preparation. **Curr opin colloid Int.** v. 13, p. 245-251, 2008.
- HEIDARI-KHARAJI M, TAHERI T, DOROUD D, HABIBZADEH S, RAFATI S. Solid lipid nanoparticle loaded with paromomycin: in vivo efficacy against Leishmania tropica infection in BALB/c mice model. **Appl Microbiol Biotechnol.** 2016. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-016-7422-y>
- HEIDARI-KHARAJI M, DOROUD D, TAHERI T, RAFATI S. DRUG TARGETING TO MACROPHAGES WITH SOLID LIPID NANOPARTICLES HARBORING PAROMOMYCIN: an In Vitro Evaluation Against L. major and L. tropica. **AAPS PharmSciTech.** DOI: 10.1208/s12249-015-0439-1. 2015.
- HERNÁNDEZ IP. Actividad fototóxica *in vitro e in vivo* de ftalocianina de aluminio clorada contra *Leishmania*. Tese de pós-graduação para mestrado em Ciências Básicas Biomédicas, Universidade Industrial de Santander 2010.
- HERNÁNDEZ I, MONTANARI J, VALDIVIESO W, MORILLA MJ, ROMERO EL, ESCOBAR P. In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species. **J Photoch photobio B.** v. 117, p. 157-163, 2012.
- HOELLER S, SPERGER A, VALENTA C. Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior ans skin permeation. **Int. J. Pharm.** v. 370, n. 1, p. 181-186, 2009.
- HONARI S, ZAHIR F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery system – a review (part 1). **Trop J Pharm Res.** v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

- IRAJI F, SADEGHINIA A. Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 99, n. 1, p. 3-9, 2005.
- JAAFARI M, BAVARSAD N, FAZLY BS, SAMIEI A, SOROUSH D, GHORBANI S, LOTFI MM, KHAMESIPOUR A. Effect of topical liposomes containing paromomycin sulfate in the course of Leishmania major infection in susceptible BALB/c Mice. **Antimicrob Agents Chem.** v. 53, n. 6, p. 2259-2265, 2009.
- JAMIL KM, HAQUE R, RAHMAN R, ABUL M, TOHA A. HAQUE R, KUMAR A, MISBAH S, HEATHER K, DHALARIA P, KOCHHAR S, DESJEUX P, BHUIYAN M, KHAN M, GHOSH RS. Effectiveness Study of Paromomycin IM Injection (PMIM) for the Treatment of Visceral Leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Negl Trop Dis.** V. 9, n. 1, doi:10.1371/journal.pntd.0004118.
- JIRMANUS L, GLESBY MJ, GUIMARAES LH, LAGO E, ROSA ME, MACHADO PR, CARVALHO EM. Epidemiological and Clinical Changes in American Tegumentary Leishmaniasis in an Area of Leishmania (Viannia) braziliensis Transmission Over a 20-Year Period. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 86, n. 3, p. 426-433, 2012.
- KALANTARI H, HEMMATI AA, BAVARSAD N, REZAIIE A, AHMADI S. Effect of topical Nanoliposomes of Paromomycin on Rats Liver and Kidney. **Jundishapur J Nat Pharm Prod.** v. 9, n. 4, p. e17565, 2014.
- KHARKWAL GB, SHARMA SK, HUANG Y, TAND TD, HAMBLIN MR. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. **Lasers Surg Med.** v.47, n. 7, p. 755-767, 2011.
- KAMHAWI S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?. **Trends in Parasitology.** v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.
- KRAUSE G, KROEGER A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 88, n. 1, p. 92-94, 1994.
- LELE BC LEROUX JC. Synthesis and micellar characterization of novel amphiphilic A-B-A triblock copolymers of n-(2-hydroxypropyl) methacrylamide or n- vinyl-2-pyrrolidone with poly(ε-caprolactone), **Macromolecules.** v. 35, p. 6714-6723, 2002.

- LEÓN AC, BLANCO D, PEÑA A, RONDA M, GONZÁLEZ BO, ARTEAGA ME, BADA AM, GONZÁLEZ Y, MANCEBO A. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. **Revista electrónica de Veterinaria**. v. 11, n. 12, p. 1-10, 2011.
- LI SD, HUANG L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Mol Pharm**. v. 5, n. 4, p. 496-504. 2008.
- LIUZZI R, CARCIATI A, GUIDO S. Transport Efficiency in Transdermal Drug Delivery. What is the Role of Fluid Microstructure?. **Colloids Surf B Biointerfaces**. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.11.064, 2016.
- LONGO JP, LOZZI SP, SIMIONI AR, MORAIS PC, TEDESCO AC, AZEVEDO RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **J Photochem Photobiol B**. v. 9, n. 94, p. 143-146, 2009.
- LONGO JP, AZEVEDO RB. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. *Rev Clín Pesq Odontol*. v. 6, n. 3, p. 249-257, 2010.
- LONGO JP, LEAL SC, SIMIONI AR, DE FÁTIMA MENEZES ALMEIDA-SANTOS M, TEDESCO AC, AZEVEDO RB. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. **Lasers Med Sci**. v. 27, n. 3, p. 575-584, 2012.
- LOPES RM, PEREIRA J, ESTEVES MA, GASPARG MM, CARVALHEIRO M, ELEUTÉRIO CV, GONÇALVES L, JIMÉNEZ-RUIZ A, ALMEIDA AJ, CRUZ ME. Lipid-based nanoformulations of trifluralin analogs in the management of Leishmania infantum infections. **Nanomedicine**. v. 11, n. 2, p. 153-170, 2016.
- LU. J, CWIK M, KANYOK T. Determination of paramomycin in human plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrofluorobenzene derivatization. **J Chromatogr B**. v. 695, p. 239-335, 1997.
- LUZHNA L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Front. Genet**. v. 4, p. 1-17, 2013.
- MACDONALD IJ E DOUGHERTY TJ. Basic principles of photodynamic therapy. **J Porphyr Phthalocya**. v. 5, p. 105-129, 2001.

- MATEUS JE, VALDIVIESO W, HERNÁNDEZ I, MARTÍNEZ F, ESCOBAR P. Acumulación celular y efecto anti-leishmania de la protoporfirina IX exógena y endógena después del tratamiento fotodinámico. **Biomedica**. v. 34, n. 4, p.589-594, 2014.
- MAYELIFAR K, TAHERI AR, RAJABI O, SAZGARNIA A. Ultraviolet B efficacy in improving antileishmanial effects of silver nanoparticles. **Iran J Basic Med Sci**. v. 18, n. 7, p. 677-683, 2015.
- MASMOUDI A, MAALEJ N, BOUDAYA S, TURKI H, ZAHAF A. Adverse effects of intralesional Glucantim® in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Méd maladies infect**. v. 36, p. 226–228, 2006.
- MARQUIS BJ, LOVE SA, BRAUN KL, HAYNES CL. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**. v. 134, p. 425–439, 2009.
- MSB, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília: **Editores do Ministério da Saúde**. p. 182, 2007.
- MSB, Brasil. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV. 1. Ed. Brasília 2015.
- MINODIER P, PAROLA P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Med Infect Dis**. v. 5, p. 150–158, 2007.
- MONTANARI J, MAIDANA C, ESTEVA MI, SALOMON C, MORILLA MJ, ROMERO EL. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. **J Control Release**. v. 1, n. 3, p. 368-376, 2010.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, AICIFtn. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOSSER DM, BRITTINGHAM A. Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology**. v. 115, p. 9-23, 1997.
- MORENO E, SCHWARTZ J, LARREA E, CONDE I, FONT M, SANMARTÍN C, IRACHE JM, ESPUELAS S. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine**. v. 11, n. 8, p. 2003-20012, 2015.

- MOTTA JOC. Estudo comparativo da resposta imunológica e clínica entre a anfotericina B lipossomal e o N-metilglucamina em pacientes com a forma localizada da leishmaniose tegumentar americana (LTA) [dissertação]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2006.
- MUEHLMANN LA, MA BC, LONGO JP, ALMEIDA SANTOS MDE F, AZEVEDO RB. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **Int J Nanomedicine**. v. 7, n. 9, p. 1199-1213, 2014.
- MUEHLMANN LA, RODRIGUES MC, LONGO JP, GARCIA MP, PY-DANIEL KR, VELOSO AB, DE SOUZA PE, DA SILVA SW, AZEVEDO RB. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **J Nanobiotechnology**. doi: 10.1186/s12951-015-0095-3, 2015
- MURBACK ND, HANS FILHO G, NASCIMENTO RA, NAKAZATO KR, DORVAL ME. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **An Bras Dermatol**. v. 86, n. 1, p. 55-63, 2011.
- MUSKUS CE, MARÍN M. Metacicloogénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania. **Biomédica**. V. 22 n. 2, p. 167-177, 2002.
- NELSON KG, BISHOP JV, RYAN RO, TITU R. Nanodisk- associated amphotericin B clears leishmania major cutaneous infection in susceptible Balb/c mice. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 50, n. 4, p. 1238-1244, 2006.
- NG S-F, ROUSE JJ, SANDERSON FD, MEIDAN V, ECCLESTON GM. Validation of a static Franz diffusion cell system for *In vitro* permeation studies. **AAPS PharmSci Tech**. v. 11, n. 3, p. 1432-1441, 2010.
- NEVA FA, PONCE C, PONCE E, KREUTZER R, MODABBER F, OLLIARO P. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 91, n. 4, p. 473-475, 1997.
- NIH. National Institute of health. Rare disease and orphan products. Capítulo 5: Development of new therapeutic drugs and biologics for rare disease, ISBN-13: 978-0-309-15806-0, 2010.

- NUNES EP, DE OLIVEIRA J, TALHARI C, MOREIRA R, TALHARI S, OURIVES L, GONTIJO B, CHRUSCIAK A. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. **An Bras Dermatol**. V. 90, n. 6, p. 807-813, 2015.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento. Washington, DC. 2013.
- OSPINA VE, MANTILLA JC, CONDE CA, ESCOBAR P. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. **Rev. Cienc. Salud**. v. 12, n. 2, p. 195-211, 2013.
- PADOVESE V, TERRANOVA M, TOMA L, BARNABAS G, MORRONE A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Tigray, northern Ethiopia: clinical aspects and therapeutic concerns. **T Roy Soc Trop Med H**. v. 103, p. 707—711, 2009.
- PLAETZER K, KRAMMER B, & BERLANDA J, BERR F, KIESSLICH T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med Sci**. v. 24, p. 259–268, 2009.
- PESSÔA SB, MARTINS AV. Parasitología Médica. 11. **Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**. 1982.
- PIMENTA PF, MODI GB, PEREIRA ST, SHAHABUDDIN M, SACKS DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**. v. 115, p. 359-369, 1997.
- PRAJAPATI VK, AWASTHI K, GAUTAMS, YADAV TP, RAI M, SRIVASTAVA ON, SUNDAR S. Targeted killing of *Leishmania donovani* in vivo and in vitro with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes. **J Antimicrob Chemother**. v. 66, p. 874–879, 2011.
- PRAJAPATI VK, AWASTHI K, YADAV TP, RAI M, SRIVASTAVA ON, SUNDAR S. An Oral Formulation of Amphotericin B Attached to Functionalized Carbon Nanotubes Is an Effective Treatment for Experimental Visceral Leishmaniasis. **J Infect Dis**. v. 205, p. 333–336, 2012.
- PROFFITT RT, SATORIUS A, CHIANG SM, SULLIVAN L, ADLER-MOORE JP. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B

- (AmBisome) in rodents. **J Antimicrob Chemother.** v. 28, Suppl B, p. 49-61, 1991.
- PY-DANIEL KR, NAMBAN JS, DE ANDRADE LR, DE SOUZA PE, PATERNO LG, AZEVEDO RB, SOLER MA. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. **Eur J Pharm Biopharm.** doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.028, 2016.
- RAVIS WR, LLANOS-CUENTAS A, SOSA N, KREISHMAN-DEITRICK M, KOPYDLOWSKI KM, NIELSEN C, SMITH KS, SMITH PL, RANSOM JH, LIN Y, GROGL M. Pharmacokinetics and Absorption of Paromomycin and Gentamicin from Topical Creams Used To Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 57, n. 10, p. 4809-4815, 2013.
- REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** v. 7, p. 581-96, 2007.
- RIBEIRO AP, ANDRADE MC, BAGNATO VS, VERGANI CE, PRIMO FL, TEDESCO AC, PAVARINA AC. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers Med Sci.** v. 30, n. 2, p. 549-559, 2015.
- RIBEIRO AP, ANDRADE MC, DA SILVA JDE, JORGE JH, PRIMO FL, TEDESCO AC, PAVARINA AC. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and biofilms of *Candida albicans* mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in nanoemulsions. **Photochem Photobiol.** v. 1, p. 111-119, 2013b.
- RICO CL, RODRIGUEZ J, CONDE CA, MANTILLA JC, ESCOBAR P. Permeación en piel y biodistribución de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) aplicada tópicamente en ratas Wistar. **Revista Argentina De Dermatología.** 94. 2013.
- ROCHA MS, LUCCI CM, LONGO JP, GALERA PD, SIMIONI AR, LACAVAL ZG, TEDESCO AC, AZEVEDO RB. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **J Biomed Nanotechnol.** v. 8, n. 2, p. 251-257, 2012.
- RODRIGUES GB, PRIMO FL, TEDESCO AC, BRAGA GUL. In vitro photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* Melanized cells

- with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochem Photobiol.** v. 88, p. 440-447, 2012.
- RODRIGUEZ JM, CROFT SL, FESSI H, BORIES C, DEVISSAGUET JP. The activity and ultrastructural localization of primaquine-loaded poly (d, l-lactide) nanoparticles in leishmania donovani infected mice. **Trop Med Parasitol.** v. 45, n. 3, p. 223-228, 1994.
- ROGERS ME, HAJMOVÁ M, JOSHI MB, SADLOVA J, DWYER DM, VOLF P, AND BATES PA. Leishmania chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. **Cell Microbiol.** v. 10, n. 6, p. 1363–1372, 2008.
- ROMERO GA, GUERRA MV, PAES MG, MACÊDO VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Vinnia) braziliensis and L (V.) guyanensis in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am J Trop Med Hyg.** V. 65, p. 456-465, 2001
- RONSEIN GE, MIYAMOTOI S, BECHARAI E, DI MASCIO P, MARTINEZ GR. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: damage mechanisms, detection techniques and biological implication. **Quim. Nova.** v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.
- ROSS MH, PAWLINA W. Histología. Texto y atlas a color con biología celular y molecular. 5a edición. Editorial médica Panamericana, 2007.
- SAKEENA MHF, ELRASHID SM, MUTHANNA PA, GHASSAN ZA, KANAKAL MM, LAILA L, MUNAUVAR AS, AZMIN MN. Effect of the limonene on permeation enhancement of ketoprofen in palm oil esters nanoemulsion. **J. Oleo Sci.** v. 59, n. 7, p. 395-400, 2010.
- SALAH AB, BEN N, GUEDRI E, ZAATOUR A, BEN N, BETTAIEB J, GHARBI A, BELHADJ N, BOUKTHIR A, CHLIF S, ABDELHAMID K, EL Z, LOUZIR H, MOKNI M, MORIZOT G, BUFFET P, SMITH P, KOPYDLOWSKI KM, KREISHMAN-DEITRICK M, SMITH KS, NIELSEN CJ, ULLMAN DR, NORWOOD JA, THORNE GD, MCCARTHY WF, ADAMS RC, RICE RM, TANG D, BERMAN J, RANSOM J, MAGILL AL AND GROGL M. Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. **N Engl J Med.** p. 368:524 DOI: 10.1056/NEJMoa1202657 , 2013.
- SANTOS G, FERNANDES AP, CARVALHO R, CARDOSO JE, DE OLIVEIRA-SILVA F, MACIEL FC, RAVELLO A, FERRERIRA LA. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by

- Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Acta Tropica**. v. 93, P. 161–167, 2005.
- SAUDAGAR P, DUBEY VK. Molecular Mechanisms of In vitro Betulin-Induced Apoptosis of *Leishmania donovani*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 90, n. 2, p. 354–360, 2014.
- SCHMIDT-OTT R, KLENNER T, OVERATH P, AEBISCHER T. Topical treatment with hexadecylphosphocholine (Miltex) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 93, n1, p.85-90, 1999.
- SECUNDINO NF, EGER-MANGRICH I, BRAGA EM, SANTORO MM, PIMENTA PF. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure and chemical composition. **J. Med. Entomol.** v. 42, p. 928–938, 2005.
- SÉGUIER S, SOUZA SLS, SVERZUT ACV, SIMIONI AR, PRIMO FL, BODINEAU A, CORREA VM, COULOMB B, TEDESCO AC. Impact of photodynamic therapy on inflammatory cells during human chronic periodontitis. **J photoch photobiol B.** v. 101, P. 348-354, 2010.
- SIQUEIRA-MOURA MP, PRIMO FL, ESPREAFICO EM, TEDESCO AC. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.
- SOLOMON M, BAUM S, BARZILAI A, SCOPE A, TRAU H, SCHWARTZ E. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **J Am Acad Dermatol.** v. 56, p. 612-616, 2007.
- SOTO J, FUYA P, HERRERA R, BERMAN J. Paramomicina tópica/cloruro de metilbencetonio más antimonio de meglumina parenteral como tratamiento para la leishmaniasis cutánea americana: estudio controlado. **Clin Infec Dis.** v. 26, n. 1, p. 56-58, 1998.
- SOTO JM, TOLEDO JT, GUTIERREZ P, ARBOLEDA M, NICHOLLS S, PADILLA JR, BERMAN JD, ENGLISH CK, GROGL M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drugs (WR279396): Phase 2 pilot study. **Am J Trop Med Hyg.** v. 66, n. 2, p. 147-151, 2002.
- SONNEVILLE-AUBRUN O, SIMONNET J-T, ALLORET FL'. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Adv colloid Interface Sci.** v. 118, n. 109, p. 145-149, 2004.

- SU H, KOO J, CUI H. One-component nanomedicine. **J Control Rel.** doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.056, 2015.
- SUNDAR S, SINHA PK, RAI M, VERMA DK, NAWIN K, ALAM S, CHAKRAVARTY J, VAILLANT M, VERMA N, PANDEY K, KUMARI P, LAL CS, ARORA R, SHARMA B, ELLIS S, STRUB-WOURGAFT N, BALASEGARAM M, OLLIARO P, DAS P, MODABBER F. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **Lancet.** v. 377, n. 9764, p. 477-486, 2011.
- TAKEGAMI S, KITAMURA K, KAWADA H, MATSUMOTO Y, YOSHIMURA S, KITADE T. Distribution of Chloroaluminum Phthalocyanine in a Lipid Nano-Emulsion as Studied by Second-Derivative Spectrophotometry. **Micro/Nanosystems.** V. 2, p. 280-285, 2010.
- TAPAJÓS EC, LONGO JP, SIMIONI AR, LACAVA ZG, SANTOS MF, MORAIS PC, TEDESCO AC, AZEVEDO RB. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncol.** v. 44, n. 11, p. 1073-1079, 2008.
- TOMAZINI MV, DA SILVA C, BRITTO S, TEDESCO A. Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin histological and immunohistochemical changes in animal model. **An. Bras. Dermatol.** vol.82, n.6, P, 535-541, 2007.
- TORRES-SANTOS EC, RODRIGUES JM, MOREIRA DL, KAPLAN MA, ROSSI-BERGMANN B. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2',6'-dihydroxy- 4'-methoxychalcone by entrapment in poly (D,L-lactide) nanoparticle. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, n. 7, p. 1776-1778, 1999.
- TANIGUCHI N. On the Basic Concept of 'Nano-Technology', Proc. Intl. Conf. Prod. London, Part II, British Society of Precision Engineering 1974.
- VALDIVIESO W, Hernández IP, Martínez F, Páez E, Escobar P. Efecto fototóxico de la terapia fotodinámica en promastigotes de Leishmania amazonensis. **Salud UIS.** v. 40, p. 13-19, 2008.
- VAN DER SNOEK EM, ROBINSONDJ, VAN HELLEMOND JJ, NEUMANN H. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** v. 22, n. 8, p. 918-922. 2008.

- VELEZ ID, CARRILLO DC. Leishmaniasis cutánea y anfotericina B liposomal. Reporte de un caso. **Infectio**. v. 17, n. 4, p. 201-204, 2013.
- VILLARINO NF, LANDONI MF. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. **Analecta veterinaria**. v. 26, n. 1, p. 28-37, 2006.
- WALLER RF, McCONVILLE MJ. Developmental changes in lysosome morphology and function Leishmania parasites. **Int J Parasitol**. v. 32, p. 1435-1445, 2002.
- WALTERS LL. Leishmania Differentiation in Natural and Unnatural Sand Fly Hosts. **J Eukaryot Microbiol**. v. 40, n. 2, p. 196-206, 1993.
- WANT MY, ISLAMUNDI M, CHOUHAN G, OZBAK HA. Therapeutic efficacy of artemicin-loaded nanoparticle in experimental visceral leishmania. **Colloids Surf B Biointerfaces**. v. 130, p. 215-221, 2015.
- WEINRAUCH L, CAWICH F, CRAIG P, SOSA JX, EL-ON J. Topical treatment of New World cutaneous leishmaniasis in Belize: a clinical study. **J Am Acad Dermatol**. v. 29, n. 3, p. 443-446, 1993v.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Nota descriptiva N°375. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>. 2014.
- YARDLEY V, CROFT SL. Activity of Liposomal Amphotericin B against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chem**. v. 41, n. 4, p. 752–756, 1997.
- YARDLEY V, CROFT SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. **Int J Antimicrob Agents**. v. 13, n. 4, p. 243-248, 2000.
- ZAHIR AA, CHAUHAN IS, BAGOVAN A, KAMARAJ C, ELANGO G, SHANKAR J, ARJARIA N, ROOPAN SM, RAHUMAN AA, SINGH N. Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using Euphorbia prostata extract shows shift from apoptosis to G0/G1 arrest followed by necrotic cell death in Leishmania donovani. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 59, n. 8, p. 4782- 4799, 2015.

ZANCANELA DC, PRIMO FL, ROSA AL, CIANCAGLINI P, TEDESCO AC. The effect of Photosensitizer drugs and light stimulation on osteoblast growth. **Photomed Laser Surg.** v. 19, n. 10, p. 699-705, 2011.