



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E BIOTECNOLOGIA – REDE BIONORTE



**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA  
FORMULAÇÃO PARA ENTREGA TRANSDÉRMICA DA  
HEXAMETOXILOBELANINA E DA PELITORINA APLICADOS AO  
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**SAARA NERI FIALHO**

**PORTO VELHO – RO**

**2023**

**SAARA NERI FIALHO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA  
FORMULAÇÃO PARA ENTREGA TRANSDÉRMICA DA  
HEXAMETOXILOBELANINA E DA PELITORINA APLICADOS AO  
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz/Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles

Coorientador (a): Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

**PORTO VELHO – RO**

**Setembro/2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Fialho, Saara Neri

Desenvolvimento e avaliação pré-clínica de uma formulação para entrega transdérmica da hexametoxilobelanina e da pelitorina aplicados ao tratamento de leishmaniose cutânea/ Saara Neri Fialho – Porto Velho: RO, 2023.

83 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz/Rondônia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, ano de defesa

SAARA NERI FIALHO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DE UMA  
FORMULAÇÃO PARA ENTREGA TRANSDÉRMICA DA  
HEXAMETOXILOBELANINA E DA PELITORINA APLICADOS AO  
TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz/Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles

Coorientador (a): Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

Aprovada em 29/09/2023

**Banca examinadora**

Documento assinado digitalmente  
 CAROLINA BIONI GARCIA TELES  
Data: 11/03/2024 22:06:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profª. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles (Orientador)  
Fundação Oswaldo Cruz/RO

Documento assinado digitalmente  
 LUIS ANDRE MORAIS MARIUBA  
Data: 11/03/2024 12:04:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Luis Andre Morais Mariuba  
Fundação Oswaldo Cruz/AM

Documento assinado digitalmente  
 RAFAELA DINIZ SOUSA  
Data: 11/03/2024 11:50:04-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profª. Dra. Rafaela Diniz Sousa  
São Lucas – PVH



Documento assinado digitalmente  
**LUIS ALBERTO KANIS**  
Data: 28/02/2024 09:23:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis  
Airela Farmacêutica



Documento assinado digitalmente  
**KARINE MODOLON ZEPON**  
Data: 06/02/2024 19:27:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Karine Modolon Zepon  
Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Saara Neri Fialho, (X) autorizo ( ) não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “Desenvolvimento e avaliação pré-clínica de uma formulação para entrega transdérmica da hexametoxilobelanina e da pelitorina aplicados ao tratamento de Leishmaniose cutânea” no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Local/Data: Porto Velho, RO, 11 de Março de 2024.

 Documento assinado digitalmente  
SAARA NERI FIALHO  
Data: 11/03/2024 12:27:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Saara Neri Fialho

CPF:028.894.812-20

RG: 1291670

## DEDICATÓRIA

Ao meu avô Armado Fialho (*in memória*) por todos os ensinamentos, por todos os momentos descontraídos de avô e neta, nunca irei me esquecer dos seus conselhos, principalmente daqueles relacionados a importância de se adquirir conhecimentos através da educação.

Aos meus pais, Madalena e Anaiba, a quem devo parte do que sou. Gratidão pelo amor e carinho, pela confiança, dedicação e principalmente pela educação que me foi dada.

Ao meu esposo e amigo, Alisson Martins Albino, que trilha o caminho da vida ao meu lado. Juntos fazemos escolhas e abraçamos as consequências, sejam elas boas ou ruins. Sou grata a ti pelo cuidado, apoio e carinho, pela paciência e comunhão, pelas risadas, pelos conselhos, por compartilhar os momentos felizes e também os difíceis. Sou grata por tudo que vivemos e que ainda viveremos. Te amo!

A minha família PBML (Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose) que deixa a minha vida mais leve. A vocês toda a minha gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que guia e ilumina meus caminhos pela vida, aceita minhas orações e me dá forças para seguir. Senhor a ti, sou grata por tudo;

À minha orientadora Dra. Carolina Bioni Garcia Teles, pela confiança, seriedade, disposição e incentivo ao conduzir essa orientação. Chefe sou imensamente grata por não teres desistido de mim. Gratidão pelas oportunidades, pelos ensinamentos, por me permitir fazer parte da família PBML, saibas que isso mudou a minha vida;

À minha irmã e grande parceira na pesquisa Minelly Azevedo (Mi), por me apoiar em tudo. A sua amizade foi o melhor presente que ganhei no doutorado. És meu braço direito e as vezes também o esquerdo. Muito obrigada por acreditar em mim, por sempre me dizer que vamos conseguir, pelas incontáveis horas (sábados, domingos, feriados, datas comemorativas) que ficamos no laboratório tentando resolver os problemas da experimentação. Grande parte desta pesquisa só foi possível graças a sua parceria. A você, minha eterna gratidão;

À minha irmã na pesquisa Aurileya Gouveia (Auri), pela parceria na ciência e na vida. Há oito anos ingressamos juntas no mundo da pesquisa e há oitos anos eu ganhei uma irmã. Obrigada por todo o apoio nesta pesquisa e pelas boas risadas compartilhadas. A você, toda minha gratidão;

À minha irmã na pesquisa Amália Ferreira (nosso ser de luz), pelas soluções rápidas de problemas que surgiram durante os experimentos, por sempre estar disposta a me ouvir e me aconselhar. Digo que você é nosso ser luz, pois contigo não existem dias ruins. A você, toda a minha gratidão;

Aos meus amigos-irmãos Norton Rossi, Welligton Nascimento (Wel), Leandro Martinez (Lelê) e Arlindo Gonzaga, pela parceria, disponibilidade, pelos conselhos, pelo carinho, por toda a ajuda que me concedem na pesquisa e na vida;

A todos os integrantes da minha família PBML, por todo apoio, dedicação e pelos inúmeros momentos de descontração. Saibam que vocês são a minha segunda família. Carolina (Chefe), Minelly, Amália, Aurileya, Arlindo, Leandro, Welligton, Marcinete, Norton, Sol Sol, Laerth, Guilherme, Ana Paula, Helia, Ivaniely, Elisandra, Karen, Jussara e Wallyson. Gratidão a todos;

Ao Dr. Luiz Alberto Kanis e a Ms. Fernanda Mendes de Moraes pela capacitação e colaboração no desenvolvimento dos filmes poliméricos;

À Fundação Osvaldo Cruz – FIOCRUZ-RO, na qual desenvolvi praticamente toda a parte experimental deste trabalho;

Ao PPG-Bionorte – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da

Rede BIONORTE, que oportunizou uma aprendizagem significativa;

Aos Professores do programa que trouxeram grandes contribuições para minha formação; à coordenação e secretaria do PPG-Bionorte, em especial ao meu amigo Giovani da Silva Amaral pelo carinho, atenção, disposição e toda ajuda concedida durante todos esses anos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), pela disponibilização da estrutura para desenvolvermos os ensaios de permeação cutânea, em especial ao nosso parceiro Ms. Nilton Fagner de Araújo, pela paciência e disposição em nos ajudar a solucionar os problemas durante a padronização dos ensaios de permeação cutânea.

Aos meus queridos sobrinhos na pesquisa Débora Luciano e David Oliveira por todo o apoio nos experimentos de permeação cutânea. Sou grata pela dedicação e paciência de vocês;

À empresa Evonik Industrie, pela doação do copolímero utilizado no presente estudo;  
À CAPES pela provisão do auxílio financeiro;

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, muito obrigada!

## EPÍGRAFE

*“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”*

(Albert Einstein)

*“Se você não gosta do seu destino, não o aceite. Em vez disso, tenha a coragem de mudá-lo do jeito que você quer que ele seja.”*

(Masashi Kishimoto)

FIALHO, Saara Neri Fialho. **Desenvolvimento e avaliação pré-clínica de uma formulação para entrega transdérmica da hexametoxilobelanina e da pelitorina aplicados ao tratamento de leishmaniose cutânea.** 2023. 83f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Porto Velho, 2023.

## RESUMO

As leishmanioses pertencem a um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, considerada uma doença negligenciada e endêmica em 97 países. Esse cenário aponta para a urgência de descoberta de novos fármacos, assim como para o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos. Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida da substância hexametoxilobelanina (S4) e da amida pelitorina *in vitro* e investigar a potencial aplicação tópica *in vivo*. Para tanto, utilizou-se cepas de *Leishmania* spp. obtidas do banco de Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz. As formas promastigotas foram cultivadas em meio RPMI-1640 e avaliadas através da curva de crescimento por 12 dias. A citotoxicidade foi testada em células de linhagem fibroblásticas – L929 e monocítica humanas – THP-1 usando as substâncias S4 e pelitorina. A linhagem THP-1 foi usada como modelo de infecção de *Leishmania* spp. As células infectadas foram tratadas com pelitorina ou S4 em concentrações variadas para determinação do IC<sub>50</sub> e índice fagocítico. Para avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas das substâncias relacionadas a permeação cutânea, foi usado o *software* SwissAdme. O índice de seletividade foi calculado como a razão entre CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub>. Foram determinados os comprimentos de onda de máxima absorção para S4 e pelitorina. Curvas analíticas (absorbância x concentração) foram construídas para ambas as substâncias utilizando espectrofotometria UV-Vis. As concentrações desconhecidas foram calculadas usando as equações das curvas analíticas. Filmes poliméricos de liberação prolongada foram produzidos utilizando Eudragit RS 100, propilenoglicol e acetona como solvente. Os componentes foram dissolvidos, aquecidos, adicionada a substância ativa (S4 ou pelitorina) e a solução foi evaporada para formar os filmes. Peles suínas de orelhas foram preparadas para estudos de permeação e retenção cutânea, sendo uma alternativa válida para avaliação *in vitro* de formulações tópicas. Os ensaios foram realizados em células de Franz, coletando amostras ao longo de 12 horas para análise da permeação e, posteriormente, a retenção cutânea foi avaliada com métodos de espectrofotometria UV-vis. Posteriormente, foi conduzido um estudo aprovado pela CEUA da FIOCRUZ RONDÔNIA, utilizando camundongos BALB/c fêmeas infectados com *L. (L.) amazonensis*. Os animais foram tratados com filmes poliméricos contendo pelitorina ou S4, sendo comparados com grupos controle. A

carga parasitária, fatores bioquímicos e evolução das lesões foram avaliados. Por fim, análises estatísticas foram realizadas para interpretar os resultados, através de regressões não lineares para calcular  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$ , usando GraphPad Prism 8 e Origin 9. O inchaço das lesões foi avaliado com Teste Two-way repeated measure ANOVA e teste de Tukey para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . Ao analisar os resultados foi observado que a amida pelitorina demonstrou  $CC_{50}$  de  $476,8 \pm 7,28 \mu\text{M}$  para THP-1 e  $363,7 \pm 6,36 \mu\text{M}$  para L929, enquanto a substância S4 apresentou  $CC_{50}$  superior a  $500 \mu\text{M}$  para ambas as linhagens. Todas as cepas tiveram fase log entre 1° e 3° dia. *L. (V.) braziliensis* teve fase log até o 7° dia. Fase estacionária variou entre 5° e 9° dia. A substância S4 inibiu 50% das amastigotas de *L. (L.) infantum/chagasi* a  $145,7 \pm 2,8 \mu\text{M}$ . Mas não demonstrou atividade frente *L. (V.) braziliensis* na maior concentração testada ( $200 \mu\text{M}$ ), fato que impossibilitou o cálculo do IS para essa espécie. No entanto, o IS da S4 para *L. (L.) infantum/chagasi* foi calculado em 3,43. A pelitorina inibiu 50% dos amastigotas em *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* a  $27,31 \pm 3,68$ ,  $55,12 \pm 3,97$  e  $128 \pm 8,48 \mu\text{M}$ , respectivamente. A pelitorina demonstrou seletividade destacada para as amastigotas da *L. (L.) amazonensis*, com um índice de seletividade (IS) de cerca de 17,45 em relação às células THP-1 e 13,29 em relação às células L929. Para *L. (V.) braziliensis*, embora menor, ainda exibe uma seletividade moderada, com IS de aproximadamente 3,72 para THP-1 e 2,83 para L929. Já para *L. (L.) infantum/chagasi*, a pelitorina demonstra uma seletividade entre moderada e alta, com IS de cerca de 8,65 para THP-1 e 6,5 para L929. Os dados oriundos da curva analítica demonstraram uma relação linear entre a absorbância e a concentração, com coeficientes de correlação altos (0,995 para S4 e 0,999 para pelitorina), atendendo aos requisitos da ANVISA. Na análise de permeação cutânea, o filme foi aplicado na pele suína e continha uma quantidade total estimada de 0,111 mg de S4 ou pelitorina. Após 12 horas, cerca de 76,6% da S4 e 6,56% da pelitorina permearam através da pele. Quanto à retenção cutânea, após o mesmo período, aproximadamente 0,01757 mg de S4 e 0,026 mg de pelitorina foram retidos na pele. Os parâmetros de permeabilidade das substâncias S4 e pelitorina foram determinados através do teste de permeação cutânea. O fluxo constante ( $J$ ) para a S4 foi de  $2,69 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ , semelhante ao da pelitorina, que foi de  $2,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ . O tempo necessário para atingir o equilíbrio de permeação foi de aproximadamente 0,95 horas para S4 e 1,1 horas para pelitorina. O coeficiente de permeabilidade da S4 foi 0,8 vezes maior em comparação com o da pelitorina. Em relação aos ensaios *in vivo* não foram observadas diferenças significativas no tamanho das lesões e peso dos animais entre os grupos tratados. No entanto, a análise da carga parasitária revelou uma redução na parasitemia dos camundongos tratados com a formulação de filme contendo pelitorina (inibição de 60,71%) ou S4 (inibição de 59,52%), sem diferença estatística

significativa entre eles. A formulação do filme por si só também mostrou redução da parasitemia (inibição de 71,54%). Todos os tratamentos foram eficazes comparados ao grupo controle não tratado. Os ensaios bioquímicos sorológicos não indicaram diferenças significativas nos níveis de ureia, creatinina, TGO e TGP em relação ao grupo controle não tratado. Isso sugere que os parâmetros analisados permaneceram dentro dos limites normais, indicando que os tratamentos não afetaram negativamente esses parâmetros bioquímicos. Diante dos resultados obtidos foi observado que a substância S4 é promissora, com baixa toxicidade *in vitro* ( $CC_{50} > 500 \mu\text{M}$ ), assim como foi capaz de inibir amastigotas de *L. (L.) infantum/chagasi in vitro*. A amida pelitorina mostrou seletividade notável para *L. (L.) amazonensis* (IS  $\sim 17,45$ ). Os testes de permeação cutânea demonstraram que o filme desenvolvido foi capaz de liberar ambas as substâncias (S4 e pelitorina) e essas apresentaram altos percentuais de permeação cutânea. Os tratamentos *in vivo* reduziram significativamente a parasitemia, sem afetar os parâmetros bioquímicos, destacando sua eficácia e segurança.

**Palavras chaves:** *Leishmania* spp.; Hexametoxilobelanina; Pelitorina; Sistema de entrega transdérmica.

FIALHO, Saara Neri Fialho. **Development and pre-clinical evaluation of a formulation for transdermal delivery of hexamethoxybelane and pelitorine applied to the treatment of cutaneous leishmaniasis.** 2023. 83f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Fundação Oswaldo Cruz, Porto Velho, 2023.

## ABSTRACT

Leishmaniasis belongs to a complex of infectious parasitic diseases caused by various species of protozoa from the genus *Leishmania*, considered a neglected disease and endemic in 97 countries, this scenario emphasizes the urgency of discovering new drugs and developing new therapeutic systems. In this context, the general objective of this work was to evaluate the leishmanicidal activity of hexamethoxybelanin (S4) and pelitorin amide in vitro and investigate their potential topical application in vivo. For this purpose, strains of *Leishmania* spp. obtained from the *Leishmania* Collection bank at Oswaldo Cruz Institute were used. The promastigote forms were cultured in RPMI-1640 medium and evaluated through a growth curve for 12 days. Cytotoxicity was tested on fibroblastic (L929) and human monocytic (THP-1) cell lines using substances S4 and pelitorin. The THP-1 lineage was used as a *Leishmania* spp. infection model. Infected cells were treated with pelitorin or S4 at varying concentrations to determine IC<sub>50</sub> and phagocytic index. For *in silico* evaluation of the physicochemical properties related to skin permeation, the SwissAdme software was used. The selectivity index was calculated as the ratio between CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub>. The maximum absorption wavelengths for S4 and pelitorin were determined. Analytical curves (absorbance x concentration) were constructed for both substances using UV-Vis spectrophotometry. Unknown concentrations were calculated using the analytical curve equations. Prolonged-release polymeric films were produced using Eudragit RS 100, propylene glycol, and acetone as the solvent. The components were dissolved, heated, the active substance (S4 or pelitorin) was added, and the solution was evaporated to form the films. Pig ear skins were prepared for permeation and skin retention studies, providing a valid alternative for *in vitro* evaluation of topical formulations. The assays were performed in Franz cells, collecting samples over 12 hours for permeation analysis, and subsequently, skin retention was evaluated using UV-Vis spectrophotometry methods. Subsequently, an approved study by CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA was conducted using female BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*. The animals were treated with polymeric films containing pelitorin or S4, and compared with control groups. Parasite load, biochemical factors, and lesion evolution were assessed. Finally, statistical analyses were performed to interpret the results, using nonlinear regressions to calculate CC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub>, employing GraphPad Prism and Origin. Lesion swelling was assessed with Two-way repeated measure ANOVA and Tukey's test for multiple comparisons. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ . Upon analyzing the

results, it was observed that pellitorin amide demonstrated a  $CC_{50}$  of  $476.8 \pm 7.28 \mu\text{M}$  for THP-1 and  $363.7 \pm 6.36 \mu\text{M}$  for L929, while substance S4 showed a  $CC_{50}$  greater than  $500 \mu\text{M}$  for both lineages. All strains had a log phase between the 1st and 3rd day. *L. (V.) braziliensis* had a log phase until the 7th day. The stationary phase varied between the 5th and 9th day. Substance S4 inhibited 50% of *L. (L.) infantum/chagasi* amastigotes at  $145.7 \pm 2.8 \mu\text{M}$ . However, it showed no activity against *L. (V.) braziliensis* at the highest tested concentration ( $200 \mu\text{M}$ ), making it impossible to calculate the SI for this species. Nevertheless, the SI of S4 for *L. (L.) infantum/chagasi* was calculated at 3.43. Pellitorin inhibited 50% of amastigotes in *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, and *L. (V.) braziliensis* at  $27.31 \pm 3.68$ ,  $55.12 \pm 3.97$ , and  $128 \pm 8.48 \mu\text{M}$ , respectively. Pellitorin showed significant selectivity for *L. (L.) amazonensis* amastigotes, with a selectivity index (SI) of about 17.45 compared to THP-1 cells and 13.29 compared to L929 cells. For *L. (V.) braziliensis*, although lower, it still exhibited moderate selectivity, with an SI of approximately 3.72 for THP-1 and 2.83 for L929. For *L. (L.) infantum/chagasi*, pellitorin demonstrated a selectivity ranging from moderate to high, with an SI of about 8.65 for THP-1 and 6.5 for L929. The data from the analytical curve demonstrated a linear relationship between absorbance and concentration, with high correlation coefficients (0.995 for S4 and 0.999 for pellitorin), meeting ANVISA requirements. In the analysis of skin permeation, the film was applied to pig skin and contained a total estimated amount of 0.111 mg of S4 or pellitorin. After 12 hours, approximately 76.6% of S4 and 6.56% of pellitorin permeated through the skin. As for skin retention, after the same period, approximately 0.01757 mg of S4 and 0.026 mg of pellitorin were retained in the skin. The permeability parameters of substances S4 and pellitorin were determined through the cutaneous permeation test. The constant flux ( $J$ ) for S4 was  $2.69 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ , similar to pellitorin, which was  $2.43 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ . The time required to reach the permeation equilibrium was approximately 0.95 hours for S4 and 1.1 hours for pellitorin. The permeability coefficient of S4 was 0.8 times higher compared to pellitorin. Regarding *in vivo* assays, no significant differences were observed in lesion size and animal weight between the treated groups. However, the analysis of parasite load revealed a reduction in parasitemia in mice treated with the film formulation containing pellitorin (inhibition of 60.71%) or S4 (inhibition of 59.52%), with no significant statistical difference between them. The film formulation alone also showed a reduction in parasitemia (inhibition of 71.54%). All treatments were effective compared to the untreated control group. Serological biochemical assays did not indicate significant differences in urea, creatinine, AST, and ALT levels compared to the untreated control group. This suggests that the analyzed parameters remained within normal limits, indicating that the treatments did not adversely affect these biochemical parameters. In light of the results obtained, it was observed that substance S4 is

promising, with low *in vitro* toxicity (CC50 > 500  $\mu$ M), and was able to inhibit *L. (L.) infantum/chagasi* amastigotes *in vitro*. Pellitorin amide showed remarkable selectivity for *L. (L.) amazonensis* (SI ~17.45). The cutaneous permeation tests demonstrated that the developed film was able to release both substances (S4 and pellitorin), and these showed high percentages of cutaneous permeation. The *in vivo* treatments significantly reduced parasitemia without affecting the biochemical parameters, highlighting their efficacy and safety.

**Keywords:** *Leishmania* spp.; Hexamethoxylobelanine; Pellitorin; Transdermal delivery system.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição mundial da leishmaniose cutânea .....	21
<b>Figura 2</b> – Ciclo biológico de parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.....	22
<b>Figura 3</b> – Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar .....	24
<b>Figura 4</b> – Estrutura da pele .....	30
<b>Figura 5</b> – Camadas da epiderme .....	31
<b>Figura 6</b> – Vias de permeação na pele.....	32
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática da pele em diferentes estágios de uma lesão cutânea causada pela leishmaniose .....	33
<b>Figura 8</b> – Processo para obtenção da curva de crescimento das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ...	39
<b>Figura 9</b> – Determinação da citotoxicidade das substâncias pelitorina e hexametoxilobelanina frente células pertencentes a linhagem fibroblástica – L929.....	40
<b>Figura 10</b> – Determinação da citotoxicidade da pelitorina e hexametoxilobelanina frente células pertencentes a linhagem monocítica humana – THP-1 .....	42
<b>Figura 11</b> – Processo de infecção com <i>Leishmania</i> spp. e tratamento frente células pertencentes a linhagem monocítica humana – THP-1 em microplacas de 96 poços .....	44
<b>Figura 12</b> – Processo de infecção com <i>Leishmania</i> spp. e tratamento frente células pertencentes a linhagem monocítica humana – THP-1 .....	44
<b>Figura 13</b> - Construção das curvas analíticas em espectrofotometria UV-Vis, utilizando o espectrofotômetro UV- M51 (Bel). .....	47
<b>Figura 14</b> – Estrutura química do eudragit RS100 .....	48
<b>Figura 15</b> – Estrutura química do Propilenoglicol .....	48
<b>Figura 16</b> – Processo para preparação do filme polimérico .....	49
<b>Figura 17</b> – Dessecação da pele de orelha de suíno .....	50
<b>Figura 18</b> – Representação ilustrativa da célula de difusão de Franz. ....	51
<b>Figura 19</b> – Representação ilustrativa do sistema de permeação cutânea, adaptado, com célula de difusão vertical de Franz.....	51
<b>Figura 20</b> – Representação ilustrativa da coleta e quantificação das amostras .....	52
<b>Figura 21</b> – Ensaio de retenção cutânea .....	53
<b>Figura 22</b> – Processo de infecção e avaliação da lesão em Balb/c com <i>L. (L.) amazonensis</i> .	54
<b>Figura 23</b> – Fluxograma dos dias de tratamento com adesivos dérmicos, tipo filme, incorporados com Pellitorine, em Balb/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	54
<b>Figura 24</b> – Grupos de tratamento .....	55

<b>Figura 25</b> – Determinação do efeito citotóxico da pellitorina (A) e S4 (B), frente a linhagem monocítica humana THP-1 e a de fibroblastos murina L929, após 77 horas de incubação através do ensaio de resazurina.....	57
<b>Figura 26</b> – Curva de crescimento das cepas <i>L. (L.) amazonensis</i> (IFLA/BR/67PH8), <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> MHOM/BR/2014/310 (RO-310), e <i>L. (L.) infantum</i> (MHOM/BR/1972/LD), para avaliação e determinação da fase estacionária.....	59
<b>Figura 27</b> – Avaliação leishmanicida da substância hexametoxilobelanina, frente amastigotas de <i>L. (L.) infantum/chagasi</i> , tratadas por 72 horas. ....	60
<b>Figura 28</b> – Avaliação leishmanicida da substância pelitorina, frente amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensi</i> e <i>L. (L.) infantum/chagasi</i> , tratadas por 72 horas. ....	61
<b>Figura 29</b> – Curvas de calibração das substâncias S4 e pelitorina, obtidas pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta.....	63
<b>Figura 30</b> – Filme polimérico produzido e sistema de permeação cutânea, adaptado, com célula de difusão vertical de Franz.....	63
<b>Figura 31</b> – Perfil de permeação <i>in vitro</i> das substâncias S4 e pelitorina, incorporadas na formulação matricial em filme, utilizando pele de <i>Sus scrofa domesticus</i> (porco).....	64
<b>Figura 32</b> – Quantidade das substâncias hexametoxilobelanina – S4 e pelitorina, retidas após 12 horas em contato com a pele de <i>Sus scrofa domesticus</i> (porco).....	65
<b>Figura 33</b> – Tamanho médio das lesões do dorso dos camundongos Balb/c após inoculação de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados ou não com pellitorina ou S4 em formulação matricial tipo filme via transdérmica e da anfotericina B (via intraperitoneal). ....	66
<b>Figura 34</b> – Avaliação indireta da carga parasitária através da URF (Unidade Relativa de Fluorescência) em lesões do dorso de camundongos fêmeas BALB/c infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratadas com pellitorine formulação matricial tipo filme (via transdérmica) e da anfotericina B (via intraperitoneal).....	67
<b>Figura 35</b> – Concentrações séricas da ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) de animais Balb/c infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> tratados e não tratados com Pellitorine em formulação matricial do tipo filme (via transdérmica) e anfotericina B (via intraperitoneal).....	68

**LISTA DE TABELAS E QUADROS**

<b>Tabela 1</b> – Espécies de <i>Leishmania</i> envolvidas na transmissão humana .....	20
<b>Tabela 2</b> – Formulação utilizada na produção do filme polimérico .....	49
<b>Tabela 3</b> – Índice de seletividade da S4 para <i>Leishmania</i> spp. em relação ao macrófago de linhagem monocítica humana- THP-1 e as células fibroblásticas de linhagem L929.....	60
<b>Tabela 4</b> - Índice de seletividade obtido através da razão do CC <sub>50</sub> da pelitorina para macrófago de linhagem monocítica humana- THP-1 e células fibroblásticas de linhagem L929, e IC <sub>50</sub> frente <i>Leishmania</i> spp.....	62
<b>Tabela 5</b> – Resultados obtidos, durante a avaliação da permeabilidade das substâncias hexametoxilobelanina – S4 e pelitorina, através da pele de orelha suína, após quantificação em espectrofotômetro direto no ultravioleta.....	65
<b>Quadro 1</b> – Quimioterapia utilizada no tratamento das leishmanioses .....	25

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 Objetivo geral .....	18
1.2 Objetivos específicos .....	19
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
1.3 Leishmanioses .....	20
1.3.1 Aspectos gerais .....	20
1.3.2 Estágios morfológicos e ciclo biológico .....	22
1.3.3 Leishmaniose tegumentar (LT) e as manifestações clínicas .....	24
1.3.4 Tratamento para leishmanioses .....	25
1.3.5 Hexametoxilobelanina (CID: 4613574) e pelitorina (CID: 5318516) ....	28
1.4 Pele como via de administração de fármacos .....	30
1.4.1 Pele.....	30
1.4.2 Vias de penetração das substâncias através da pele.....	31
1.4.3 Pele infectada por <i>Leishmania</i> spp.....	33
1.5 SISTEMAS DE ENTREGA TRANSDÉRMICA - TDDS.....	34
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
1.6 Obtenção e solubilização das substâncias .....	38
1.7 Manutenção e determinação das curvas de crescimento de <i>Leishmania</i> spp .	38
1.8 Manutenção e determinação da citotoxicidade em células de linhagem murina de fibroblastos - L929.....	39
1.9 Manutenção e determinação da citotoxicidade em células de linhagem monocítica humana- THP-1 .....	41
1.10 Infecção de macrófagos, determinação da concentração inibitória para 50% das amastigotas e índice fagocítico de <i>Leishmania</i> spp.....	42
1.11 Determinação do índice de seletividade .....	45
1.12 Avaliação <i>in silico</i> das propriedades físico-químicas das substâncias relacionadas a permeação cutânea .....	46
1.13 Quantificação das substâncias hexametoxilobelanina (S4) e pelitorina .....	46
1.14 Construção da curva analítica para hexametoxilobelanina (S4) e pelitorina.	46
1.15 Produção dos filmes poliméricos .....	47
1.16 Processo para preparação do filme polimérico .....	48
1.17 Ensaios de permeação e retenção cutânea .....	49
1.17.1 Montagem das células de Franz .....	50
1.17.2 Coleta e quantificação das amostras .....	52
1.17.3 Retenção cutânea.....	52
1.18 Ensaios <i>in vivo</i> .....	53
1.18.1 Infecção dos camundongos Balb/c e acompanhamento da espessura da lesão.....	53
1.18.2 Tratamento transdérmico .....	54

1.18.3	Quantificação da carga parasitária e avaliação dos fatores bioquímicos	55
1.19	Análise estatística dos dados.....	56
<b>RESULTADOS</b> .....		57
1.20	Atividade citotóxica das substâncias .....	57
1.21	Curva de crescimento das cepas de <i>Leishmania</i> spp. ....	58
1.22	Atividade leishmanicida da S4 contra formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp. 59	
1.23	Atividade leishmanicida da pelitorina contra formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp.....	61
1.24	Avaliação da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> das substâncias .....	62
1.24.1	Análise da curva analítica das substâncias.....	62
1.24.2	Análise da permeação e retenção das substâncias .....	63
1.24.3	Determinação dos parâmetros de permeação das substâncias .....	65
1.25	Atividade leishmanicida <i>in vivo</i> .....	66
<b>DISCUSSÃO</b> .....		70
<b>CONCLUSÃO</b> .....		76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		77

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças de caráter antroponóico, com alta prevalência em regiões subtropicais, sendo reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada (OMS, 2023). Essas são causadas por protozoários heteroxênicos pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. Os vetores da *Leishmania* são insetos hematófagos, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos como flebotomíneos (GALATI, 2003; BRASIL, 2017).

Em seu ciclo de vida, esse parasito está presente em duas formas: promastigota e amastigota. O vetor inocula a promastigota em estágio metacíclico na pele do hospedeiro, essa é fagocitada principalmente por macrófagos, a qual se transforma em amastigota, se multiplicando e infectando outros macrófagos (GALATI, 2003; BRASIL, 2017).

A forma grave da doença é a leishmaniose visceral (LV), que afeta órgãos internos vitais, como baço e fígado, bem como, medula óssea e linfonodos. Além disso, essa forma clínica pode levar o paciente a óbito, quando não tratada corretamente (ZACARIAS *et al.*, 2017). Endêmica em 78 países, em 2021 foram relatados 11.687 novos casos em todo o globo. No continente americano, há registro desta forma em pelo menos 13 países, e neste mesmo ano, dos 1.799 casos autóctones registrados na América Latina, 93,05 % (1.683) foram do Brasil (OPAS, 2022).

Outra forma clínica, foco do presente estudo, é a leishmaniose cutânea (LC), também conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA). Com evolução crônica, a doença acomete as estruturas cartilagosas da nasofaringe e da pele. Considerada uma doença cosmopolita, ela é endêmica em 87 países, com uma incidência anual de casos entre 600 mil e 1 milhão (OMS, 2023; BRASIL, 2017).

Em 2021, foram registrados um total de 484.406 novos casos globais de LTA (OMS, 2023). De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, neste mesmo ano o país registrou 15.023 novos casos de LTA. Devido a sua epidemiologia, e os registros de casos autóctones em todos os estados da federação e no Distrito Federal, ela é uma das endemias de maior importância no país (BRASIL, 2022).

A maioria dos casos de LTA, correspondem a leishmaniose cutânea localizada (LCL), caracterizada por uma única úlcera na pele que pode regredir espontaneamente. No entanto, alguns pacientes podem desenvolver a leishmaniose mucosa (LM), uma evolução da LC, que geralmente ocorre após meses e até anos da resolução da LC, devido ao tratamento inadequado,

interrompido ou inexistente, que pode causar a destruição da mucosa nasal. A leishmaniose cutânea disseminada (LCDi) é uma expressão incomum que pode ser observada em até 2% dos casos e ocasiona lesões cutâneas múltiplas em várias partes do corpo, lesões papulosas e acneiformes disseminadas ao longo dos vasos linfáticos. Além disso, são encontradas formas disseminadas cutâneas, infiltrativas e não-ulcerosas com caráter evolutivo crônico (leishmaniose cutânea difusa - LCD), geralmente ocorre em indivíduos anérgicos, que apresentam ausência de resposta celular específica para antígenos de *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2017).

Todas as infecções de leishmanioses são tratáveis e curáveis, contudo, a eficácia do tratamento depende de alguns fatores importantes, tais como, o sistema imunológico do paciente. A taxa de recuperação é melhor em usuários que aderem totalmente ao tratamento e que apresentam um sistema imunocompetente, pois os fármacos não eliminam o parasito (BRASIL, 2022; OMS, 2023). Por isso, é fundamental a adoção do tratamento completo, problemática intensificada pelos efeitos colaterais, tempo e vias de aplicação dos fármacos disponíveis.

Apesar de existirem fármacos dirigidos à resolução desta doença, as opções são limitadas e contrastam com o caráter endêmico da leishmaniose e a carência de recursos para o desenvolvimento de novos fármacos. Os fármacos antimoniais, incorporados como quimioterápicos para leishmaniose na década de 1940, ainda representam o tratamento de primeira linha para todas as formas da doença na maior parte do mundo. Entretanto, desde 1997 há indícios de falhas terapêuticas ligadas ao uso de antimoniais, além de efeitos adversos graves (PONTE-SUCRE *et al.* 2017; EDDAIKRA *et al.* 2018).

Diante das complicações, o desenvolvimento de tecnologias que visem o uso de dispositivos que possibilitem a administração de medicamentos com sistemas que tratam o local afetado pela doença e melhore a qualidade de vida do usuário, são desejáveis. Há registros da importância dos sistemas de liberação de fármacos, considerando que eles mantêm as concentrações plasmáticas em níveis terapêuticos por um longo período, controlando a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*. Essas inovações são alvo de parte dos estudos da indústria farmacêutica. Sendo assim, esses sistemas ocupam uma posição interessante devido às vantagens biofarmacotécnicas e terapêuticas que apresentam (PEPPAS, 2006; PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; HAMIDIAN; TAVAKOLI, 2016).

## 1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida da substância hexametoxilobelanina e da amida pelitorina *in vitro* e investigar a potencial aplicação tópica *in vivo*.

## 1.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) da hexametoxilobelanina (S4) e da pelitorina frente a linhagem murina de fibroblastos L929;
- Determinar a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) da S4 e da pelitorina frente a linhagem monocítica THP-1;
- Estimar a concentração da pelitorina que inibe 50% das formas amastigotas (IC<sub>50</sub>), em monócitos humanos THP-1 experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Vianna) braziliensis* e *L. (L.) infantum/chagasi*;
- Estimar a concentração da S4 que inibe 50% das formas amastigotas (IC<sub>50</sub>), em monócitos humanos THP-1 experimentalmente infectados com *L. (Vianna) braziliensis* e *L. (L.) infantum/chagasi*;
- Calcular o índice de seletividade determinando a razão entre os valores de CC<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> da S4 e da pelitorina;
- Desenvolver uma matriz polimérica tipo filme contendo S4 ou pelitorina;
- Avaliar a permeação cutânea *in vitro* da S4 e da pelitorina a partir do filme desenvolvido em modelo de estudos com células de difusão vertical de Franz, usando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) como membrana natural;
- Avaliar a retenção cutânea *in vitro* da S4 e da pelitorina.
- Avaliar a evolução das lesões cutâneas em camundongos da linhagem BALB/c causadas pela infecção por *L. (L.) amazonensis in vivo* antes e durante o tratamento com e sem adesivos desenvolvidos a partir da matriz polimérica tipo filme contendo S4 ou pelitorina;
- Quantificar a carga parasitária de *Leishmania* da lesão e linfonodo de camundongos Balb/c após o tratamento com e sem adesivos desenvolvidos a partir da matriz polimérica tipo filme contendo S4 ou pelitorina;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos pós-tratamento com as substâncias.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Leishmanioses

#### 2.1.1 Aspectos gerais

A leishmaniose é uma doença tropical e subtropical causada por um parasita intracelular e transmitida aos seres humanos através da picada de flebotomíneos (fêmeas), principalmente pelos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (GABRIEL *et al.*, 2019; FLAIH, 2022; OMS, 2022).

Considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das sete doenças tropicais mais importantes, a leishmaniose representa um grave problema de saúde pública mundial (OMS, 2023).

Endêmica em áreas geográficas circunscritas no nordeste da África do Sul, Sul da Europa, Oriente Médio, sudeste do México e América Central e América do Sul, a doença é encontrada em todos os continentes, com exceção da Oceania, e atualmente mais de 1 bilhão de pessoas estão expostas ao risco de infecção. Estima-se que, anualmente, ocorram cerca de 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea (GABRIEL *et al.*, 2019; OMS, 2023). Essas doenças são causadas por 20 das 30 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), as mais conhecidas e envolvidas na transmissão humana são apresentadas na tabela 1 (Adaptado de OMS, 2010).

**Tabela 1** – Espécies de *Leishmania* envolvidas na transmissão humana

Localização	Subgênero <i>Leishmania</i>	Subgênero <i>Viannia</i>
Velho Mundo <sup>1</sup>	<i>L. donovani</i>	
	<i>L. major</i>	
	<i>L. tropica</i>	
	<i>L. killicki</i>	
	<i>L. aethiopica</i>	
	<i>L. infantum/chagasi</i>	
Novo Mundo <sup>2</sup>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>L. infantum/chagasi</i>	<i>L. panamensis</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. shawi</i>
	<i>L. pifanoi</i>	<i>L. naïffi</i>
	<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. lainsoni</i>
	<i>L. garnhami</i>	<i>L. lindenbergi</i>
		<i>L. peruviana</i>
	<i>L. colombiensi</i>	

**Nota:** <sup>1</sup>Europa, África e Ásia; <sup>2</sup>Américas.

**Fonte:** Traduzido e adaptado OMS (2010).

A doença possui um espectro de manifestações clínicas, com diferentes níveis de gravidade que dependem da espécie envolvida e da resposta imune do hospedeiro, e em alguns casos pode ter um desfecho potencialmente fatal (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; OMS, 2022).

A divisão atual desse grupo de doenças segundo a OMS, consiste em: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), (nas Américas essas manifestações clínicas também são descritas como leishmaniose tegumentar americana), e leishmaniose visceral (LV) (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; FLAIH, 2022; BRASIL, 2017; OMS, 2023).

A leishmaniose cutânea é considerada a forma mais comum de infecção por *Leishmania* (BRASIL, 2017). Ela é reconhecida como uma doença endêmica oscilante, não controlada, que atinge a pele causando uma lesão dérmica, afetando aproximadamente 0,7 milhão a 1,2 milhão de seres humanos (BRASIL, 2017; OMS, 2023).

A LC está presente no sul dos Estados Unidos da América, onde casos pontuais foram relatados nos estados do Texas e Oklahoma. Na América Central e do Sul, a maioria dos casos de LC notificados são do Brasil e Peru. No Velho Mundo, as notificações são ao Norte e Leste da África, no Oriente Médio e na Ásia Ocidental e do Sul, como ilustrado na figura 1 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ALVAR *et al.*, 2012; GABRIEL *et al.*, 2019; OPAS, 2021; OMS, 2023).

**Figura 1** – Distribuição mundial da leishmaniose cutânea



**Fonte:** GABRIEL *et al.* (2019).

Nessas áreas, algumas cidades apresentam taxas de notificação muito altas para novos casos de LC, como Aleppo (Síria, Ásia Ocidental) com cerca de 12.000 novos casos a cada ano (GABRIEL *et al.*, 2019). Na América do Sul, a doença é generalizada. Países como: Bolívia, Brasil e Peru apresentam os maiores registros de leishmaniose mucocutânea (LMC) (OPAS, 2021; OMS, 2023).

### 2.1.2 Estágios morfológicos e ciclo biológico

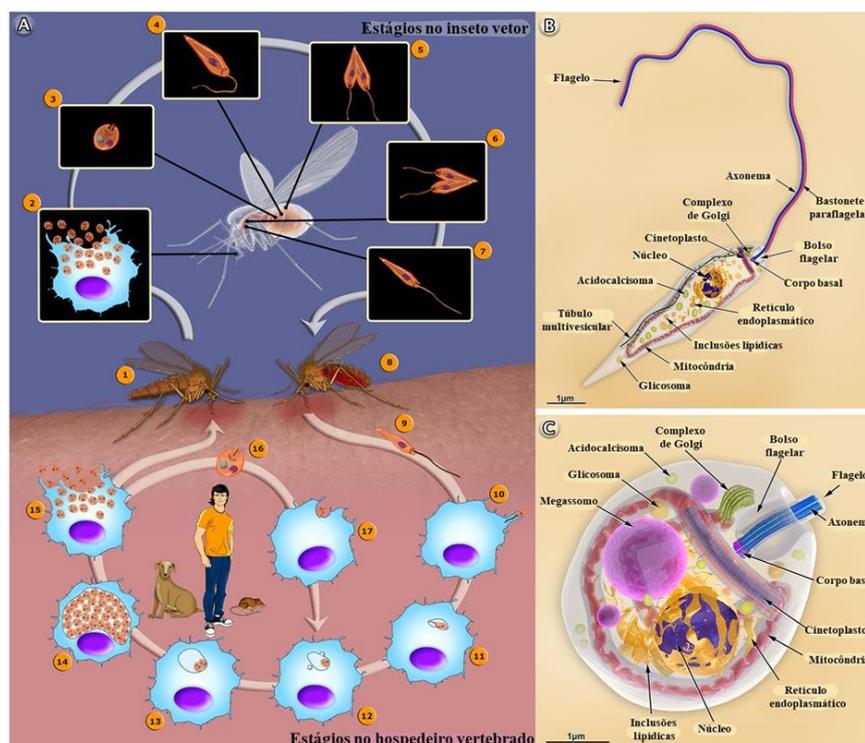
O ciclo de vida do parasito causador da leishmaniose humana envolve a infecção de dois hospedeiros: os humanos e as fêmeas dos flebotomíneos (Figura 2A). Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um ciclo de vida dividido em dois estágios: promastigotas e amastigotas (Figura 2B; 2C) (TEIXEIRA *et al.*, 2013; OMS, 2023).

Encontradas no intestino do inseto vetor, as promastigotas são móveis, alongadas, com a presença de flagelos externalizados que conferem mobilidade ao parasito. Elas sobrevivem em temperaturas entre 25-26 °C e sob condições de pH básico; têm aproximadamente entre 10 e 15 µm de comprimento e 1,5 a 3,5 µm de largura, e podem variar de acordo com a espécie (BARRAL-NETTO *et al.*, 1986; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

Sem movimento e com presença de flagelo curto internalizado, as amastigotas são formas exclusivamente intracelulares, que se desenvolvem no interior do vacúolo parasitóforo formado no citoplasma de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero. Dependendo da espécie e cepa, elas podem medir entre 2 e 4 µm de comprimento. Tipicamente ovóides e arredondadas, elas sobrevivem em temperaturas entre 30-37 °C sob condições de pH ácido, diferentes condições nutricionais e baixos níveis de O<sub>2</sub> (BARRAL-NETTO *et al.*, 1986; PAN *et al.*, 1993; PIMENTA; FREITAS; DE SECUNDINO, 2012).

Semelhante para todas as espécies, o ciclo biológico da *Leishmania* tem início com o repasto sanguíneo, como demonstrado na figura 2A.

**Figura 2** – Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania* spp.



**Nota:** (A) representa o ciclo biológico - (1) Flebotomíneo realizando o repasto sanguíneo. (2) Macrófagos infectados com formas amastigotas. (3) Forma amastigota. (4) Amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas. (5) Promastigotas procíclicas se multiplicam no intestino médio. (6) Os promastigotas migram em direção à válvula estomodal no intestino médio anterior e reiniciam a divisão celular. (7) Os promastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicas infecciosas. (8) A fêmea do flebotomíneo libera os promastigotas metacíclicos em um novo hospedeiro mamífero por meio de regurgitação durante o repasto sanguíneo. (9) Promastigotas metacíclicos. (10) Promastigotas metacíclicos infectam macrófagos. (11) As promastigotas metacíclicas transformam-se em amastigotas. (12) Amastigotas aderem à membrana do vacúolo parasitóforo. (13) Amastigotas se multiplicam no vacúolo. (14) Multiplicação intensa de amastigotas. (15) Amastigotas saem da célula. (16) Forma amastigota. (17) Um amastigota infecta um macrófago. (B) forma promastigota; e (C) forma amastigota.

**Fonte:** Teixeira *et al.* (2013).

Os flebotomíneos inoculam de sua probóscide na derme do hospedeiro mamífero aproximadamente de 10 a 100 formas promastigotas metacíclicas flageladas de *Leishmania* juntamente com a saliva. Posteriormente, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear e se diferenciam em formas amastigotas. Estas, por sua vez, se multiplicam por divisão binária simples e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares (SCHLEIN, 1993).

Após um novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, as fêmeas dos flebotomíneos podem ingerir células infectadas, e por ação de enzimas digestivas, as células infectadas se rompem e liberam as amastigotas. Nesta fase, as amastigotas novamente se diferenciam em promastigotas, que se ligam à superfície intestinal dos insetos e se multiplicam. Em seguida, as promastigotas migram para a probóscide, onde serão capazes de infectar novo

hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (TEIXEIRA *et al.*, 2013; CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2017).

### 2.1.3 Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e as manifestações clínicas

As espécies *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* são os principais agentes causadores da LT (PACE, 2014; OPAS, 2021; OMS, 2022).

No Brasil, a maior parte dos casos de LTA é associado à espécie *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2017; OPAS, 2021). Cumpre destacar que, dependendo da região, pode haver diferentes prevalências entre as espécies. A infecção por *L. (V.) braziliensis* é responsável pelas formas mais graves da doença, incluindo a forma mucosa na região Norte do Brasil (COSTA *et al.*, 2009; ITO *et al.*, 2015; BRASIL, 2017).

As formas clínicas da LTA são: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose disseminada (LCDi) e leishmaniose cutânea difusa (LCD), cujas imagens podem ser observadas na figura 3 (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; BRASIL, 2017).

**Figura 3**– Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar



**Nota:** A: representa a leishmaniose cutânea localizada; B: representa a leishmaniose mucocutânea; C: representa a leishmaniose disseminada; D: representa a leishmaniose cutânea difusa.

**Fonte:** A- da autora; B- Santos *et al.* (2013); C – Brasil (2017); D – Costa *et al.* (2009).

A LCL é o do tipo mais comum entre as formas clínicas, representando a maior parte dos novos casos. Os agentes etiológicos considerados como os principais causadores de LCL para o homem são *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, em geral, com múltiplas lesões. *L. (L.) amazonensis* também é responsável por casos de LCL, na maioria das vezes, com lesões únicas, ulceradas e com bordas mais infiltradas. A lesão inicia-se no ponto de inoculação das promastigotas infectantes através da picada do vetor. As ulcerações possuem bordas elevadas e tecido de granulação grosseira, configurando a clássica lesão com borda arredondada ou

ovalada (Figura 3A). Apresenta boa resposta ao tratamento atual, e a maioria dos casos, a lesão tende a cura espontânea após um ou dois anos (COSTA *et al.*, 2009; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; BRASIL, 2017; OMS, 2023).

A LMC acomete mais comumente nariz, boca (lábios, palato duro, palato mole) e garganta, com lesões destrutivas. Geralmente os casos de LMC são resultantes de evolução crônica da LCL, após cura clínica espontânea ou tratamento farmacológico inadequado. À medida que a LMC progride, os pacientes podem apresentar acometimento faríngeo e laríngeo e sintomas dolorosos. Por vezes, ocorre uma congestão nasal que dificulta a respiração; a doença também compromete a vocalização e a deglutição. Seus principais agentes etiológicos são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*, existem casos de LMC causados por *L. (L.) amazonensis* (Figura 3B) (COSTA *et al.*, 2009; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; BRASIL, 2017).

A LCDi lesiona os vasos linfáticos. Nessa forma clínica, as lesões cutâneas são papulosas e aparecem em várias partes do corpo. Há uma baixa resposta ao tratamento. Uma característica da LCDi é a escassez de parasitos na lesão. Podendo ser causada por *L. (L.) amazonensis*, ela também é associada à infecção por *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (Figura 3C) (COSTA *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

A forma clínica mais rara, porém, a mais grave, é a LCD (Figura 3D). Nestes casos, ocorre deficiência específica na resposta imune celular do hospedeiro a antígenos de *Leishmania*. Por isso, ocorre o aparecimento de múltiplas lesões, que podem variar (de >10 a centenas) em diferentes partes do corpo. No Brasil, os casos estão associados exclusivamente à espécie *L. (L.) amazonensis* (COSTA *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

#### 2.1.4 Tratamento para leishmanioses

Há aproximadamente sessenta anos o tratamento clássico para todas as formas dessa parasitose consiste nos seguintes fármacos: antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (Pentostan) e antimoniato de meglumina (Glucantime). Mesmo com grande prevalência, poucos avanços foram obtidos no tratamento das leishmanioses. Outros fármacos como: anfotericina B lipossomal, desoxicolato de anfotericina B, isetionato de pentamidina, pentoxifilina e paromomicina (Quadro 1) foram reposicionados para a quimioterapia das leishmanioses (RATH *et al.*, 2003; SILVA, 2021).

**Quadro 1**– Quimioterapia utilizada no tratamento das leishmanioses

FÁRMACO	VIA	EFICÁCIA	VANTAGENS	LIMITAÇÕES/
---------	-----	----------	-----------	-------------

				<b>DESVANTAGENS</b>
Antimoniais	EV, IM ou IL.	35-95%	Baixo custo, usados em combinação com Anfotericina B em pacientes idosos e gestantes.	Resistência na Índia, cardiotoxicidade, mialgia, pancreatite, hepatotoxicidade, dor abdominal, toxicidade elevada em pacientes HIV positivo.
Anfotericina B lipossomal;  Desoxicolato de anfotericina B.	EV	~100%	Efetivo em cepas resistentes a Sb <sup>5+</sup> .	Alto custo, nefrotoxicidade, miocardites, hipocalcemia, reações anafiláticas e flebite no local da infusão.
Isetionato de pentamidina	EV ou IM	35-96%	Potencial para uso em terapia combinatória em baixas doses, eficácia clínica limitada.	Nefrotoxicidade, miocardites, febre, hipoglicemia, hipotensão, taquicardia, diabetes, dor no local da injeção.
Pentoxifilina	VO	Imunomodulador sem ação leishmanicida, uso recomendado exclusivamente em associação com o Antimônio para o tratamento da LM.	Eleva a taxa de cura do Sb <sub>v</sub> na LM.	<i>Flush</i> (rubor facial com sensação de calor) e distúrbios gastrintestinais como sensação de pressão gástrica, plenitude, náusea, vômito ou diarreia.
Paromomicina (pomada 5% de paromomicina e 12% de cloreto de metilbenzetônio)	IM, tópica (para tratamento de LCL)	Tópico, duas vezes ao dia por 20 dias.	Pode ser usado em combinação, baixo custo, efetivo, bem tolerado, tempo de tratamento reduzido.	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, edema e irritação no local da administração.
Miltefosina	VO	100-150 mg/kg/dia durante 28 dias. 2,5mg/kg/dia (Nota Informativa nº 13/2020 – MS/BRASIL)	Único medicamento de via oral.	Alto custo, variação de sensibilidade entre diferentes espécies/cepas, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, teratogenicidade, complicações gastrintestinais, eficácia clínica limitada e falhas terapêuticas para LC.

**Nota:** EV: endovenosa; IL: intralesional; IM: intramuscular; VO: via oral.

**Fonte:** Elaborada pela autora com base nos dados de MENEZES *et al.* (2015); BRASIL (2017); BRASIL (2020a); BRASIL (2020b); SILVA (2021).

A maioria dos fármacos apresentados no quadro acima, estão associados à alta toxicidade hepática e renal, alto custo e administração prolongada, o que dificulta a conclusão do tratamento, podendo levar ao desenvolvimento de resistência (RATH *et al.*, 2003).

Incorporado ao Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil em 2018, o fármaco miltefosina (hexadecilfosfocolina) é indicado como primeira linha no tratamento da leishmaniose tegumentar (Portaria nº 56/2018 BRASIL, 2018).

A Nota Informativa nº 13, publicada em 2020, orienta o uso de miltefosina com cautela na administração para a forma mucocutânea, casos de coinfeção e pacientes pediátricos. No caso dos pacientes imunocomprometidos, a recomendação é que seja utilizado somente em caso de falha terapêutica do tratamento convencional (BRASIL, 2020b). Esse fármaco continua não sendo recomendado a nutrízes e gestantes, devido ao seu efeito tóxico e teratogênico. Pacientes em idade fértil que venham a fazer uso da medicação, deverão realizar teste de gravidez antes de iniciar o tratamento, além disso, deverão utilizar métodos contraceptivos altamente efetivos por um período de 30 dias antes do tratamento. A paciente não deve abandonar o método contraceptivo durante o tratamento e 4 meses após o término dele (BRASIL, 2020b).

Existe a necessidade de novos tratamentos com menores efeitos colaterais e maior facilidade de aplicação (AMEEN, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017). Nessa perspectiva, o Ministério da Saúde no Brasil preconiza a aplicação intralesional (IL) antimoniato de meglumina (AM) como à terapia intravenosa para os pacientes alternativos com a forma localizada (LCL) e recidiva cútis (LRC) da doença (BRASIL, 2017). As vantagens potenciais da abordagem intralesional decorreram do menor volume total infiltrado da medicação, o que em teoria, poderia reduzir a toxicidade sistêmica e a necessidade de monitoramento laboratorial e eletrocardiográfico (VASCONCELLOS, 2012; BRASIL, 2017).

Nesse contexto, a administração de fármacos pela via tópica é uma alternativa que vem sendo investigada nos últimos anos, principalmente para terapias de uso local e liberação de substâncias na circulação. A exemplo disso, estão os sistemas de administração transdérmica de fármacos, que já são aceitos como forma de conseguir a liberação de medicamentos para o sistema circulatório através da pele, sendo utilizados na medicina convencional para tratar hipertensão, distúrbios de movimento, dores crônicas, dependência à nicotina, entre outros (DIAS, 2013; SERAFIM *et al.*, 2013; SOARES, 2013; BRÁS, 2016).

Na LTA os parasitos estão na camada dérmica da pele, internalizados principalmente por macrófagos, bem como nas células de Langerhans, (que após fagocitarem as leishmânias, são levadas aos linfonodos de drenagem), o tecido infectado, pode potencialmente ser alcançado por substâncias aplicadas pela via tópica. Assim, os sistemas de administração transdérmica podem ser uma alternativa interessante no tratamento da doença, pois estes são menos invasivos, para usuários que apresentam restrições em relação ao tratamento convencional (via

intravenosa ou parenteral). Outras vantagens também são destacadas, como: evitar a perda da biodisponibilidade pela metabolização hepática; diminuição do número de doses em um tratamento de vários dias; e como se trata de um método indolor pode ser aplicado pelo próprio usuário, evitando traumas associados à terapia parental (TEIXEIRA *et al.*, 2013; SILVA, 2015; VAN BOCXLAER *et al.*, 2021).

Para ter êxito no tratamento da leishmaniose cutânea uma formulação tópica depende principalmente da potencial atividade antileishmania do princípio ativo e da quantidade de fármaco capaz de permear a pele e atingir os parasitos. Portanto, o uso de moléculas sintéticas comerciais testadas contra *Leishmania* spp. pode ser um aliado no desenvolvimento de tratamentos que visem a via tópica, pois otimiza o tempo para obtenção e produção de novos fármacos (CALDERON *et al.*, 2009).

### **2.1.5 Hexametoxilobelanina (CID: 4613574) e pelitorina (CID: 5318516)**

A substância hexametoxilobelanina, que será nomeada como S4 no decorrer do texto, é um derivado sintético do alcaloide lobelina. Este, pode ser encontrado em plantas pertencentes ao gênero *Lobelia*, dentre elas a *Lobelia inflata* com atividade contra *Staphylococcus aureus* relatada (OYEDEMI *et al.*, 2020).

No trabalho de Ireno *et al.* (2020), a substância lobelina foi descrita com potencial terapêutico no combate ao melanoma cutâneo em um ensaio *in vivo* com camundongos BALB/c.

O perfil farmacológico da lobelina também é descrito em estudos relacionados ao abuso de substâncias e distúrbios neurológicos (DWOSKIN; CROOKS, 2002; WILHELM *et al.*, 2008; CROOKS *et al.*, 2011; RONI; RAHMAN, 2013; MARTIN *et al.*, 2018).

Atualmente o único relato sobre a atividade biológica do derivado sintético S4 é de um estudo realizado pelo nosso grupo (CALDERON *et al.*, 2021). A investigação *in vitro* e *in vivo* mostrou êxito contra as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IC<sub>50</sub>= 10 µM) e no tratamento via intraperitoneal em camundongos BALB/c, infectados por essa mesma espécie. Foi verificada a diminuição significativa ( $p < 0,0001$ ) da carga parasitária, na concentração testada de 50 mg/Kg (CALDERON *et al.*, 2021).

A partir disso, essa substância, consideravelmente promissora, continuou sendo investigada no presente estudo contra outras espécies causadoras da doença, assim como, sua ação por outra via de administração importante e menos invasiva, a tópica.

Outro possível potencial para o tratamento dessa doença é a amida pelitorina, isolada de espécies vegetais, tais como *Piper nigrum*, *Zanthoxylum piperitum* e *Anacyclus pyrethrum*. A substância sintética também está disponível comercialmente.

A pelitorina apresentou permeação intestinal e da barreira hematoencefálica, indicando potencial no tratamento de doenças do sistema nervoso central (VERYSER *et al.*, 2016).

Os possíveis efeitos de pelitorina foram investigados pelo estudo de Lee e colaboradores (2013), onde demonstraram que a substância protege a integridade da barreira vascular inibindo a hiperpermeabilidade, expressão de moléculas de adesão celular (CAMs), adesão e migração de leucócitos, endossando sua utilidade como terapia para doenças inflamatórias.

O potencial larvicida da pelitorina foi demonstrado frente mosquito *Aedes aegypti*, quando usada em combinação com a substância (-) - asarinina, contra larva de *Culex pipiens*, assim como, em larvas e insetos adultos da espécie *Anopheles gambiae* (PARK *et al.*, 2002; PARK, 2011; PERUMALSAMY *et al.*, 2012; PERUMALSAMY *et al.*, 2013; MOUSSAVI *et al.*, 2015).

Quando testada em combinação com o fármaco eritromicina, contra *Staphylococcus aureus*, foi verificada uma redução de oito vezes na concentração inibitória mínima necessária da eritromicina para inibir o crescimento dessa espécie bacteriana. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que o principal mecanismo de ação da substância envolve o comprometimento constante da produção de adenosina trifosfato (ATP) em *S. aureus* (AHIRRAO *et al.*, 2020).

Em ensaios parasitários, a substância foi ativa contra *Plasmodium falciparum* (IC<sub>50</sub> = XX) (ALTHAUS *et al.*, 2014; GOODMAN *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2018). A pelitorina apresentou IC<sub>50</sub> de 26,84 µg/mL para promastigotas de *L. (V.) guyanensis* (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

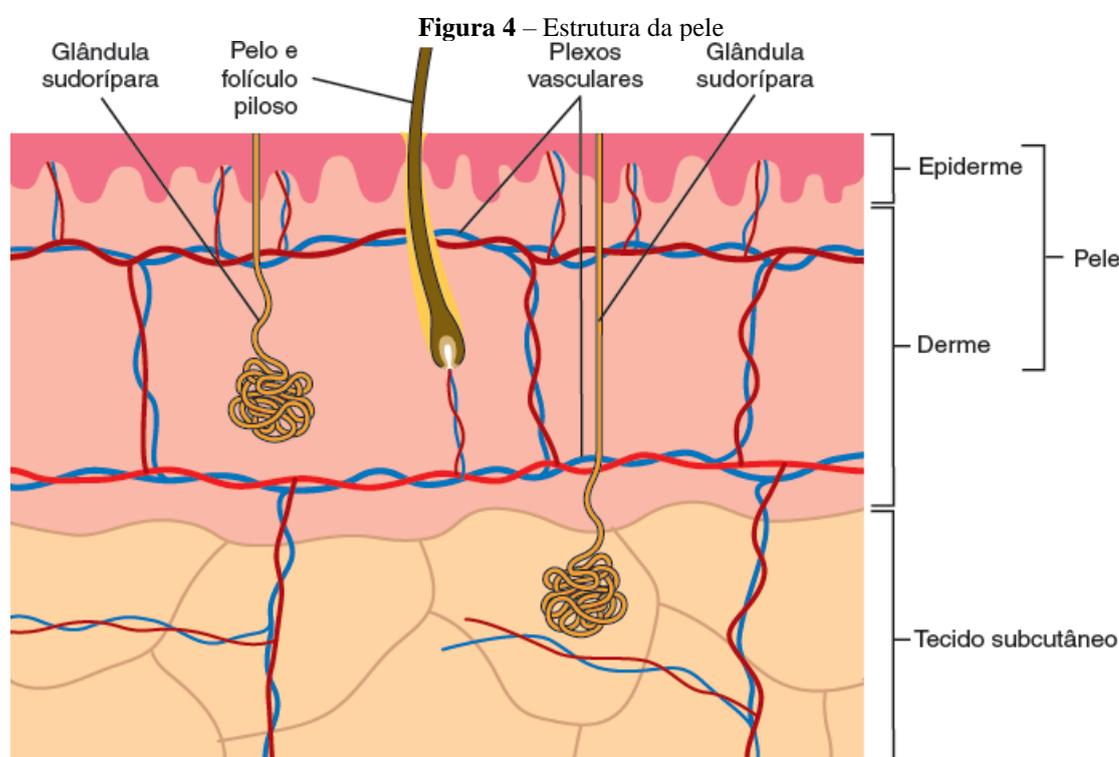
Outra informação importante é trazida no estudo de Veryser *et al.* (2014), no qual apresentaram resultados de um experimento in vitro com pele humana, neste, a pelitorina foi capaz de atravessar o estrato córneo e alcançar posteriormente a epiderme e a derme viáveis. Tendo em vista que, na LTA os parasitos se encontram na derme internalizados por macrófagos, os resultados da investigação citada acima, sugerem que a substância é uma potencial candidata a investigação para tratamento tópico.

Ademais, nosso grupo de pesquisa já demonstrou em estudos anteriores a atividade leishmanicida in vitro de outras amidas contra *L. (V.) braziliensis*. As amidas avaliadas, foram capazes de inibir 50% das formas amastigotas com concentrações (IC<sub>50</sub>) entre 1,46 µM e 16,7 µM, além de apresentarem baixa toxicidade em algumas células de linhagem (THP-1, J774, Vero e HepG2) (SILVA, 2021).

## 2.2 Pele como via de administração de fármacos

### 2.2.1 Pele

A pele, o maior órgão do corpo humano com uma área de aproximadamente 1,5 a 2,0 m<sup>2</sup>, no indivíduo adulto, exerce diversas funções, tais como, vigilância imunológica, sensibilidade, termorregulação, proteção contra agressões externas (químicas, físicas e biológicas), além de evitar a perda de água do corpo para meio externo. Ela é composta por três camadas intimamente ligadas entre si: epiderme, derme e hipoderme, (Figura 4) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RIVITTI, 2014).

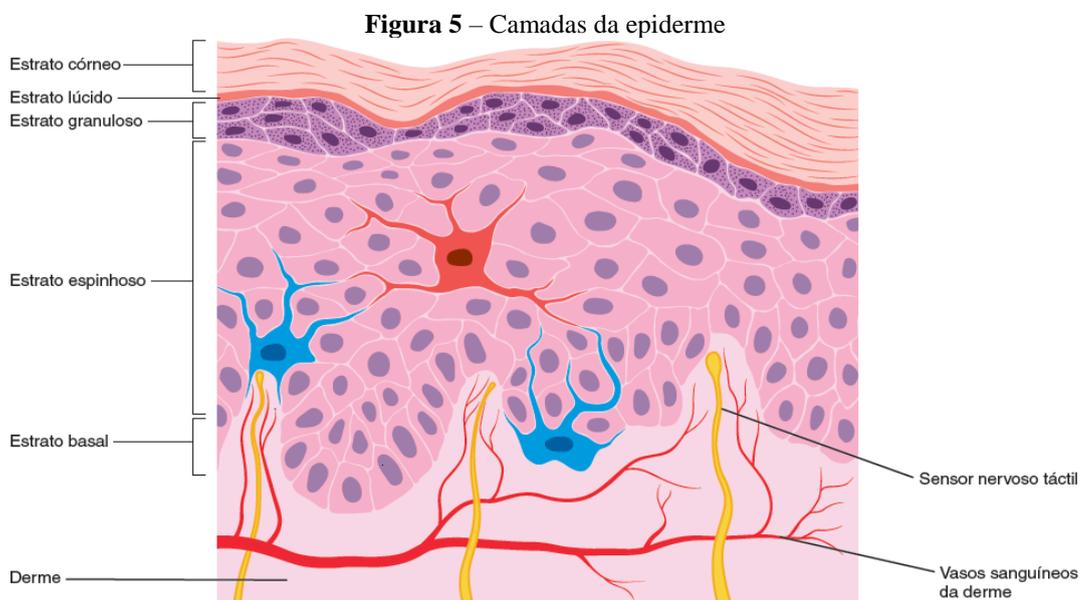


Fonte: ABRAHAMSOHN, 2016.

A epiderme é a camada mais externa, apresenta inúmeros tipos de células, como, melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel, mas principalmente queratinócitos, responsáveis pela resistência estrutural e características de permeabilidade da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RIVITTI, 2014).

A epiderme é constituída por cinco camadas – i) basal (permeável, fornece suporte à epiderme e estabelece a união com a derme, sendo formada por células cuboides, os queratinócitos basais), ii) espinhosa (contém células poliédricas unidas por junções intercelulares, os desmossomos), iii) granulosa (rica em lipídios, formada por células poligonais achatadas que acumulam grânulos de querato-hialina), iv) lúcida (composta por uma delgada

camada de células achatadas, anucleadas, translúcida e eosinófilas) e v) córnea (consiste de células achatadas, anucleadas, sem organelas, com membrana celular espessa e citoplasma rico em queratina), como mostrado na figura 5 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RIVITTI, 2014).



**Fonte:** ABRAHAMSOHN, 2016.

Formando um tecido de sustentação da epiderme, encontra-se a derme, um tecido conjuntivo composto por fibras proteicas e de reticulina, terminações nervosas, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, vasos sanguíneos e linfáticos que nutrem as células dérmicas e epidérmicas. Distintas células estão presentes nesta camada, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos, linfócitos T e células dendríticas, sendo os fibroblastos mais abundantes e que conferem resistência e elasticidade à pele, estando envolvidos por uma substância gelatinosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RIVITTI, 2014).

Por fim, a hipoderme é a camada mais profunda da pele, sendo organizada em lóbulos de gordura divididos por septos fibrosos compostos por colágeno, por onde correm onde correm nervos e vasos sanguíneos e linfáticos. Essa camada confere proteção contra traumatismo e variações térmicas, além de atuar como reserva energética (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; RIVITTI, 2014).

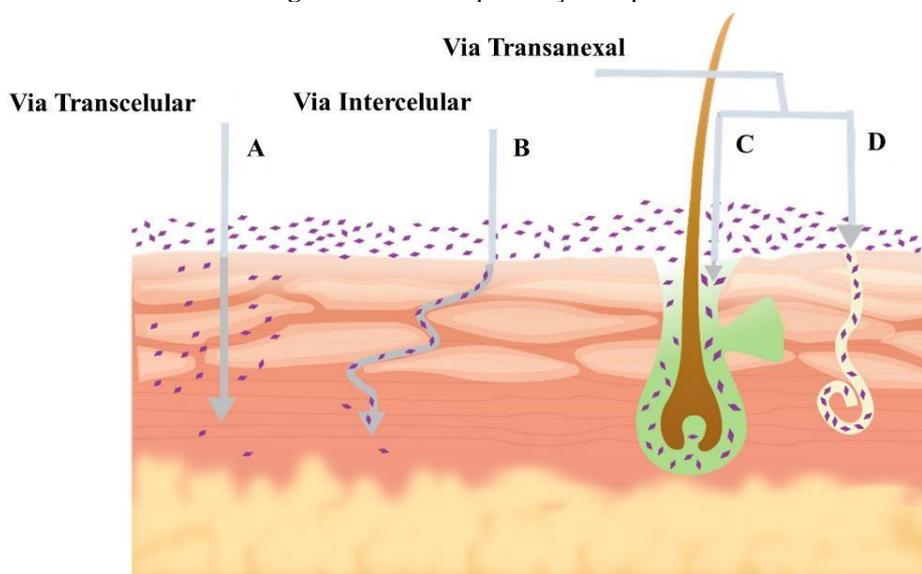
## **2.2.2 Vias de penetração das substâncias através da pele**

A administração de medicamentos através da pele tornou-se uma via importante no tratamento de doenças dermatológicas, assim como, de algumas doenças sistêmicas (VIEIRA, 2013; SHAHZAD *et al.*, 2015).

A permeação de uma substância ativa através da pele, ocorre inicialmente pela camada córnea essencialmente por meio de difusão passiva, sendo este um passo determinante no processo de absorção cutânea (BOUWSTRA *et al.*, 2003; KLOTA *et al.*, 2017). Existem três vias sugeridas pelas quais uma substância pode penetrar a camada córnea (Figura 6):

- i. Via Transcelular - substâncias polares, como a água, passam diretamente através das células cornoas e da matriz lipídica intercelular (LAME, 2013);
- ii. Via intercelular - substâncias apolares, pela sua afinidade lipídica, difundem-se ao redor das células cornoas, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica (LAME, 2013);
- iii. Via transanexal - as substâncias podem ser absorvidas através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, esta via auxilia na permeação de compostos de difusão lenta e substâncias de alto peso molecular, como nanopartículas (LADEMANN *et al.*, 2011).

**Figura 6** – Vias de permeação na pele.



**Nota:** (A) A via transcelular; (B) A via intercelular; (C) e (D) A via transanexal.

**Fonte:** SHAKER *et al.* (2019).

Apesar de muitas substâncias atravessarem a camada córnea tanto pela via intercelular, quanto pela via transcelular, a primeira é considerada a principal via (BENSON; WATKINSON, 2012; LANE, 2013).

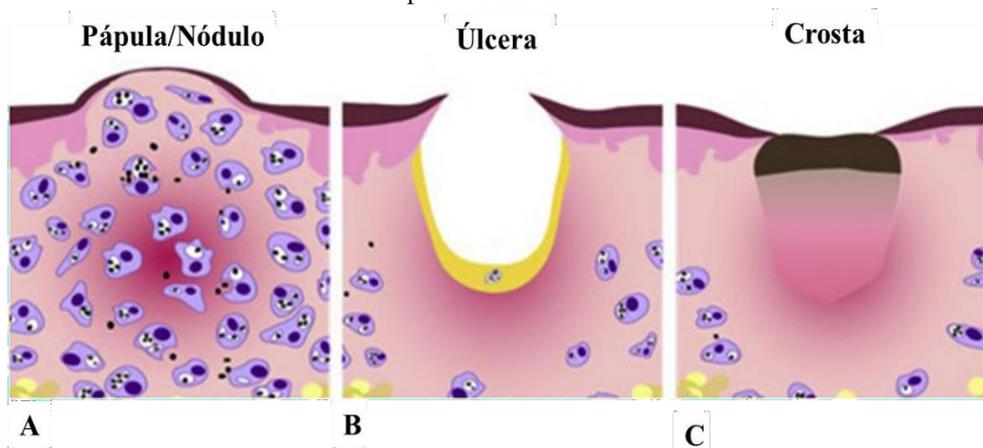
Algumas propriedades são consideradas importantes para que uma substância seja absorvida pela pele, tais como: peso molecular  $\leq$  a 500 Daltons, coeficiente de partição (logP)

entre 1,0 e 4,0, ponto de fusão inferior a 200°C, coeficiente de permeabilidade cutânea  $> 5 \times 10^{-4}$  cm/hora, assim como, baixo ou nenhum potencial de irritação da pele (TROMMER; NEUBERT, 2001; BENSON; WATKINSON, 2012).

### 2.2.3 Pele infectada por *Leishmania* spp.

Na pele acometida pela LTA, a permeabilidade é altamente variável em comparação com a pele normal. A lesão cutânea geralmente começa com um pequeno eritema e inchaço, evolui para uma pápula e, em seguida, torna-se um nódulo que ulcera progressivamente por um período variável de 2 semanas a 6 meses. Por fim, ocorre a perda da camada córnea, epiderme e parte da derme, surgindo a lesão característica da LTA (Figura 7). Logo, para desenvolver uma formulação tópica, deve-se considerar todos os diferentes estágios da lesão (CARNEIRO *et al.*, 2012; KARRAM *et al.*, 2012).

**Figura 7** – Representação esquemática da pele em diferentes estágios de uma lesão cutânea causada pela leishmaniose



**Nota:** **A** = Forma inicial na qual a pele ainda está visivelmente intacta, mas um pequeno nódulo ou pápula é visível; **B** = Estágio mais avançado em que a crosta foi removida e uma úlcera é exposta. As camadas epidérmicas da pele (incluindo o estrato córneo) estão ausentes; **C** = Processo de cicatrização, forma-se uma crosta.

**Fonte :** CARIDHA *et al.* (2019).

Van Bocxlaer *et al.* (2016), relataram mudanças na fisiologia da barreira cutânea, função e permeabilidade a drogas na pele de camundongos BALB/c infectados por *Leishmania major*, tais como, alterações estruturais nas camadas epidérmica e dérmica devido ao ingresso de células inflamatórias, aumento significativo na perda de água transepidérmica (TEWL), e permeação significativamente maior dos permeantes modelo utilizados no estudo (cafeína e ibuprofeno), assim como, de fármacos antileishmania (buparvaquona e paromomicina), para a pele infectada por *Leishmania* em comparação com a pele não infectada. Relataram também que a infecção não teve influência mensurável no pH e na hidratação da pele.

Além disso, como na maioria dos casos de leishmaniose cutânea localizada a epiderme não está presente em decorrência da ulceração, provavelmente a penetração de uma substância na derme pode vir a ser aumentada e entrar na circulação sanguínea. Portanto, os sistemas de liberação de substâncias ativas, devem promover a penetração na camada dérmica mais profunda, assim como, preferencialmente a substância deve permanecer retida na derme, pois é principalmente nessa camada que os parasitos estão localizados (CARNEIRO *et al.*, 2012; VAN BOCXLAER *et al.*, 2016; CARIDHA *et al.*, 2019).

### 2.3 SISTEMAS DE ENTREGA TRANSDÉRMICA - TDDS

A entrega transdérmica de medicamentos está ganhando cada vez mais interesse na indústria farmacêutica. Também representa a área de pesquisa mais bem-sucedida e inovadora na entrega de medicamentos (MBAH; UZOR; OMEJE, 2011; BARTOSOVA; BAJGAR, 2012; SOMEYA; AMAGAI, 2019).

Os sistemas de entrega transdérmica de fármacos, do inglês *Transdermal Drug Delivery System* (TDDS), também conhecido como adesivos transdérmicos, são projetados para fornecer uma quantidade terapêutica de um determinado ativo com uma taxa predeterminada, controlada e por tempo prolongado (SHARMA *et al.*, 2018).

Um TDDS geralmente é composto por uma matriz polimérica, uma substância ativa, promotores de permeação (dimetilsulfóxido, ureia, álcoois, glicóis entre outros). Dentre os vários tipos de TDDS estão os sistemas de reservatório e o sistema de matriz (YADAV, 2012; MALI, 2015).

Esses sistemas apresentam inúmeras vantagens, como a manutenção do nível constante do fármaco no plasma sanguíneo, o menor número de efeitos colaterais, e a melhoria da biodisponibilidade pela evasão de metabolismo hepático de primeira passagem, assim como podem aumentar a adesão do paciente ao tratamento (DHIMAN; GURJEET; REHNI, 2011; BHOWMIK *et al.*, 2013).

Neste sentido, a adesão ao tratamento é dita como “grau de seguimento dos pacientes à orientação médica” (FLETCHER *et al.*, 1989), e relaciona-se à maneira como o indivíduo vivencia e enfrenta o adoecimento. Com os adesivos transdérmicos a orientação pelo profissional do sistema de saúde assim como o comprometimento do paciente com o tratamento pode se tornar mais coerente e ter por finalidade a cura da patologia.

Por se tratar de um processo no qual os sujeitos estão em contato com uma variedade de fatores que influenciam sua continuidade ou descontinuidade, facilitar a adesão e aderir ao

tratamento não são tarefas fáceis; são desafios que sofrem oscilações e demandam atenção contínua e pesquisas com foco no autocuidado que são de suma importância para inserir o paciente nesse processo de cura, facilitando assim a adesão ao tratamento (SILVEIRA; RIBEIRO, 2005).

Fármacos que auxiliam e fortalecem essa forma de cuidar, assim como, a participação do paciente no processo de cura, são importantes e incentivados nos últimos anos devido a diversas mudanças sociais que ocorrem no mundo. É importante destacar que os sistemas de saúde correspondem a reivindicações sociais da população a partir das necessidades identificadas. No cenário brasileiro essas reivindicações baseiam-se nos aspectos demográficos e epidemiológicos advindos do sistema de saúde (MENDES, 2010).

Embora as leishmanioses sejam reconhecidas como um problema de saúde pública, diversos trabalhos apontam inúmeras limitações às terapêuticas atuais, incluindo toxicidade e alto custo. Além disso, exceto a miltefosina que é de administração oral, todos os outros requerem administração parenteral, evidenciando assim, a necessidade de opções terapêuticas mais eficazes, mais seguras e que apresentem vias de administração mais convenientes, a fim de facilitar a adesão ao tratamento e consecutivamente sua taxa de sucesso (TIWARI, *et al.*, 2018; SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021).

Vários trabalhos descritos na literatura já investigaram o uso de distintos sistemas TDDS tanto para novas substâncias com potencial leishmanicida, quanto para os fármacos incluídos no arsenal terapêutico para o tratamento da leishmaniose cutânea. Coelho *et al.* (2021), por exemplo, desenvolveram um sistema de liberação controlada de duas chalconas sintéticas, utilizando nanofibras de poli(vinil-álcool) (PVA). Os autores demonstraram a permeação e retenção *in vitro* das substâncias avaliadas, bem como, a sua atividade leishmanicida em ensaios *in vitro* contra a forma amastigota de *L. (L) amazonensis*.

O estudo de Van Bocxlaer *et al.* (2021) descreveu o uso de um sistema formador de filme para a administração tópica de uma substância antileishmania (DNDI-0690), demonstrando a eficácia do filme em modular a liberação do composto ativo. Os autores ressaltaram que a modulação cuidadosa da formulação pode auxiliar na entrega tópica do composto investido, assim como, que esforços de formulação tópica devem se concentrar em outros candidatos a medicamentos promissores, a fim de fornecer uma formulação tópica acessível para fortalecer o arsenal de tratamento para LC.

Lanza *et al.* (2020) comprovaram que um sistema de vacina de pele em adesivos de microagulhas dissolvíveis, induziu imunidade protetora em camundongos infectados com *L. (L.) donovani*, demonstrando o potencial das microagulhas na abordagem terapêutica.

A atividade leishmanicida de extrato de *Nigella sativa* incorporados em adesivos transdérmicos, foi avaliada *in vitro* e *in vivo* em pacientes com leishmaniose cutânea. No qual uma das cinco formulações testadas liberou mais de 80% do extrato nos experimentos de difusão *in vitro*. O tratamento *in vivo* com os adesivos foi capaz de eliminar 75% da carga parasitária (KHAN *et al.*, 2021).

Zare *et al.* (2021) desenvolveram um adesivo de microagulhas solúvel, usando polímeros biodegradáveis para a entrega transdérmica da anfotericina B, sendo promissor em permear a pele *in vitro* e *in vivo*. Além disso, análises de citometria de fluxo revelaram atividade antileishmania do adesivo.

O fármaco artemeter, um derivado semi-sintético da artemisinina, foi avaliado *in vivo* contra *L. (L.) major* e demonstrou ser promissor quando incorporado ao polímero poli(vinil-álcool) (PVA), uma vez que, os autores observaram uma diminuição significativa no tamanho da lesão quando o grupo tratado com a formulação contendo o fármaco, foi comparado com o grupo controle sem tratamento (EBRAHIMISADR *et al.*, 2014).

A eficácia de um adesivo eletrofiado para liberação tópica de óxido nítrico (NO) foi comparada com antimoniato de meglumina intramuscular para o tratamento de LC, causada por *L. (V.) panamensis*. Para tanto, um ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado por placebo foi realizado em pacientes acometidos por LC, para determinar se o adesivo era tão eficaz quanto o glucantime. As taxas de cura após 3 meses de acompanhamento foram de 94,8% para o grupo que recebeu glucantime em comparação com 37,1% no grupo tratado com o adesivo. Apesar da menor eficácia do adesivo, uma frequência significativamente menor de efeitos colaterais foi observada (LÓPEZ-JARAMILLO *et al.*, 2010).

Alexandrino-Júnior *et al.* (2019) desenvolveram hidrogéis de poli(vinil-álcool) (PVA) contendo anfotericina B incorporada. Os hidrogéis foram avaliados *in vitro* quanto ao seu potencial para eliminar formas promastigotas de *Leishmania* spp., para prevenir infecções secundárias, manter condições de cicatrização adequadas e oferecer biocompatibilidade adequada. Os autores demonstraram que a liberação de anfotericina B do hidrogel ocorreu de forma lenta e gradual, e após 97h aproximadamente 74% do conteúdo total do fármaco foi liberado do sistema. Os hidrogéis de PVA carregados com o fármaco também mostraram atividade antifúngica e leishmanicida eficiente, impermeabilidade microbiana e permeabilidade ao vapor de água compatível com as necessidades fisiológicas da pele saudável, assim como, não apresentaram potencial citotóxico para células pertencente a linhagem derivada de rim do macaco verde - Vero.

Com base nessa premissa, o presente estudo desenvolveu e analisou um sistema de liberação transdérmica (TDDS) destinado à administração de duas substâncias (hexametoxilobelanina (S4) e pelitorina) com potencial atividade leishmanicida.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Obtenção e solubilização das substâncias

As substâncias hexametoxilobelanina (S4) (CID: 4613574) e pelitorina (CID: 5318516) utilizadas no presente estudo são sintéticas e foram adquiridas comercialmente na empresa Sigma-Aldrich (Sigma, St. Louis, MO, USA). O fármaco usual anfotericina B (Unianf, Embu-Guaçu, SP, Brasil), foi utilizado como controle positivo para inibição de crescimento de *Leishmania* spp. nos ensaios *in vitro*, assim como, controle positivo para diminuição da carga parasitária no ensaio *in vivo*.

A S4 e pelitorina foram dissolvidas em dimetilsulfóxido – DMSO ((Sigma, St. Louis, MO, USA), para realização dos ensaios *in vitro* de citotoxicidade e leishmanicida, não ultrapassando a sua concentração final de 0,5%. A anfotericina B foi dissolvida em água de injeção, tanto para os ensaios *in vitro*, quanto para o *in vivo*.

### 3.2 Manutenção e determinação das curvas de crescimento de *Leishmania* spp

As cepas *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/2014/RO310), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67PH8) e *L. (L.) infantum/chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), utilizadas no presente estudo, foram obtidas do banco de Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC, Fiocruz do Rio de Janeiro.

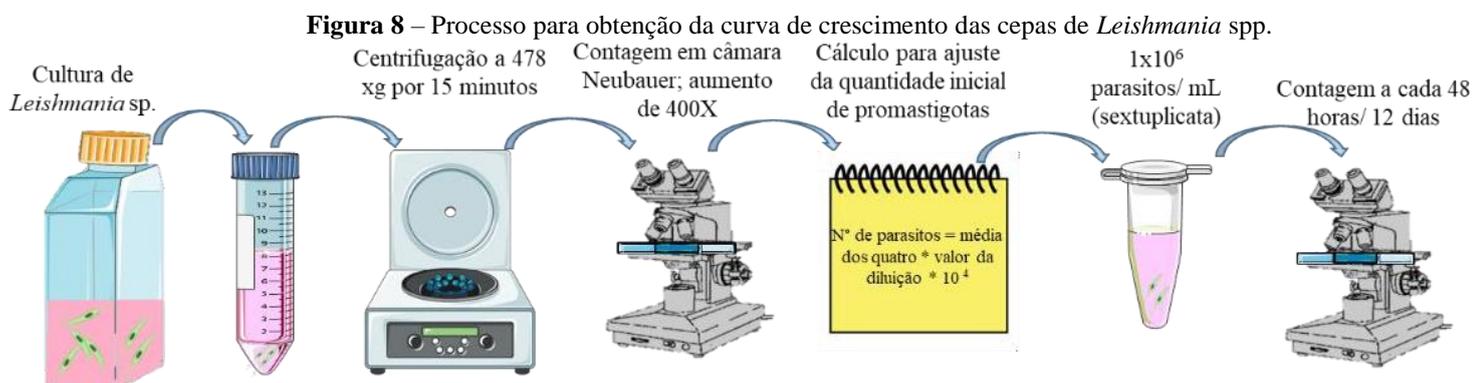
As formas promastigotas foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com L-glutamina a 2mM, HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico) a 20nM e 50µg/mL de gentamicina e soro fetal bovino (SFBi) previamente inativado a 10%, em estufa incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura média de 24°C (Adaptado de PERESTRELO *et al.*, 2018; ROSSI, 2018).

A avaliação do desenvolvimento e da multiplicação *in vitro* das formas promastigotas foi realizada através da curva de crescimento. Para tal, culturas iniciadas com 10<sup>6</sup> promastigotas/mL foram acompanhadas por 12 dias, a cada 48h. Inicialmente, alíquotas das culturas foram diluídas em corante eritrosina B a 0,04% (p/v), com posterior contagem das promastigotas na câmara hemocitométrica (Neubauer) em microscópio óptico com aumento de 400×. Na qual, os parasitos corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis, considerados vivos (Figura 8). A determinação do número de parasitos/mL foi realizada utilizando a equação 1 apresentada a seguir (Adaptado de SILVA-JARDIM, 2001).

**Número de parasitos** = média dos quatro quadrantes  $\times$  inverso da diluição da amostra  $\times 10^4$

Equação 1

O número de parasitos foi avaliado em material codificado por dois observadores independentes. O cálculo foi feito considerando apenas o número de parasitos vivos.



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: <<https://smart.servier.com/>>.

Após atingir a fase estacionária, os parasitos foram centrifugados a 478xg por 15 minutos e lavados em solução estéril PBS1X pH 7,4 (tampão salina fosfato) com a mesma centrifugação. Após a lavagem, os parasitos foram ressuspensos em meio RPMI-1640, preparado conforme descrito acima, e utilizados nos ensaios de atividade leishmanicida.

### 3.3 Manutenção e determinação da citotoxicidade em células de linhagem murina de fibroblastos - L929

Células de linhagem fibroblástica, derivadas de tecido conjuntivo de camundongos, da linhagem L929, foram selecionadas para esse estudo visando dados adicionais para a aplicação das substâncias por via tópica. As células são criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , estas foram descongeladas e o conteúdo celular transferido para tubos de centrifugação contendo 5 mL de meio RPMI-1640, sem adição de SFBi. Em seguida, ocorreu a centrifugação em temperatura ambiente a 478xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensos em meio RPMI-1640, suplementado com SFBi. O cultivo da linhagem foi mantido em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI, acrescido de 2mM de L-glutamina, 20nM de HEPES (N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina e suplementado com 10% de SFBi em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , a 95% de umidade, o meio das garrafas foi substituído a cada dois dias. Após a confluência de aproximadamente 80% as células foram repicadas ou utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

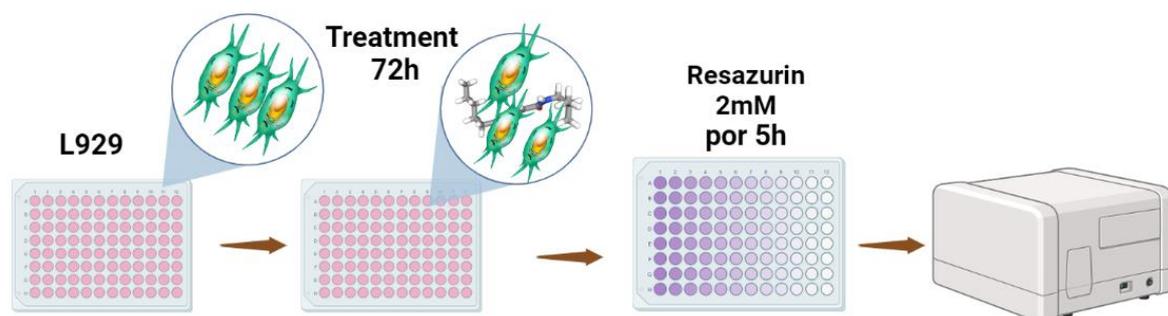
Para ensaios de citotoxicidade a cultura foi centrifugada em temperatura ambiente a 478xg por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensão em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFBi. Posteriormente, uma alíquota da cultura foi diluída em corante azul de Trypan a 0,04% (p/v), com posterior contagem das células viáveis na câmara hemocitométrica (Neubauer) em microscópio óptico com aumento de 400×, na qual, as células coradas de azul foram consideradas mortas e não coradas, consideradas vivas. A determinação do número de células/mL foi realizada utilizando a equação 1.

As células foram então transferidas para placas de 96 poços, contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFBi, na densidade de  $10^4$  células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, a 95% de umidade incubadas por 24h (Figura 9).

Após esse período, os fibroblastos aderidos na placa foram tratados com as substâncias (S4 ou pelitorina) em concentrações seriadas (1/2) de 500 - 7,81  $\mu$ M (Figura 9). Como parâmetro de controles foi utilizado o controle positivo de viabilidade (células não tratadas), controle negativo de morte (células tratadas com tampão de lise) e meio RPMI-1640 suplementado com SFBi (branco).

Assim, após 72h, foi adicionado uma solução de resazurina em cada poço, a uma concentração inicial de 2mM diluído em PBS 1X. Após 5h de incubação a 37°C, totalizando 77 horas de tratamento, a fluorescência foi determinada com auxílio do espectrofotômetro Synergy HT (BioTek) com excitação de 530/25 e emissão de 590/35 (Figura 9) (Adaptado de RISS *et al.*, 2016; ROSSI, 2018).

**Figura 9** – Determinação da citotoxicidade das substâncias pelitorina e hexametoxilobelanina frente células pertencentes a linhagem fibroblástica – L929



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/> >

Os valores foram processados pelo programa Gen5® 5.11. Os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes. A unidade apresentada é a Unidade Relativa

de Luz (URL), que é convertida para a porcentagem de inibição de crescimento, seguindo a equação 2, a seguir:

$$\text{Viabilidade (\%)} = 100 - \frac{(\text{fluorescência teste} - \text{fluorescência branco}) \times 100}{(\text{fluorescência controle sem tratamento} - \text{fluorescência branco})} \quad \text{Equação 2}$$

A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi determinada por análise de regressão não linear, utilizando o programa Origin® 9.1, a partir dos dados obtidos em cada experimento, assim obtendo a porcentagem de células viáveis em relação às células controles. Os testes de  $CC_{50}$  foram realizados em triplicata por duas vezes sob as mesmas condições acima citadas.

### **3.4 Manutenção e determinação da citotoxicidade em células de linhagem monocítica humana- THP-1**

A linhagem não aderente THP-1 (linhagem monocítica humana) é criopreservada em nitrogênio líquido, esta foi descongelada a 37°C e o conteúdo celular transferido para tubo de centrifugação contendo 9mL de meio RPMI-1640, sem adição de SFBi. Em seguida, ocorreu a centrifugação a 125xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensão em meio RPMI-1640 suplementado com SFBi.

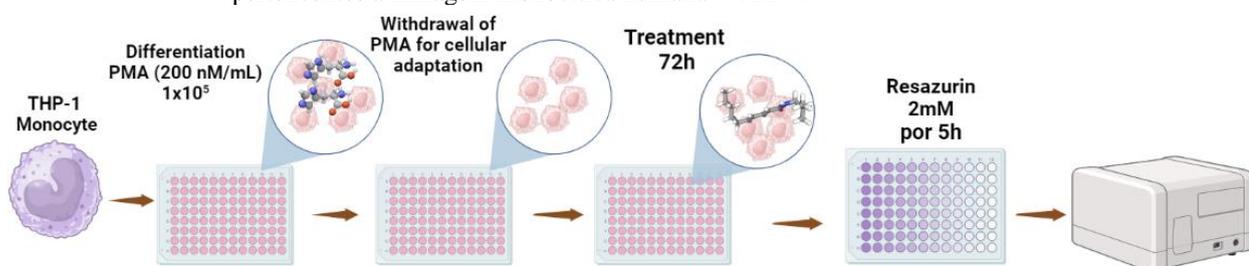
O cultivo da linhagem foi acondicionado em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> com meio RPMI-1640, acrescido de L-glutamina 2mM, 20nM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico), 4500mg/L glicose, 1500mg/L bicarbonato de sódio, 50µg/mL de Gentamicina, 1mM/mL de piruvato de sódio e suplementado com soro fetal bovino (SFB) inativo a 10%, na proporção de 2x10<sup>5</sup> de células/mL e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sup>2</sup> a 95% de umidade, realizando repiques ou adição de meio a cada três dias (Adaptado de GOIS, 2016).

Após a confluência de aproximadamente 80% as células foram repicadas ou utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. Para a determinação da citotoxicidade, as células da linhagem THP -1 foram dispostas na densidade de 10<sup>5</sup> células/poço, em placas de 96 poços, diferenciadas em macrófagos aderentes, na presença de 200nM/mL de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), por 72h. Após esse período, as placas foram lavadas com meio RPMI-1640, sem adição de SFBi, a 37°C, para retirar o PMA, com seguida adição de meio RPMI-1640 suplementado com SFBi a 10%, as placas foram então novamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 24 horas (Adaptado de GOIS, 2016).

Posteriormente, foram expostas a S4 ou pelitorina, em concentrações finais seriadas (500 – 7,81 $\mu$ M). Como parâmetros de controles foram utilizados: controle positivo de viabilidade (células não tratadas) e controle negativo de morte (células tratadas com tampão de Lise) e meio RPMI-1640 completo (branco) (Figura 10).

Assim, após 72h de tratamento, foram adicionados em cada poço 20 $\mu$ L de uma solução de resazurina, a uma concentração inicial de 2mM diluído em PBS. Após 5h de incubação a 37°C, a fluorescência foi determinada com auxílio do espectrofotômetro Synergy HT (BioTek) com excitação de 530/25 e emissão de 590/35 (Adaptado de RISS *et al.*, 2016). Os valores foram processados pelo programa Gen5® 5.11.

**Figura 10** – Determinação da citotoxicidade da pelitorina e hexametoxilobelanina frente células pertencentes a linhagem monocítica humana – THP-1



Fonte: Adaptado de SILVA (2020).

Os ensaios foram realizados em triplicata, em dois experimentos independentes. A unidade apresentada é a Unidade Relativa de Luz (URL), que é convertida para a porcentagem de inibição de crescimento, seguindo a equação 2.

A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi determinada por análise de regressão não linear, utilizando o programa Origin® 9.1, a partir dos dados obtidos em cada experimento, assim obtendo a porcentagem de células viáveis em relação às células controles. Os testes de  $CC_{50}$  foram realizados em triplicata por duas vezes sob as mesmas condições acima citadas.

### 3.5 Infecção de macrófagos, determinação da concentração inibitória para 50% das amastigotas e índice fagocítico de *Leishmania* spp.

Como alternativa de infecção para os ensaios de determinação do  $IC_{50}$  (concentração da substância que inibe 50% das amastigotas intracelulares) e do índice fagocítico (porcentagem de macrófagos com parasitos fagocitados  $\times$  média do número de parasitos fagocitados por cada macrófago), foi utilizada a cultura celular THP-1, linhagem monocítica de leucemia humana.

Essas células foram dispostas na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/poço, mantidas e diferenciadas conforme o item 3.4 (Adaptado de Silva, 2021).

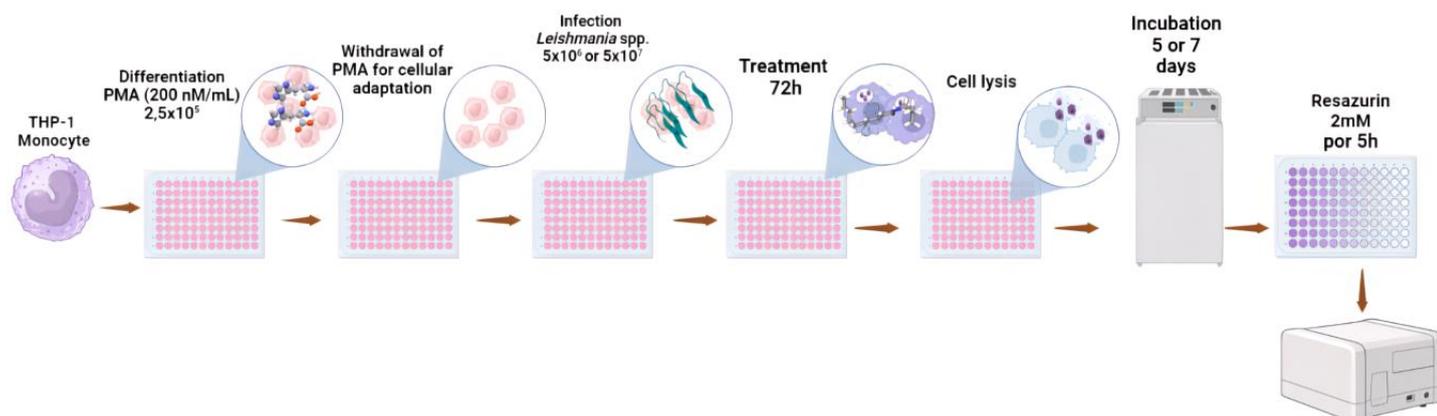
Depois de diferenciadas em macrófagos, as células foram infectadas com promastigotas de *Leishmania* spp. Para tanto, culturas de promastigotas de *Leishmania* spp. em fase estacionária de crescimento foram centrifugadas a 478xg por 15 minutos. O pellet foi ressuspensão em meio RPMI-1640 suplementado com SFBi, as promastigotas foram quantificadas na câmara hemocitométrica (Neubauer) em microscópio óptico com aumento de 400x. Para infecção das células THP-1 com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, utilizou-se a proporção de 1:20; para *L. (L.) amazonensis* ou *L. (L.) infantum/chagasi* a proporção foi de 1:10 célula/promastigota (Adaptado de ROSSI, 2018; SILVA, 2021). Após a adição dos parasitos à cultura de células, as placas foram incubadas a 33°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h para permitir que os parasitos infectassem as células THP-1, ao término da incubação as placas foram lavadas três vezes com meio RPMI-1640 incompleto para remoção dos parasitos que não infectaram as células.

As células THP-1 infectadas foram tratadas com as substâncias pelitorina ou S4 em concentrações seriadas (1/2) de 200 a 3,125µM. Como controle negativo foram utilizadas células infectadas e o controle positivo foram utilizadas células infectadas e tratadas com anfotericina B (3 µM). Foram utilizadas nestas condições microplacas de 96 poços e placas de 24 poços (com lamínulas – como contraprova dos resultados obtidos da placa de 96 poços, utilizando as maiores concentrações e os controles). As placas foram incubadas a 32 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 72h.

As microplacas de 96 poços foram lavadas três vezes com 300µL de meio RPMI-1640 incompleto, seguido de lise controlada de membranas de macrófagos usando 0,05% de detergente de dodecil sulfato de sódio (SDS) em 20µL de meio RPMI-1640 por poço por 30 segundos, para minimizar a perda de viabilidade do parasita. Posteriormente, 180µL de RPMI-1640 com 10% FBS foi adicionado a cada poço, e as placas foram incubadas a 24°C para a diferenciação de parasitas sobreviventes de amastigotas para promastigotas. O período de incubação variou para cada espécie: *Leishmania (L.) amazonensis* – 5 dias; *Leishmania (V) braziliensis* – 7 dias; *Leishmania (L) infantum/chagasi* – 5 dias, seguido de transferência para uma nova placa e mais três dias de incubação. Depois de período de incubação, 20µL (2 mM por poço) de uma solução de resazurina diluída em 1X PBS foram adicionados a cada poço. As placas foram colocadas em um leitor de microplacas multimodo (Biotek, Synergy) com leituras de fluorescência a 530/25 nm (excitação) e 590/35 nm (emissão) com ganho de 100 (Adaptado

de Silva *et al.*, 2021). Os valores foram processados usando o software Origin 9.1, conforme figura 11.

**Figura 11** – Processo de infecção com *Leishmania* spp. e tratamento frente células pertencentes a linhagem monocítica humana – THP-1 em microplacas de 96 poços



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/>>

A fluorescência obtida foi usada para o cálculo da concentração da substância que inibe 50% dos amastigotas intracelulares ( $IC_{50}$ ) e os resultados foram expressos seguindo a equação 3, a seguir:

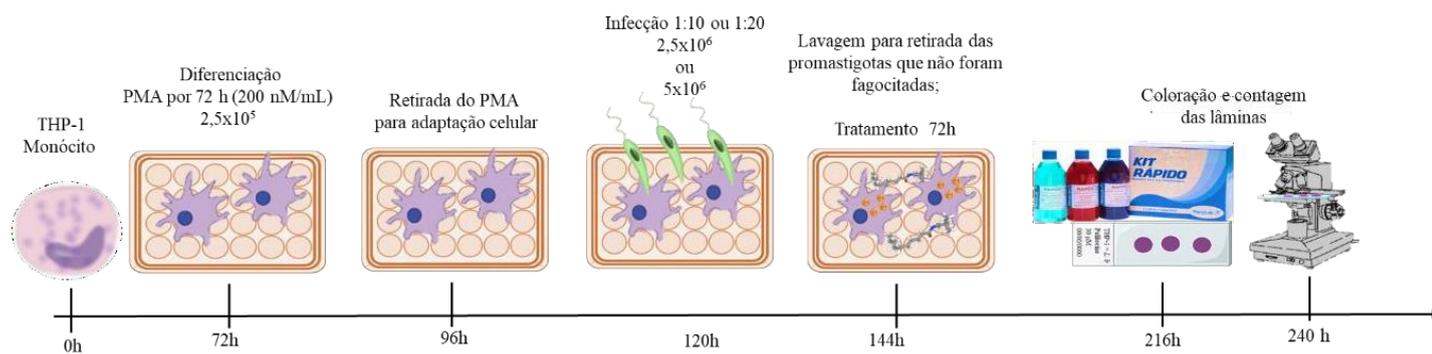
$$IC (\%) = 100 - \frac{(\text{Fluorescência teste} - \text{Fluorescência Branco} \times 100)}{(\text{Fluorescência controle sem tratamento} - \text{Fluorescência do Branco})} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$IC (\%)$  = Concentração que inibi 50% das formas amastigotas.

Em se tratando das microplacas de 24 poços, após o período de tratamento, as células foram fixadas em lâminas de vidro e coradas com corante panótico (NewProv, Brasil), conforme descrito por Silva (2021). O número de amastigotas por macrófagos, o percentual de macrófagos infectados e o índice fagocítico foram determinados pela contagem de um total de 100 células por lâminas em triplicatas para cada amostra, essas foram contadas por microscopia óptica na objetiva de 100 $\times$ , conforme ilustrado na figura 12 (Adaptado de GERALDO, *et al.*, 2016).

**Figura 12**– Processo de infecção com *Leishmania* spp. e tratamento frente células pertencentes a linhagem monocítica humana – THP-1



Fonte: Adaptado de SILVA (2020).

Para determinação do índice fagocítico (IF), foi considerada a porcentagem de macrófagos infectados em 100 células totais visualizadas, multiplicando a média do número de amastigotas por macrófagos (BARBIERI *et al.*, 1993). Os valores de IF foram obtidos através da equação 4, a seguir:

$$\text{IF} = \text{percentual de macrófagos infectados} \times \text{número médio de amastigotas por macrófago}$$

Equação 4

Onde:

IF = índice fagocítico.

### 3.6 Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) dos compostos testados foi obtido calculando-se a razão entre o valor de  $CC_{50}$  e os valores de  $IC_{50}$ . O valor resultante desse cálculo reflete quantas vezes a hexametoxilobelanina e a pelitorina são seletivas ao parasito em relação às células, sendo que quanto maior o valor do IS menos tóxico o composto é para a célula hospedeira (KATSUNO *et al.*, 2015).

Quando não foi possível calcular o valor de  $CC_{50}$ , o IS foi determinado como maior do que a razão entre a maior concentração testada e os valores de  $IC_{50}$ . O índice de seletividade foi obtido com base na equação 5 a seguir:

$$\text{IS} = CC_{50} / IC_{50}$$

Equação 5

Onde:

IS = índice de seletividade,

$CC_{50}$  = valor referente à concentração citotóxica para 50% das células;

$IC_{50}$  = inibição de crescimento de 50% das amastigotas.

### **3.7 Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas das substâncias relacionadas a permeação cutânea**

Utilizou-se o software SwissAdme para avaliação das seguintes propriedades físico-químicas das substâncias relacionadas a permeação cutânea: peso molecular; ponto de fusão; o logaritmo do coeficiente de partição ( $\log P_{o/w}$ ) e meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ). Os padrões previstos no software são avaliados de acordo com o modelo descrito por Daina; Michielin e Zoete (2017).

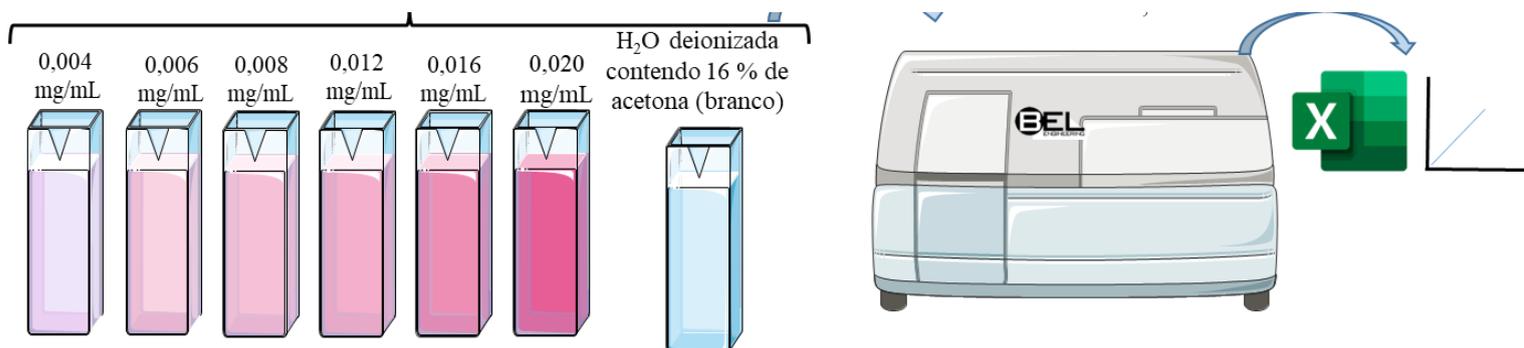
### **3.8 Quantificação das substâncias hexametoxilobelanina (S4) e pelitorina**

Inicialmente foi determinado o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de máxima absorção das substâncias S4 (306 nm) e pelitorina (340 nm), por meio de uma varredura em espectrofotômetro Bel, UV-M51, em um intervalo de leitura de 190 a 1100 nm, utilizando-se uma solução hidroalcoólica (50% de etanol e 50% de H<sub>2</sub>O) das substâncias a 2 mg/mL. A solução hidroalcoólica sem a presença das substâncias foi utilizada como branco de leitura.

### **3.9 Construção da curva analítica para hexametoxilobelanina (S4) e pelitorina**

As curvas analíticas (Absorbância x Concentração) foram avaliadas por espectrofotometria UV-Vis, utilizando o espectrofotômetro UV-M51 (Bel). As curvas foram obtidas a partir da triplicata de seis concentrações (0,0588; 0,147; 0,235; 0,294; 0,353; 0,441 mg/mL) e (0,08; 0,2; 0,32; 0,4; 0,48; 0,6 mg/mL) para pelitorina e S4, respectivamente. Para diluições foi utilizada uma solução hidroalcoólica (Etanol/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v)), que também foi empregada na leitura como branco, conforme figura 13.

**Figura 13** - Construção das curvas analíticas em espectrofotometria UV-Vis, utilizando o espectrofotômetro UV- M51 (Bel).



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: <<https://smart.servier.com/>>.

Posteriormente, os dados de absorvância foram tratados pelo *software* Microsoft Excel, para construção da curva analítica. Com as absorvâncias obtidas foi possível determinar a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ). A fim de avaliar a reprodutibilidade do processo, a técnica foi realizada em duplicata (Adaptado de DUTRA; BIANCHETTI; STÜLP, 2013).

A equação da reta obtida de cada substância foi utilizada para determinar suas concentrações desconhecidas nos ensaios de permeação e retenção cutânea (NAYAK; MOHANTY; SEN, 2010; MASIIWA; GADAGA, 2018).

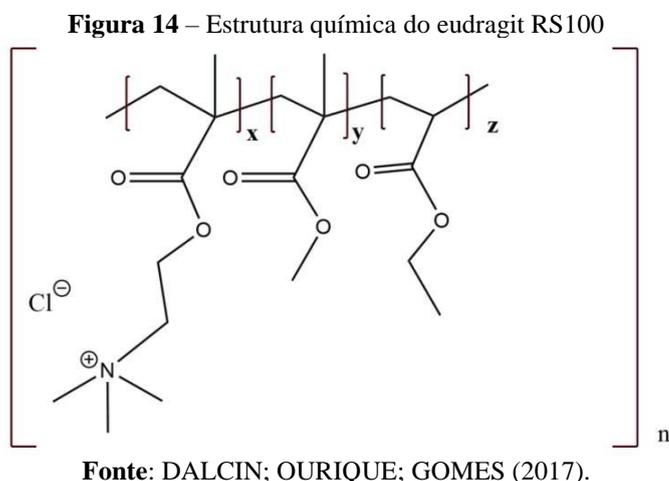
### 3.10 Produção dos filmes poliméricos

O filme polimérico sintetizado no presente estudo compõe o sistema de liberação prolongada, caracterizado como adesivo transdérmico matricial, que foi utilizado nos experimentos *in vivo*. Um sistema de entrega transdérmica matricial é composto por uma camada em matriz semissólida, contendo uma solução ou suspensão da substância ativa, e uma camada adesiva que envolve a camada com a substância, sobrepondo-a parcialmente (YADAV 2012; MALI, 2015).

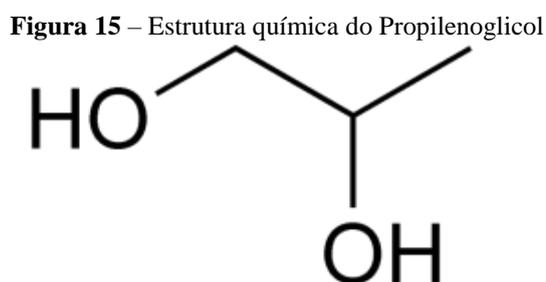
A formulação do filme foi definida em colaboração com o Dr. Luiz Alberto Kanis, diretor de Pesquisa e Desenvolvimento da Airela Indústria Farmacêutica Ltda e foi produzido em parceria com o Instituto Federal de Rondônia- IFRO, *campus* Porto Velho - CALAMA.

Para formulação dos filmes foi utilizados o copolímero de etil acrilato, EUDRAGIT® RS 100 e o plastificante propilenoglicol (PG) (Embacaps). Ambos diluídos em Acetona P.A. (ROWE; SHESKEY; QUINN 2009).

O copolímero de etil acrilato, Eudragit® RS 100 (grânulo), representado na figura 14, apresenta alta permeabilidade e sua insolubilidade não é pH dependente (SONJE; CHANDRA, 2013). Foi gentilmente cedido pela Evonik Industries (Essen, Alemanha).



O plastificante utilizado neste estudo foi o propilenoglicol (PG) (Embacaps), que é um composto orgânico líquido, incolor, inodoro e miscível em água, álcoois, ésteres e cetona, cuja fórmula estrutural é representada na figura 15, sendo descrito como um promotor de permeação de drogas sobre a pele (KULINSKI *et al.*, 2006; TROMMER; NEUBERT, 2006).



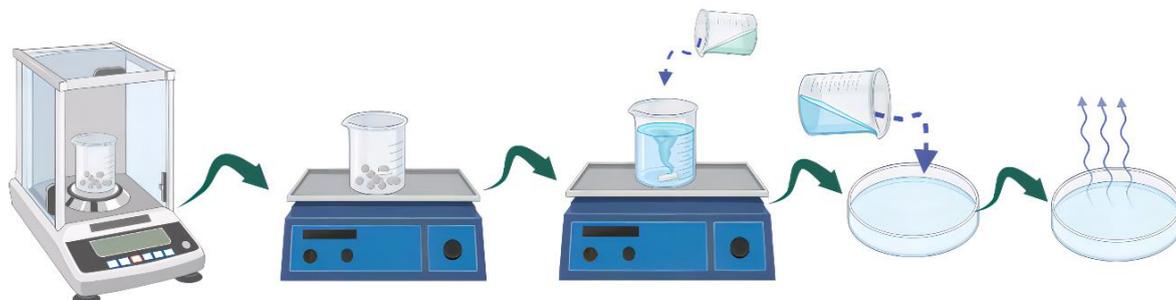
### 3.11 Processo para preparação do filme polimérico

Inicialmente, os reagentes (eudragit RS 100 e propilenoglicol) foram pesados e acondicionados em becker de poli (tetrafluoroetileno) (*Teflon*®), em seguida foram aquecidos (40°C) sob constante agitação até que o copolímero estivesse completamente dissolvido. O solvente utilizado foi a acetona (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Após, adicionou-se a substância (S4 ou pelitorina), conforme tabela 1.

A solução foi mantida sob agitação por mais dois minutos visando garantir a homogeneização das substâncias nos polímeros. A solução quente foi colocada em placas de

Teflon® (63,585cm<sup>2</sup>), por ser inerte e apresentar baixa aderência aos filmes formados, o solvente foi evaporado à temperatura ambiente em capela de exaustão por 24h (Figura 16). As matrizes foram retiradas e mantidas em estufa B.O.D a 24°C até sua utilização (Adaptado de KANIS, 2005).

**Figura 16** – Processo para preparação do filme polimérico



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/> >

Posteriormente, o filme obtido foi cortado em tamanhos padronizados e adequados à utilização na área de permeação.

**Tabela 1** – Formulação utilizada na produção do filme polimérico

Constituintes da formulação	Quantidade
Polímero – Eudragit RS 100	60%
Plastificante – Propilenoglicol	40%
Solvente – Acetona	10 mL

**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 3.12 Ensaios de permeação e retenção cutânea

No presente estudo foi utilizada pele suína (*Sus scrofa domesticus*), oriunda de orelhas, obtidas em local de comercialização de suínos para consumo domiciliar em Porto Velho – RO. A pele da orelha suína é utilizada em estudos de permeação cutânea como substituto da pele humana, sendo considerada promissora como ferramenta para avaliação e otimização de formulações tópicas em estudos *in vitro* (HERKENNE *et al.*, 2006; JACOBI *et al.*, 2007).

Após a obtenção, as peles naturais foram lavadas com água e secas com papel absorvente e com auxílio de uma tesoura (esterilizada) os pelos foram cuidadosamente cortados próximo à superfície epidérmica, seguindo-se da separação da pele à cartilagem (descartando)

as áreas onde forem observadas lesões, manchas ou arranhões) e remoção da camada subcutânea remanescente.

Para tanto, foi feita uma secção a cerca de 2 cm da borda da orelha, após iniciou-se a retirada pela parte mais pontiaguda. Cuidadosamente, passou-se o bisturi, entre a pele e a cartilagem, observando para que não fossem retirados gorduras e cartilagens, até o final da secção (Figura 17).

**Figura 17**– Dessecação da pele de orelha de suíno



**Fonte:** Elaborado pela autora.

As amostras de pele foram cortadas em tamanhos padronizados e adequados à utilização na área de permeação. O material posteriormente foi acondicionado em filme plástico e papel alumínio e mantido em congelador até o momento do uso (por no máximo 30 dias) (MEIRA, 2010).

### **3.12.1 Montagem das células de Franz**

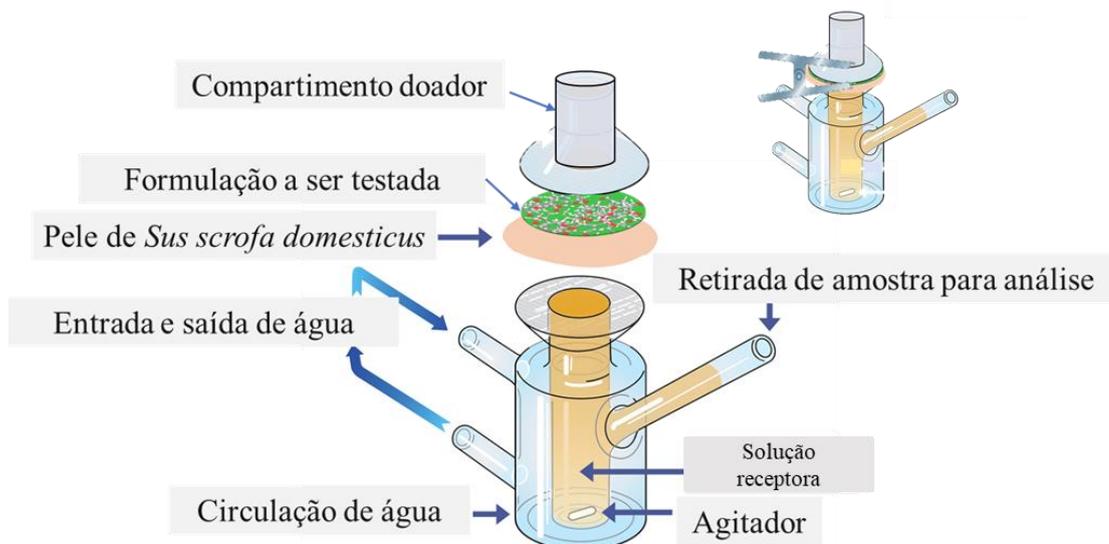
Os ensaios de permeação cutânea foram realizados utilizando o sistema células de difusão estáticas de Franz, com um compartimento receptor de 13 mL e uma área de difusão disponível de 1.77 cm<sup>2</sup> (compartimento doador), conforme figura 18.

A pele foi disposta na célula de modo que ficasse em contato com a solução receptora (Etanol/H<sub>2</sub>O – 1:1 v/v) sem formação de bolhas. O filme foi colocado no compartimento doador, com a parte externa – estrato córneo – voltada para o compartimento doador (em

contato com o filme), e conseqüentemente, a parte interna da derme em contato direto com a solução receptora, sem formação de bolhas (MEIRA, 2010).

Uma barra de agitação magnética revestida de Teflon foi colocada no interior das células e a velocidade de 400 rpm, permitiu que o fluido receptor fosse continuamente misturado.

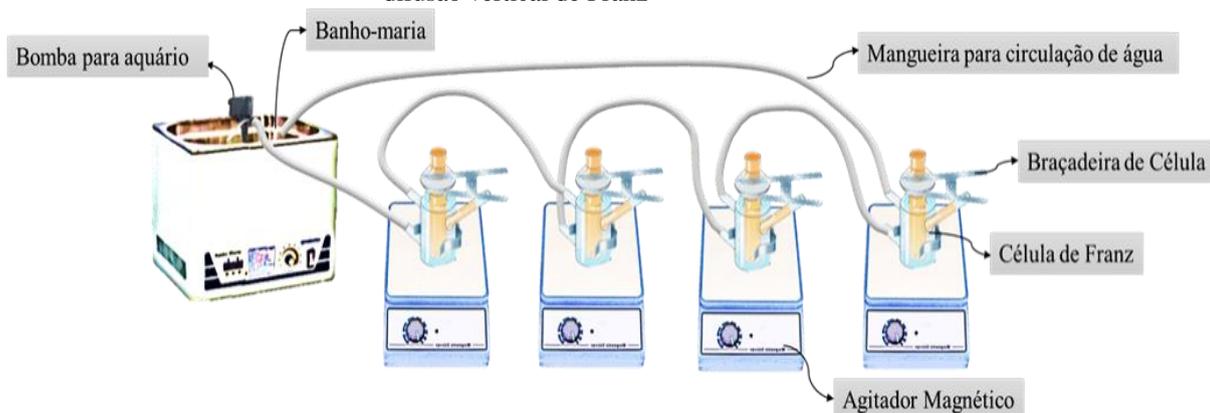
**Figura 18** – Representação ilustrativa da célula de difusão de Franz.



**Fonte:** Adaptado pela autora. Disponível em <<https://permegear.com/franz-cells/>>, acesso em 09/07/2022.

Um sistema composto pelas células de Franz e um banho – maria foi adaptado pela nossa equipe, visando o desenvolvimento dos estudos de permeação e retenção cutânea. O sistema foi mantido sob agitação constante (300 rpm). Durante o experimento, a temperatura do compartimento do receptor foi mantida constante a 35°C por uma camisa d'água (Figura 19).

**Figura 19** – Representação ilustrativa do sistema de permeação cutânea, adaptado, com célula de difusão vertical de Franz

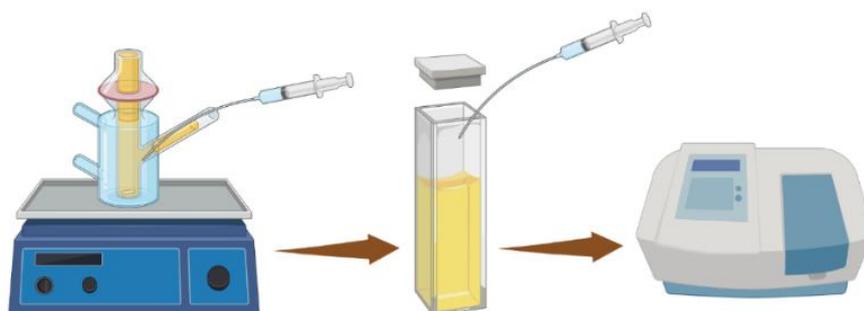


**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 3.12.2 Coleta e quantificação das amostras

Amostras de 2 mL de fluido receptor foram coletadas, a cada uma hora por um período total de 12 horas. A amostra era imediatamente devolvida ao compartimento receptor após a leitura no espectrofotômetro (Figura 20). As análises foram realizadas em triplicatas.

**Figura 20** – Representação ilustrativa da coleta e quantificação das amostras



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/>>

A concentração permeada por centímetro quadrado da substância avaliada foi plotada em função do tempo utilizando a equação de uma linha reta obtida através da curva de calibração (item 3.9) (CUNHA *et al.*, 2016). Foram realizados dois experimentos em dias alternados e em triplicata.

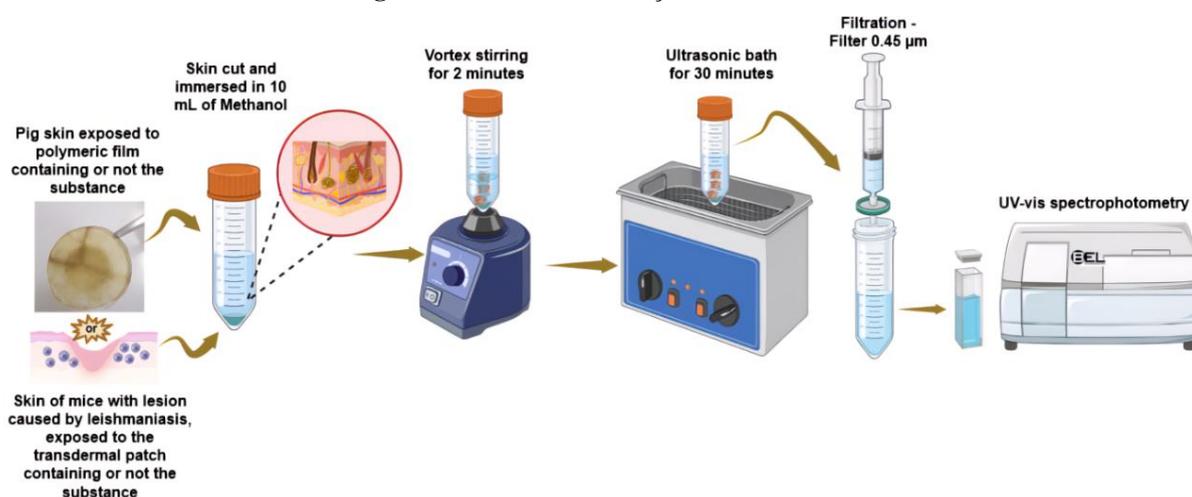
Os dados oriundos da permeação cutânea foram utilizados para calcular os seguintes parâmetros de permeação: a quantidade permeada das substâncias em função do tempo (fluxo ( $J$ ) de permeação cutânea, o coeficiente de permeabilidade aparente e o tempo de latência (lag time).

O fluxo  $J$  (mg/cm<sup>2</sup>/horas) foi obtido a partir do coeficiente angular (inclinação da curva) da equação da reta do gráfico referente a quantidade total permeada (mg/cm<sup>2</sup>) em função do tempo dividida por 1,77 para corrigir a área de pele exposta (cm<sup>2</sup>). O coeficiente de permeabilidade aparente foi calculado pelo valor do fluxo  $J$  dividido pela concentração de cada substância presente no compartimento doador da célula de Franz. O tempo de latência foi obtido através da divisão do coeficiente linear pelo coeficiente angular da equação da reta do gráfico referente a quantidade total permeada (mg/cm<sup>2</sup>) (GUIMARÃES 2001; VERYSER *et al.* 2014; SILVA, 2016).

### 3.12.3 Retenção cutânea

Finalizado o experimento de permeação, o excesso de filme foi removido da pele com água destilada e secadas com papel absorvente. A área da pele exposta à permeação foi delimitada, cortada e picada com bisturi e tesoura. Os fragmentos foram recolhidos em tubos tipo Falcon contendo 10mL de álcool metílico (metanol) e, então, agitados com auxílio do vórtex por 2 minutos e depois submetidos à sonicação em banho ultrassom por mais 30 minutos para rompimento das células. Alíquotas dos sobrenadantes foram filtradas e submetidas à espectrofotometria UV-vis para determinar a quantidade da substância retida na pele (Figura 21) (adaptado de Meira 2010). Esse mesmo procedimento foi realizado com peles lesionadas oriundas dos ensaios *in vivo*, descrito a seguir.

**Figura 21** – Ensaio de retenção cutânea



**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/> >

O mesmo procedimento foi efetuado com a pele exposta ao adesivo controle (matriz filme sem as substâncias – branco) (Adaptado de SATO *et al.*, 2007).

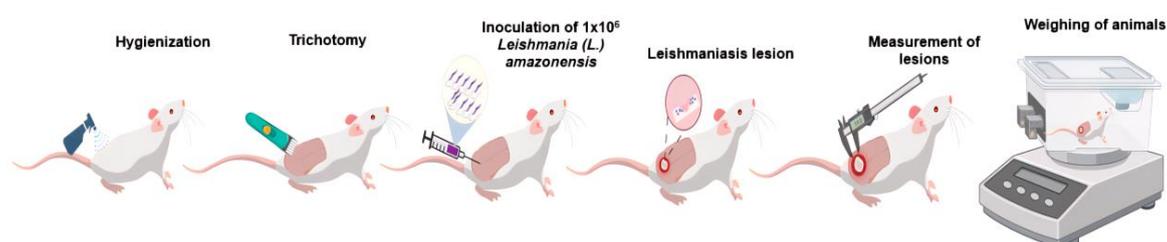
### 3.13 Ensaios *in vivo*

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ RONDÔNIA, em 26.05.2022 – Protocolo 2022/01. Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas e peso entre 18 e 20 g. Esses animais foram obtidos no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz).

#### 3.13.1 Infecção dos camundongos Balb/c e acompanhamento da espessura da lesão

Os animais foram tricomitomizados no dorso com um barbeador elétrico. Após a tricotomia foi realizada a infecção por via subcutânea a 3 cm da base da cauda com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8) em fase estacionária de cultivo *in vitro* na proporção de  $1 \times 10^7$ /mL, como veículo de inoculação foi utilizado PBS 1x no volume final de 150  $\mu$ L. Os animais foram então monitorados três vezes por semana para a visualização do surgimento das lesões. Para tal utilizou-se o aparelho paquímetro e a balança digital onde foi delineada a largura e o comprimento da lesão além do peso dos animais (Figura 22).

**Figura 22** – Processo de infecção e avaliação da lesão em Balb/c com *L. (L.) amazonensis*

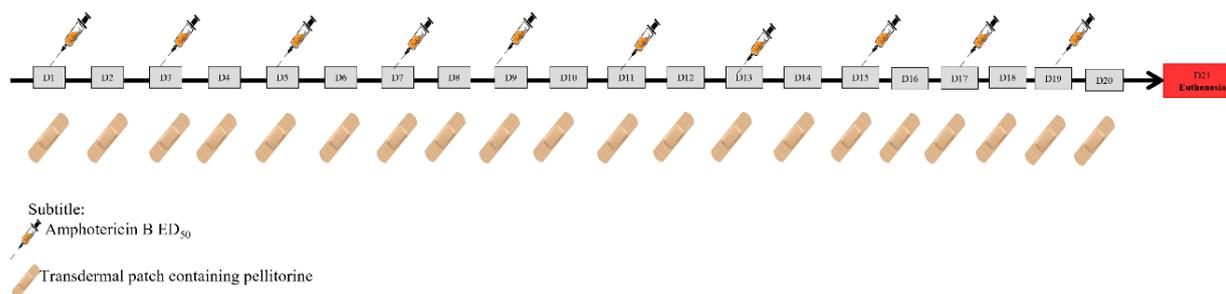


**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/>>

### 3.13.2 Tratamento transdérmico

Após a lesão atingir o mínimo de 0,3 cm<sup>2</sup> em 100% dos animais, foi dado início ao tratamento, conforme ilustrado na figura 23.

**Figura 23** – Fluxograma dos dias de tratamento com adesivos dérmicos, tipo filme, incorporados com Pellitorine, em Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Para tanto, os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos de tratamento, cada grupo foi composto por 4 ou 6 animais, os quais foram mantidos em caixas individuais, conforme ilustrado na figura 24.

**Figura 24** – Grupos de tratamento

**Fonte:** Elaborado pela autora com ilustrações disponíveis em: < <https://www.biorender.com/>>

Os adesivos contendo a substância a ser testada, S4 ou pelitorina, foram colocados sobre a lesão uma vez por dia, sempre pela manhã, e retirados após 12 horas, durante o período noturno, no qual os animais ficam mais ativos e podiam acabar causando escoriações na tentativa de retirada dos adesivos.

Cada adesivo possuía a medida de 1x1 cm<sup>2</sup>, contendo 0,294 mg/cm<sup>2</sup> ou 0,4 mg/cm<sup>2</sup> da substância pelitorina e S4 respectivamente, tais, doses empregadas nos adesivos foram fundamentadas em ensaios *in vitro* conduzidos utilizando a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Isso é aplicável tanto para o presente estudo, no contexto da substância pelitorina, quanto em relação ao estudo conduzido por Santos em 2018, no que diz respeito à S4.

Durante o tratamento, os animais ficaram isolados um em cada caixa, todos foram monitorados diariamente a cada 3 horas (substituindo os adesivos quando necessário).

O fármaco anfotericina B foi adotado como controle positivo, sendo administrado por via intraperitoneal à concentração de 0,63 mg/Kg (DE<sub>50</sub>), com base em uma abordagem desenvolvida por nossa equipe, a qual encontra-se em curso e ainda não foi objeto de publicação. O fármaco foi administrado em um volume de 200 µL, consistindo em 11 doses fixas em dias alternados. Animais infectados e sem tratamento, compuseram o controle negativo. O tratamento perdurou por um período de 20 dias. Visando evitar infecções secundárias durante a troca dos adesivos, as lesões foram higienizadas com solução salina a cada troca, esse procedimento de higienização foi feito em todos os grupos do experimento.

### 3.13.3 Quantificação da carga parasitária e avaliação dos fatores bioquímicos

Após 24 horas da última troca dos adesivos, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal (quetamina/xilazina/morfina nas doses de 50/10/2mg/kg, respectivamente) e retirado aproximadamente 1 mL do sangue da veia cava que foi utilizado para a avaliação dos fatores bioquímicos. Posteriormente, realizou-se a retirada da lesão do dorso e pesado na balança analítica. Uma parte da lesão foi direcionada para realização do teste de retenção

cutânea. Outras partes dos tecidos do dorso e linfonodos foram macerados separadamente em meio RPMI suplementado com SFBi 10% e ao término da maceração, o conteúdo resultante foi diluído 100x em meio RPMI completo e plaqueado em placa de 96 poços com um volume final de 200 $\mu$ L.

Após sete dias de incubação em estufa B.O.D à 24°C, foi realizada a quantificação da carga parasitária pelo método do AlamarBlue. Uma alíquota de 20 $\mu$ L (2mM) foi adicionada a cada poço e, em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa B.O.D a 24 °C por 5 horas. A fluorescência foi determinada no espectrofotômetro (Biotek, Synergy) sob os parâmetros 530/25 excitação e 590/35 emissão (adaptado de MASIC, 2015; MACEDO, 2015). A pele macerada de animais saudáveis foi utilizada como controle e a leitura foi desconsiderada para todas as amostras obtidas dos demais grupos.

O sangue coletado foi centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos e o soro obtido foi utilizado para as dosagens de transaminase glutâmica pirúvica (TGP) ou alanina aminotransferase (ALT), de transaminase glutâmica oxaloacética (TGO) ou aspartatoaminotransferase (AST), ureia e creatinina. Foram realizados os ensaios colorimétricos utilizando kits comerciais conforme as normas do fabricante (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) para realizar esta análise.

### **3.14 Análise estatística dos dados**

As análises estatísticas, foram realizadas utilizando os programas GraphPad Prism versão 8.0 e Origin versão 9.1.

Para os cálculos de CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células) e IC<sub>50</sub> (Concentração da substância que inibe 50% das amastigotas intracelulares) foram feitas regressões não lineares das médias e dos valores referentes a cada concentração, esses valores foram observados com base de no mínimo três experimentos independentes.

Para a análise da evolução do inchaço das lesões dos camundongos, foi utilizado o Teste Two-way repeated measure ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey.

Em todos os métodos utilizados, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p obtido apresentou resultado menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

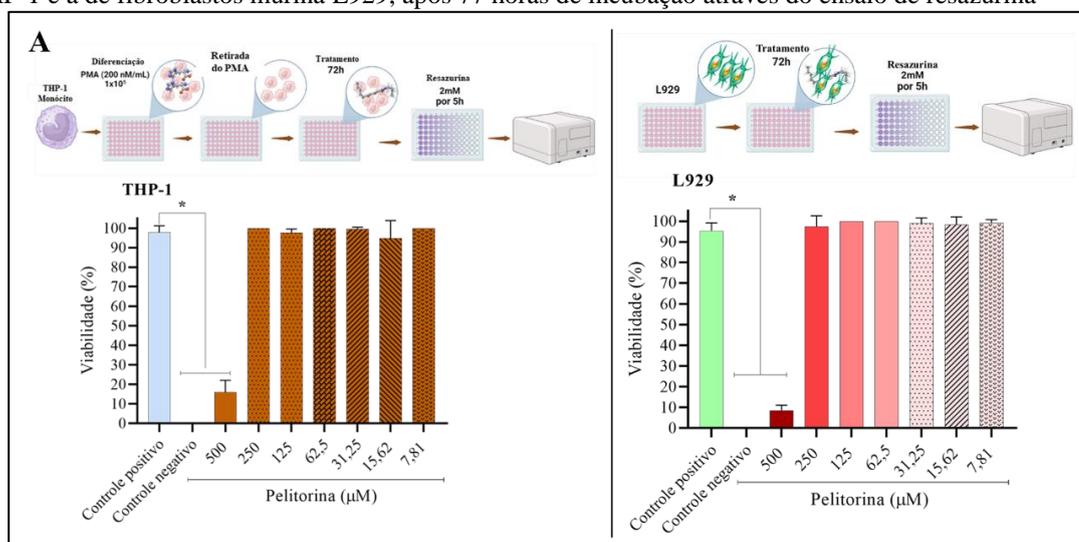
### 4.1 Atividade citotóxica das substâncias

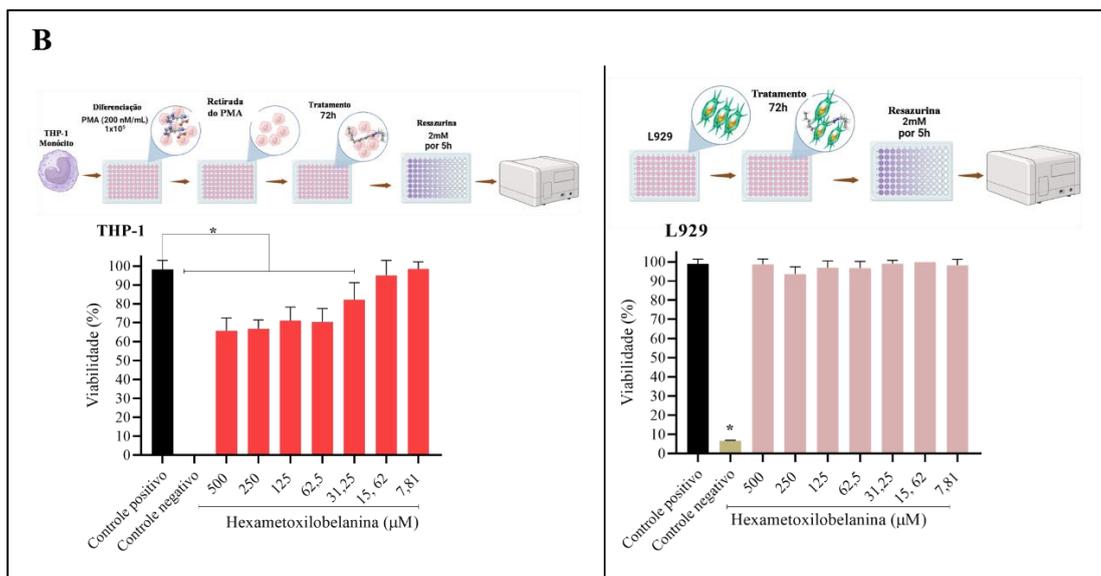
A investigação da atividade citotóxica das substâncias S4 e pelitorina foi realizada com as linhagens celulares monocítica humana - THP-1 e fibroblástica murina - L929, utilizando concentrações que variaram de 500  $\mu\text{M}$  a 7,81  $\mu\text{M}$ , tendo sido submetidas a uma diluição de 1/2.

Após análises dos dados, os resultados indicaram que a concentração citotóxica da pelitorina para 50% da população celular ( $\text{CC}_{50}$ ) foi de  $476,8 \pm 7,28 \mu\text{M}$  para THP-1 e  $363,7 \pm 6,36 \mu\text{M}$  para L929, como ilustrado na figura 25A.

Os dados para a substância S4 indicaram que o valor de  $\text{CC}_{50}$  foi maior do que 500 $\mu\text{M}$  para as duas linhagens celulares (Figura 25B)

**Figura 25** – Determinação do efeito citotóxico da pelitorina (A) e S4 (B), frente a linhagem monocítica humana THP-1 e a de fibroblastos murina L929, após 77 horas de incubação através do ensaio de resazurina





**Nota: A** – Efeito citotóxico da pellitorina em células THP-1 e L929. **B**– Efeito citotóxico da S4 em células THP-1 e L929. Controle de positivo = Células não tratadas; Controle negativo = Células tratadas com tampão de lise. Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de três experimentos independentes. Foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para  $p < 0,05$ . Colunas marcadas com (\*) diferem estatisticamente quando comparado com o controle não tratado. Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado Pós-teste de Tukey.

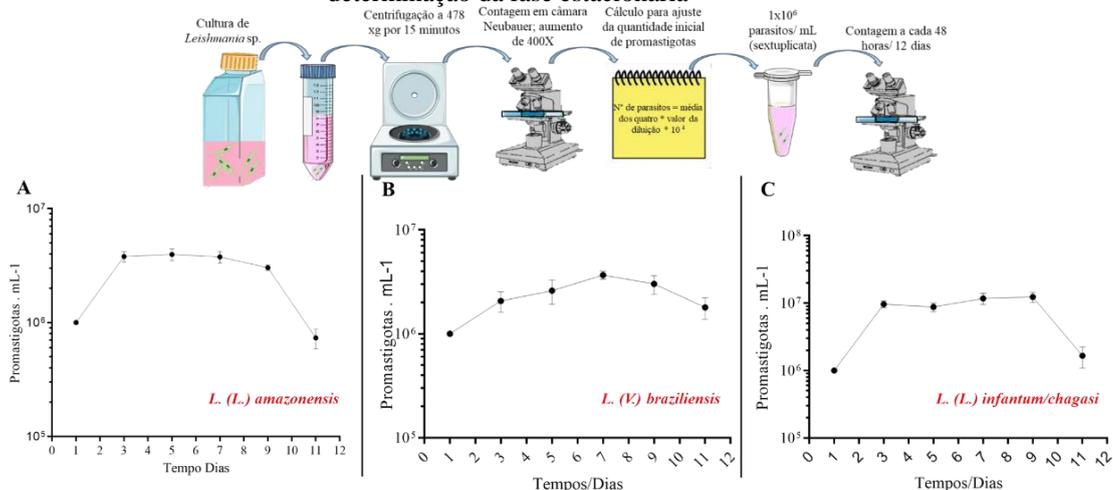
#### 4.2 Curva de crescimento das cepas de *Leishmania* spp.

As curvas de crescimento de todas as espécies utilizadas no presente estudo estão apresentadas na figura 26. Através da curva de crescimento foi possível determinar as fases de desenvolvimento dos parasitos cultivados *in vitro*.

A fase log foi atingida entre o 1 e 3º dia para todas as espécies, sendo que para a *L. (V.) braziliensis* essa fase se mostrou mais lenta e se estendeu até o 7º dia.

A fase estacionária da *L. (L.) amazonensis* foi observada entre os dias 5 e 7, enquanto para *L. (V.) braziliensis* essa fase ocorreu entre o 7º e 9º dia e para *L. (L.) infantum/chagasi* ocorreu entre 4º e 9º dia de cultivo. Nessa fase foram retiradas alíquotas para realização dos experimentos com todas as espécies citadas. Por fim, a fase de declínio ocorreu após 8º dia de cultivo da *L. (L.) amazonensis* e após o 9º das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum/chagasi*.

**Figura 26**– Curva de crescimento das cepas *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67PH8), *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/2014/310 (RO-310), e *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), para avaliação e determinação da fase estacionária



**Nota:** **A** - Curva de crescimento da cepa *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67PH8); **B** - Curva de crescimento da cepa *Leishmania (V.) braziliensis* MHOM/BR/2014/310; **C** - Curva de crescimento da cepa *L. (L.) infantum/chagasi* (MHOM/BR/1972/LD). Contagem realizada através da câmara hemocitométrica de Neubauer em microscópio óptico em aumento de 400× utilizando o corante Eritrosina B a 0,04% (p/v). Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de três experimentos independentes.

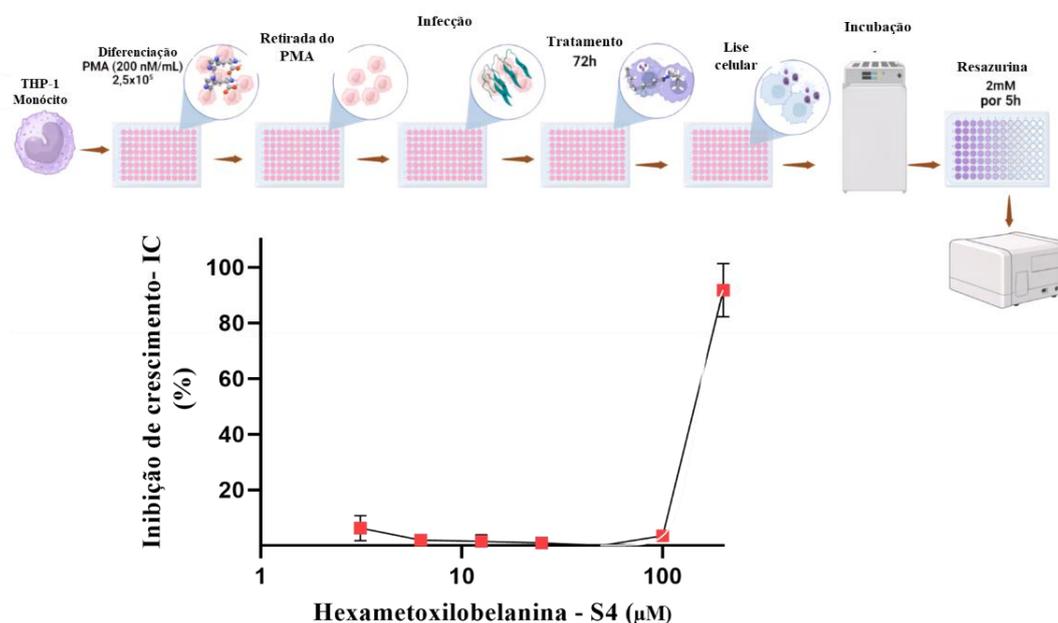
#### 4.3 Atividade leishmanicida da S4 contra formas amastigotas de *Leishmania* spp.

A atividade da substância S4 contra a forma amastigota de *L. (L.) amazonensis* foi previamente evidenciada em estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa e registrado em um pedido de patente (CALDERON *et al.*, 2021). Nesse contexto, a concentração que demonstrou capacidade de inibir 50% dos parasitos *in vitro* foi de 10  $\mu$ M. Portanto, tal ensaio não foi repetido no âmbito do presente estudo para essa espécie específica. O valor de IC<sub>50</sub> estabelecido pela pesquisa de Calderon *et al.* (2021) foi empregado neste estudo atual para direcionar investigações subsequentes, como a análise de permeação cutânea da substância e avaliação tóxica *in vivo* em um modelo murino.

Ao avaliar os dados dos macrófagos infectados e tratados com a substância S4 não foi observada qualquer inibição no crescimento em relação a *L. (V.) braziliensis*.

Em relação aos dados referentes à atividade leishmanicida da S4 frente *L. (L.) infantum/chagasi* a concentração inibitória para 50% dos parasitos foi estimada em de  $145,7 \pm 2,8$   $\mu$ M, conforme figura 27.

**Figura 27** – Avaliação leishmanicida da substância hexametoxilobelanina, frente amastigotas de *L. (L.) infantum/chagasi*, tratadas por 72 horas.



**Nota:** Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de três experimentos independentes.

O índice de seletividade (IS) foi calculado com base no valor de  $\text{IC}_{50}$  fornecido por Calderon *et al.* (2021), evidenciando que a S4 apresenta uma seletividade 50 vezes maior para *L. (L.) amazonensis* em relação às duas linhagens celulares avaliadas no presente estudo. A análise dos dados relativos aos macrófagos infectados e tratados com a substância S4 não revelou inibição de crescimento de *L. (V.) braziliensis*, impossibilitando assim o cálculo do índice de seletividade para essa espécie. Em contrapartida, o índice de seletividade (IS) da S4 referente a *L. (L.) infantum/chagasi* foi calculado em 3,43, conforme tabela 2.

**Tabela 2** – Índice de seletividade da S4 para *Leishmania* spp. em relação ao macrófago de linhagem monocítica humana- THP-1 e as células fibroblásticas de linhagem L929.

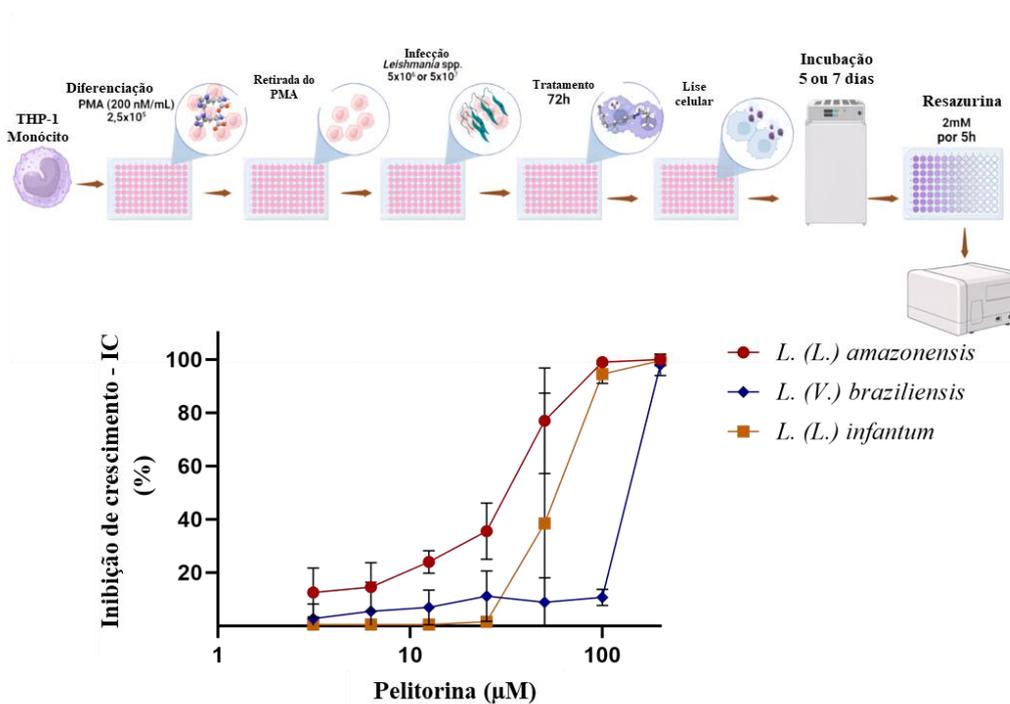
Espécie	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	IS	
		THP-1	L929
<i>L. (L.) amazonensis</i>	10	50	50
<i>L. (V.) braziliensis</i>	>200	-	-
<i>L. (L.) infantum/chagasi</i>	145,7	3,43	3,43

**Nota:** O índice de seletividade foi calculado pela razão do  $\text{CC}_{50}$  (concentração citotóxica) em função do  $\text{IC}_{50}$  (inibição de crescimento de amastigotas).

#### 4.4 Atividade leishmanicida da pelitorina contra formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Os resultados relativos à atividade leishmanicida revelaram que as concentrações inibitórias para 50% das amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* em resposta à substância pelitorina foram estimadas em  $27,31 \pm 3,68$ ,  $55,12 \pm 3,97$  e  $128 \pm 8,48 \mu\text{M}$ , respectivamente, conforme demonstrado na figura 28.

**Figura 28** – Avaliação leishmanicida da substância pelitorina, frente amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum/chagasi*, tratadas por 72 horas.



**Nota:** Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de três experimentos independentes.

O índice de seletividade (IS) é um importante indicador da eficácia de uma substância em inibir o crescimento de parasitas em comparação com células hospedeiras. Quanto maior o IS, mais seletiva é a substância para as amastigotas de *Leishmania* em comparação com as células hospedeiras. Na tabela 3, os IS para cada espécie de *Leishmania* são apresentados em relação às células THP-1 (macrófagos) e células fibroblásticas L929.

Para *L. (L.) amazonensis*, a pelitorina apresenta um IS de aproximadamente 17,45 em relação às células THP-1 e 13,29 em relação às células L929. Isso indica uma seletividade significativamente maior da pelitorina para as amastigotas da *L. (L.) amazonensis* em comparação com as células hospedeiras.

Para *L. (V.) braziliensis*, a pelitorina demonstra um IS de aproximadamente 3,72 em relação às células THP-1 e 2,83 em relação às células L929. Embora menor do que para *L. (L.) amazonensis*, ainda indica uma seletividade moderada da pelitorina para as amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

Para *L. (L.) infantum/chagasi*, a pelitorina exhibe um IS de aproximadamente 8,65 em relação às células THP-1 e 6,5 em relação às células L929. Isso sugere uma seletividade moderada a alta da pelitorina para as amastigotas de *L. (L.) infantum/chagasi*.

**Tabela 3** - Índice de seletividade obtido através da razão do CC<sub>50</sub> da pelitorina para macrófago de linhagem monocítica humana- THP-1 e células fibroblásticas de linhagem L929, e IC<sub>50</sub> frente *Leishmania* spp.

Espécie	IC <sub>50</sub> (µM)	IS	
		THP-1	L929
<i>L. (L.) amazonensis</i>	27,31	17,45	13,29
<i>L. (V.) braziliensis</i>	128	3,72	2,83
<i>L. (L.) infantum/chagasi</i>	55,12	8,65	6,5

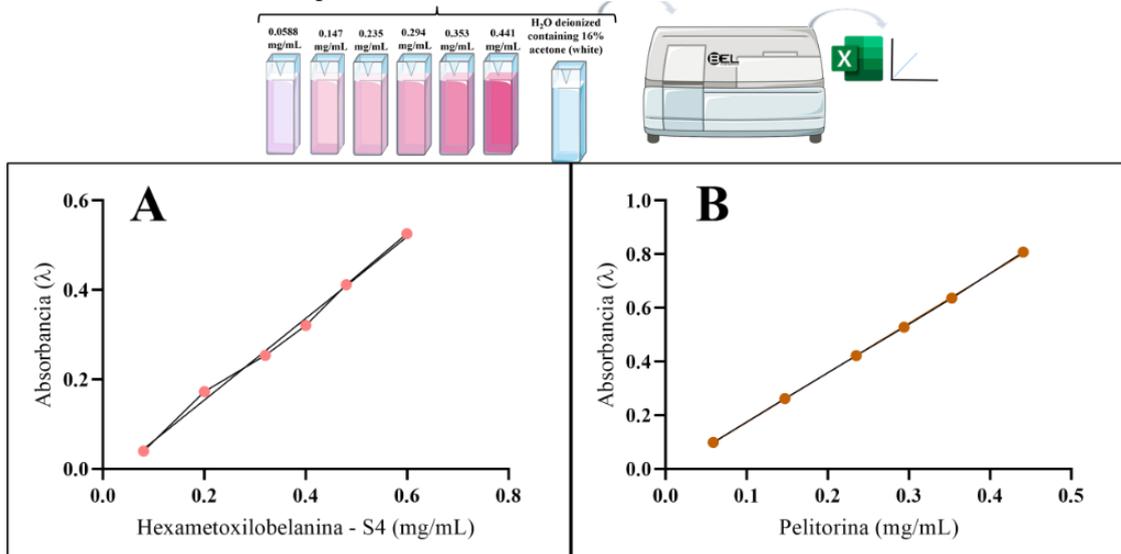
**Nota:** O índice de seletividade foi calculado pela razão do CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica) em função do IC<sub>50</sub> (inibição de crescimento de amastigotas).

## 4.5 Avaliação da permeação e retenção cutânea *in vitro* das substâncias

### 4.5.1 Análise da curva analítica das substâncias

Os resultados obtidos na curva analítica demonstraram que houve um aumento proporcional na absorbância das amostras em relação ao aumento das concentrações, ou seja, atingiu-se uma linearidade, sendo o coeficiente de correlação obtido igual a 0,995 (equação da reta:  $y = 0,9122x - 0,02856$ ) para S4 e 0,999 para pelitorina (equação da reta:  $y = 1,8451x - 0,0011$ ), estando em consonância com os parâmetros exigidos pela ANVISA, conforme ilustrado na figura 29 (BRASIL, 2017).

**Figura 29** – Curvas de calibração das substâncias S4 e pelitorina, obtidas pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta.

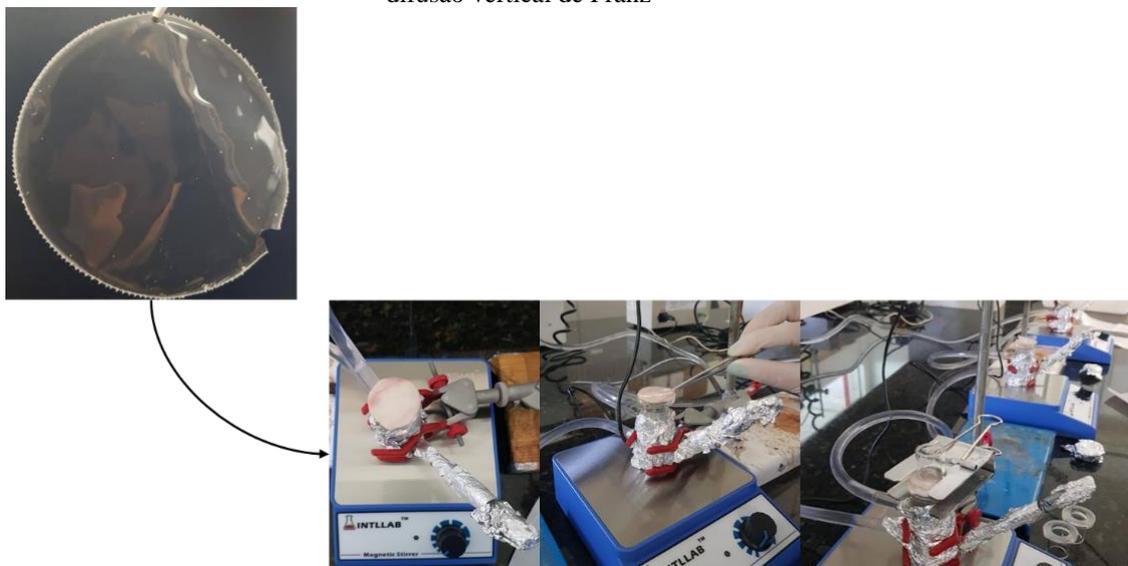


**Nota:** **A** = Curva de calibração da substância hexametoxilobelanina – S4 obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta. Concentração das soluções de 0,08 a 0,6 mg/mL. Leituras efetuadas a 306,0 nm. **B** = Curva de calibração da substância pelitorina obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta. Concentração das soluções de 0,0588 a 0,441 mg/mL. Leituras efetuadas a 340,0 nm. Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de dois experimentos independentes.

#### 4.5.2 Análise da permeação e retenção das substâncias

Com o propósito de investigar a habilidade do filme polimérico eudragit/PG em liberar as substâncias S4 e pelitorina na pele, procedeu-se à realização de estudos de permeação *in vitro* empregando células de difusão do tipo Franz (Figura 30).

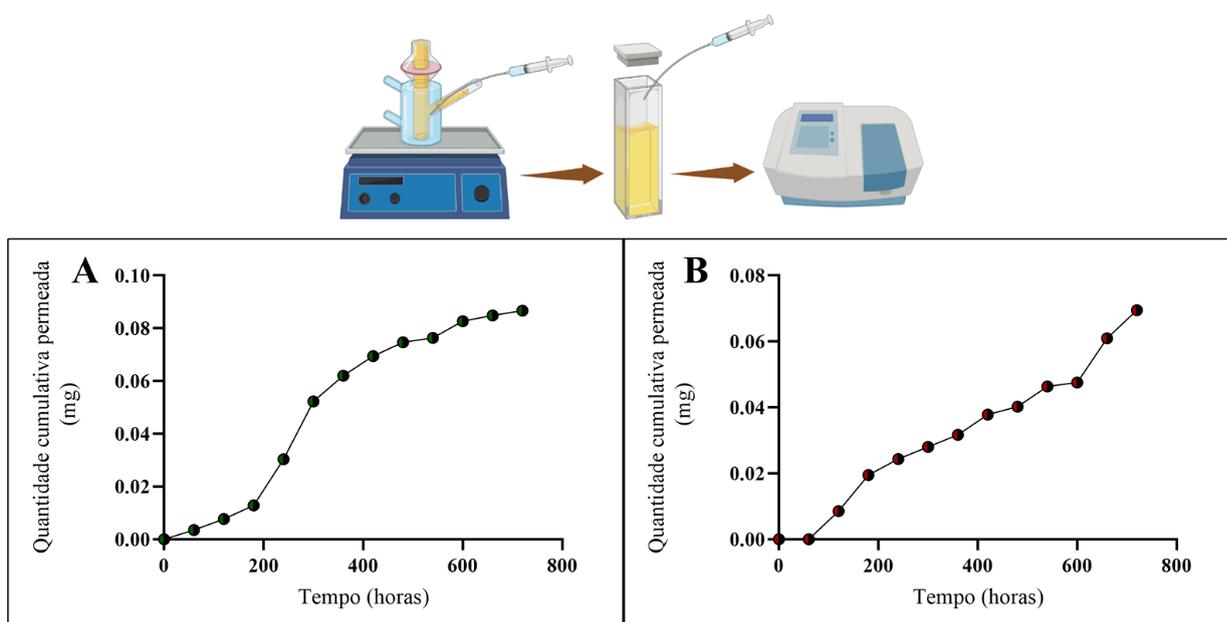
**Figura 30** – Filme polimérico produzido e sistema de permeação cutânea, adaptado, com célula de difusão vertical de Franz



**Fonte:** Elaborado pela autora

O filme colocados sobre a pele suína no compartimento doador (1,77 cm<sup>2</sup>) continham uma quantidade total estimada de 0,111 mg de S4 ou pelitorina. Ao final das 12 horas de experimentação a média de concentração da substância S4 permeada através da pele foi de  $0,0958 \pm 0,0129$  mg (0,072344 mg/cm<sup>2</sup>), totalizando  $76,6 \pm 11,69\%$ , e da substância pelitorina foi de  $0,0695 \pm 0,018$  mg ( $0,039 \pm 10,22$  mg/cm<sup>2</sup>), totalizando  $62,56 \pm 1,24\%$ , conforme figura 31.

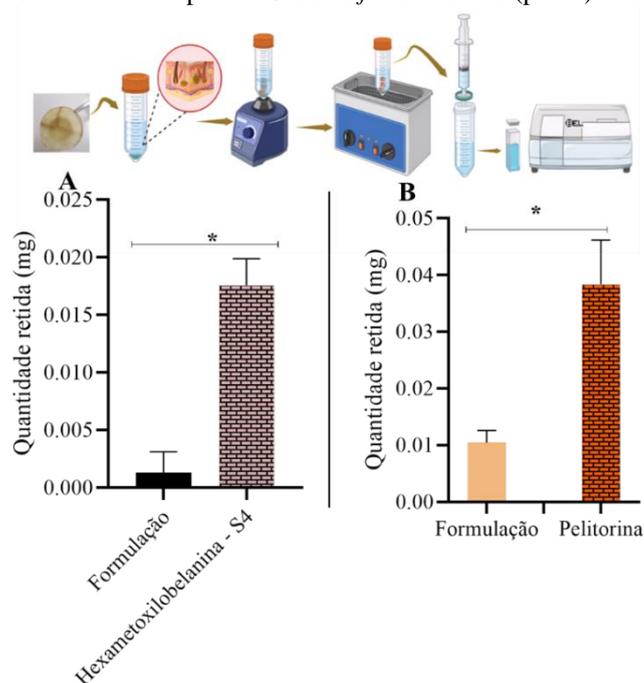
**Figura 31**– Perfil de permeação *in vitro* das substâncias S4 e pelitorina, incorporadas na formulação matricial em filme, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco).



**Nota:** **A** = Quantidade cumulativa permeada (mg) de S4 em relação ao tempo (horas); **B** = Quantidade cumulativa permeada (mg) de pelitorina em relação ao tempo (horas). Os gráficos referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de um experimento.

A avaliação da quantidade de cada substância retida na pele foi realizada conforme descrito no item 3.12.3. Os resultados apresentados na figura 32 revelam que a quantidade de S4 e pelitorina retidas na pele após 12 horas foram de  $0,01757$  mg ( $\pm 0,00232$ ) e  $0,026 \pm 0,023$  mg, respectivamente.

**Figura 32** – Quantidade das substâncias hexametoxilobelanina – S4 e pelitorina, retidas após 12 horas em contato com a pele de *Sus scrofa domesticus* (porco).



**Nota:** **A:** Quantidade retida da substância S4; **B:** Quantidade retida da substância pelitorina. Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de dois experimentos independentes. Foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para  $p < 0,05$ . Colunas marcadas com (\*) diferem estatisticamente quando comparado com o controle (Branco – somente a matriz do filme sem a substância incorporada). Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado o Pós-teste de Tukey.

#### 4.5.3 Determinação dos parâmetros de permeação das substâncias

A tabela 4 apresenta os parâmetros de permeabilidade derivados dos resultados obtidos no teste de permeação cutânea. O fluxo constante ( $J$ ) da substância S4 foi calculado como  $2,69 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ , valor que se assemelha ao fluxo da pelitorina, que foi de  $2,43 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ . O período necessário para que a passagem das substâncias pela pele alcançasse o estado de equilíbrio foi de 0,95 horas para a S4 e 1,1 horas para a pelitorina. O coeficiente de permeabilidade da hexametoxilobelanina foi 0,8 vezes maior em comparação ao da pelitorina.

**Tabela 4** – Resultados obtidos, durante a avaliação da permeabilidade das substâncias hexametoxilobelanina – S4 e pelitorina, através da pele de orelha suína, após quantificação em espectrofotômetro direto no ultravioleta.

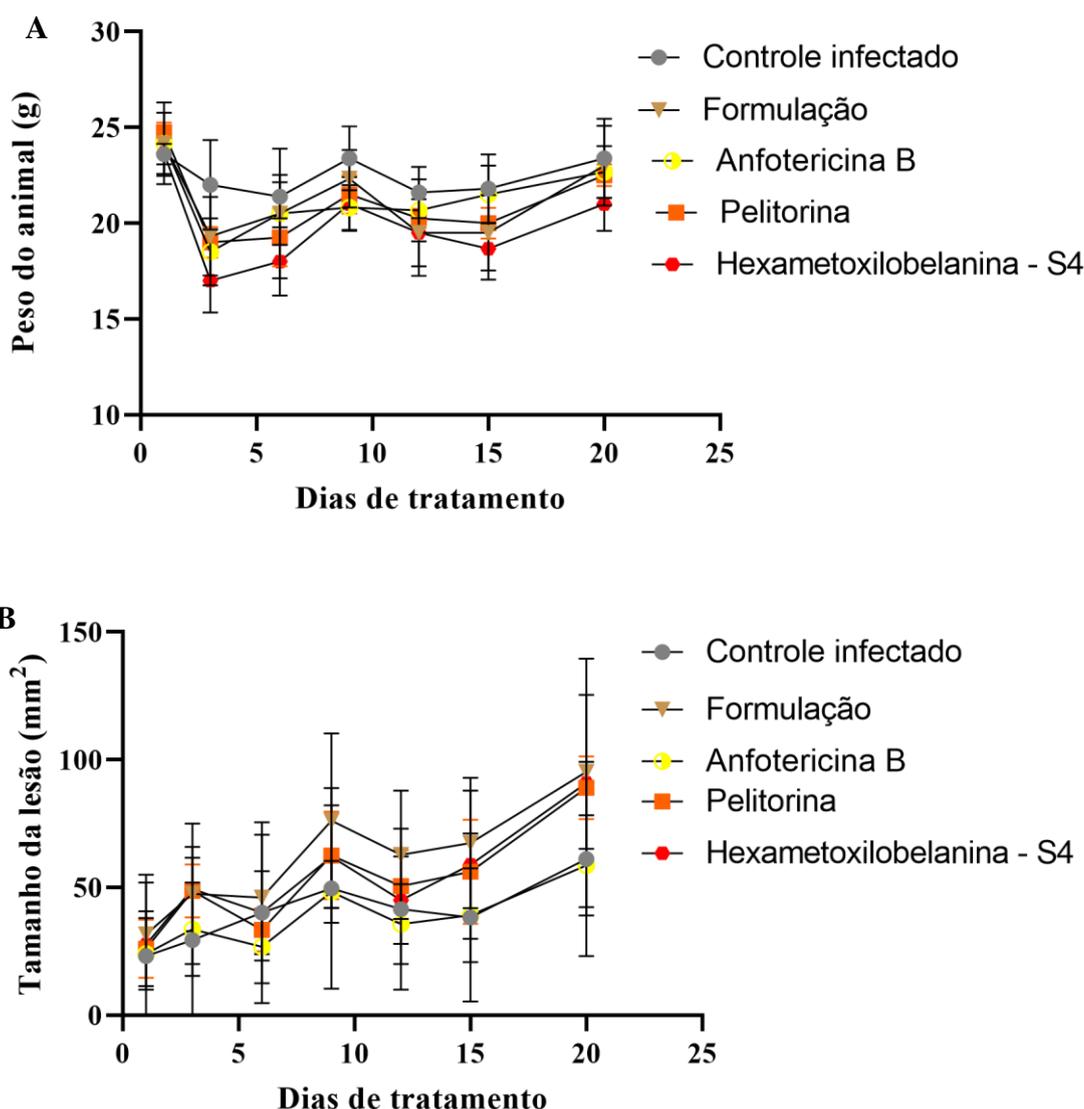
Parâmetros avaliados	Hexametoxilobelanina	Pelitorina
Fluxo $J$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$ )	$2,69 (\pm = 0,8)$	$2,433 (\pm = 0,04)$
Coefficiente de permeabilidade (cm/h)	$2,55 \times 10^{-2} (\pm = 1,181)$	$1,75 \times 10^{-2} (\pm = 0,00029)$
Tempo de latência (h)	$0,95079 (\pm = 1,181)$	$1,101912 (\pm = 0,7319)$

**Nota:** Os resultados referem-se à média e desvio padrão ( $\pm$ ) de triplicatas de dois experimentos independentes.

#### 4.6 Atividade leishmanicida *in vivo*

Quanto ao tamanho da lesão e peso dos animais durante o tratamento *in vivo*, não foi identificada diferença significativa entre os grupos avaliados, conforme demonstrado na figura 33 (A e B).

**Figura 33** – Peso dos animais e tamanho médio das lesões do dorso dos camundongos Balb/c após inoculação de *L. (L.) amazonensis* tratados ou não com pellitorina ou S4 em formulação matricial tipo filme via transdérmica e da anfotericina B (via intraperitoneal).

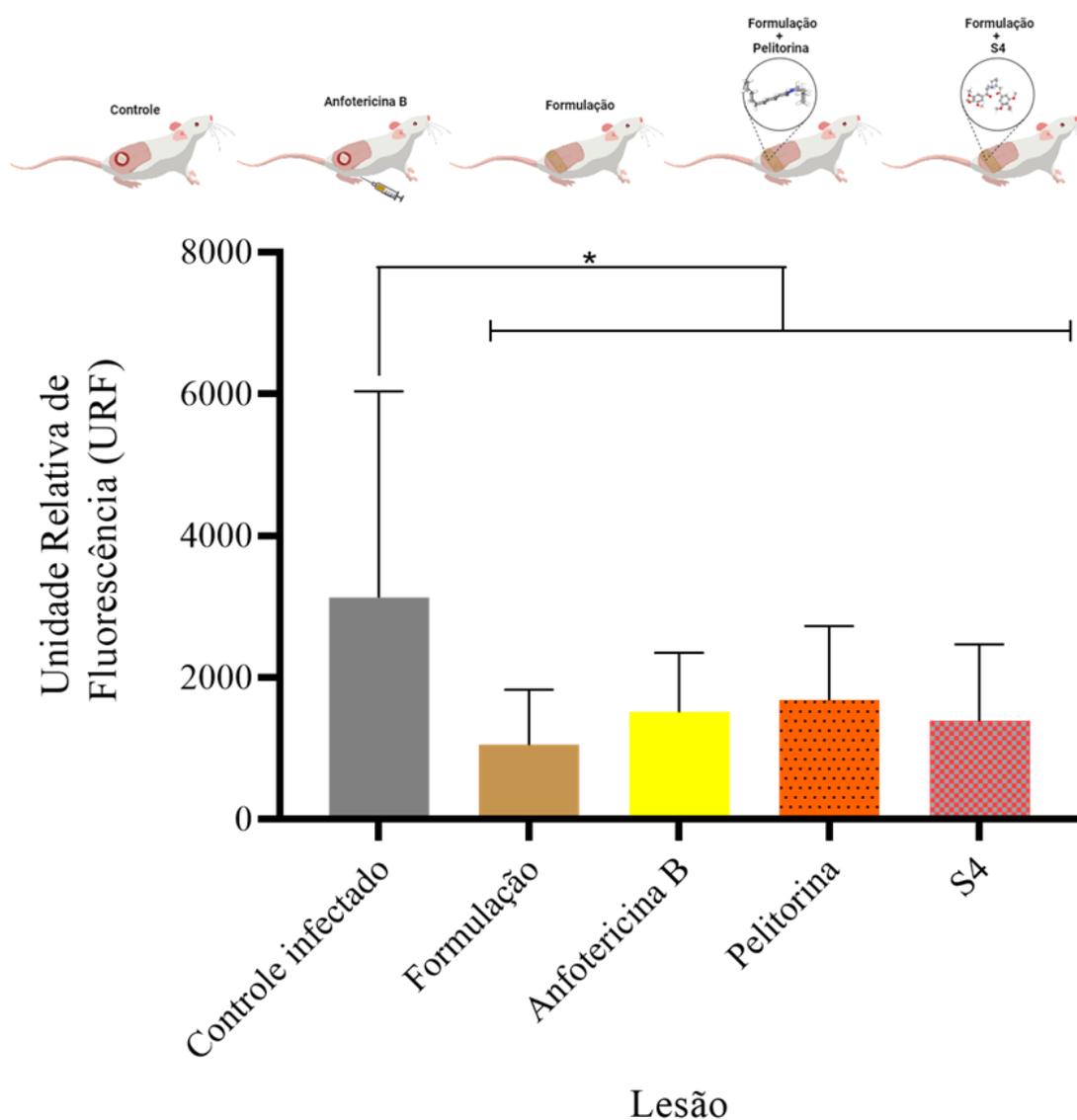


**Nota:** **A** = Peso dos animais; **B** = Tamanho médio das lesões do dorso dos camundongos Balb/c após inoculação de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não. Controle = Grupo não infectado e sem tratamento, Formulação = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação matricial (via transdérmica), Anfotericina B = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal), Pellitorine = Grupo infectado e tratado com a pellitorine formulada em filme matricial (via transdérmica).

Pela quantificação da carga parasitária, verificou-se uma diminuição da parasitemia dos camundongos estudados quando tratados com a formulação do filme contendo pellitorina, com

inibição da parasitemia de  $60,71 \pm 22,68\%$ . Perfil semelhante foi observado para a formulação filme contendo S4 que inibiu  $59,52 \pm 31,51\%$  da parasitemia. Os animais tratados somente com a formulação do filme sem a adição de substância também apresentaram diminuição na carga parasitária, com inibição de  $71,54 \pm 22,53\%$ . Diante desses dados, não houve estatística entre os grupos tratados com as formulações do filme contendo ou não pellitorina, conforme demonstrado na figura 34.

**Figura 34** – Avaliação indireta da carga parasitária através da URF (Unidade Relativa de Fluorescência) em lesões do dorso de camundongos fêmeas BALB/c infectadas com *L. (L) amazonensis* e tratadas com pellitorine formulação matricial tipo filme (via transdérmica) e da anfotericina B (via intraperitoneal).



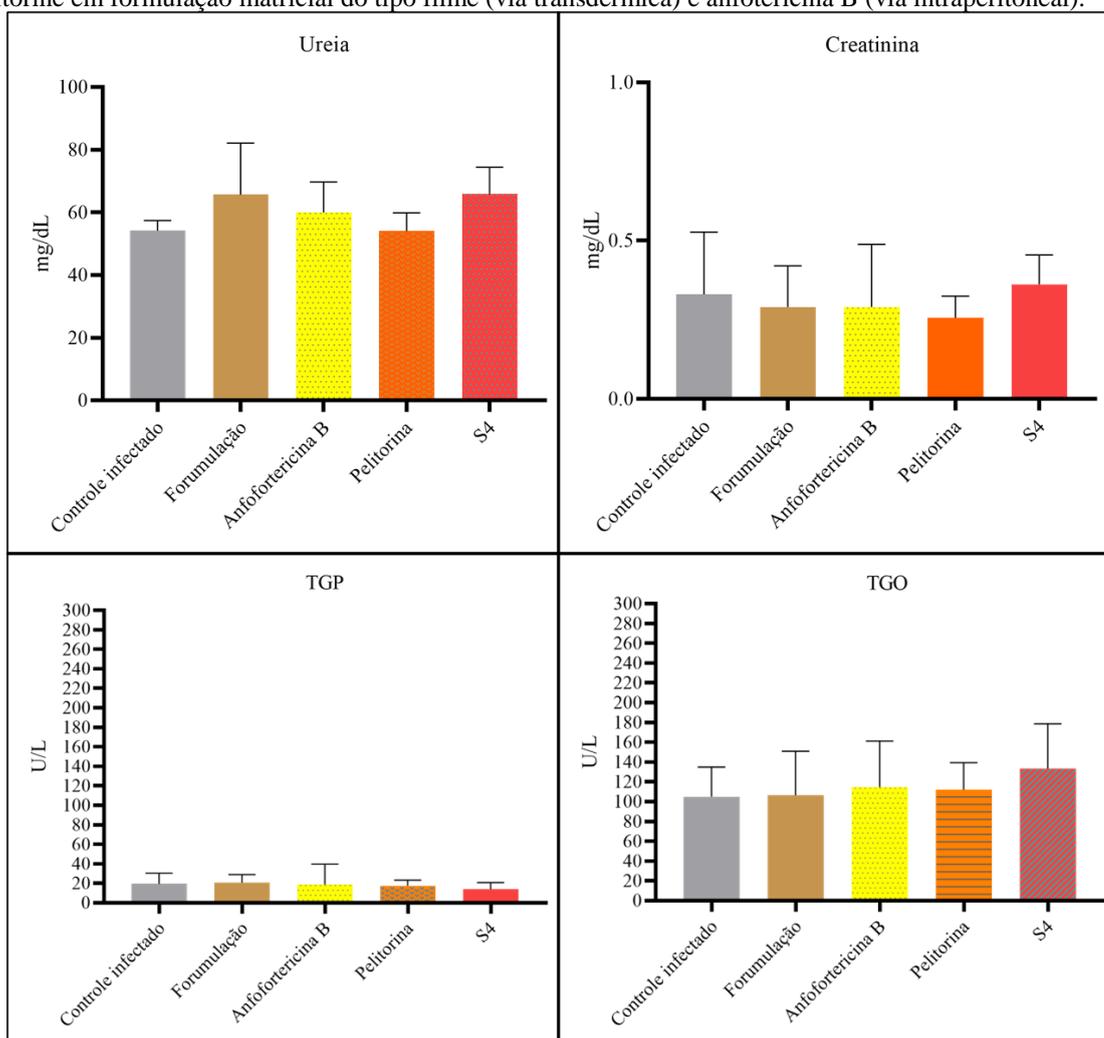
**Nota:** Controle = Grupo não infectado e sem tratamento, Formulação = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação matricial (via transdérmica), Anfotericina B = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal), Pellitorine = Grupo infectado e tratado com a pellitorine formulada em filme matricial (via transdérmica). Os dados foram expressos como leitura da unidade relativa de

fluorescência de parasitos vivos. Grupos marcados com asterisco (\*) apresentam significância estatística quando comparados com grupo controle (Grupo infectado sem tratamento) pelo teste ANOVA ( $p < 0,0001$ ), seguido por pós-teste de Tukey. Médias e os desvios padrão foram analisados entre os números de animais em cada grupo. Os grupos tinham número amostral de 4 a 6 animais.

Não foram identificadas diferenças nos grupos tratados com filme (formulação, pelitorina ou S4) em relação ao grupo tratado com o fármaco de referência anfotericina B, que inibiu cerca de  $61,20 \pm 23,87$  da parasitemia. Todos os grupos tratados foram estatisticamente eficazes quando comparado ao grupo controle (animais infectados e sem tratamento), conforme demonstrado na figura 34.

Os resultados dos ensaios bioquímicos sorológicos de ureia, creatinina, TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica) não mostraram diferenças significativas em relação ao controle não tratado, isso pode indicar que os parâmetros analisados estão dentro dos limites normais, conforme demonstrado na figura 35.

**Figura 35** – Concentrações séricas da ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) de animais Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados e não tratados com Pellitorine em formulação matricial do tipo filme (via transdérmica) e anfotericina B (via intraperitoneal).



**Nota:** Os resultados mostrados representam a média  $\pm$  desvio padrão das dosagens enzimáticas dos animais em seus referidos grupos. Grupos marcados com asterisco (\*) apresentam significância estatística quando comparado com grupo controle (Grupo sem tratamento) pelo teste ANOVA ( $p < 0,001$ ), seguido por Teste de Tukey. Médias e os desvios padrões foram analisados entre os números de animais em cada grupo. Os grupos tinham número amostral de 4 a 6 animais.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar da alta prevalência dos casos de leishmaniose, poucos são os avanços para o tratamento dessa doença. Sendo a introdução da miltefosina, com administração por via oral, no arsenal terapêutico o progresso mais recente.

As opções de medicamentos disponíveis atualmente estão associadas à efeitos colaterais, tais como, cardiotoxicidade, mialgia, pancreatite, hepatotoxicidade, dor abdominal. Além disso, apresentam custo elevado, exigem uma administração a longo prazo, o que complica a conclusão do tratamento, e ainda podem levar ao desenvolvimento de possível resistência (MENEZES *et al.*, 2015; BRASIL, 2017; BRASIL, 2020a; 2020b; SILVA, 2021). Diante disso, é evidente a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose (ULIANA; TRINCONI; COELHO *et al.*, 2017). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de novos ensaios para a triagem de compostos antileishmania (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

Nessa perspectiva, o presente estudo avaliou a atividade leishmanicida de duas substâncias, a S4 e a pelitorina. No qual, inicialmente foram realizados os ensaios de citotoxicidade para avaliar a aplicabilidade geral das substâncias avaliadas. Considerando o desenho experimental, as duas linhagens L929 (fibroblastos de camundongos) e THP-1 (monócito humano) foram selecionadas, os resultados dos ensaios foram obtidos 77 horas após os tratamentos com as substâncias. A norma ISO 10993-5:2009 padroniza os testes de citotoxicidade *in vitro* e, dentre as várias células recomendadas para a esse fim, essas linhagens celulares humana e murina são bem conhecidas e empregadas (ISO - ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL PARA PADRONIZAÇÃO, 2009). Quando o potencial citotóxico da S4 foi avaliado contra essas células, observou-se que valores de  $CC_{50}$  foram acima de 500  $\mu\text{M}$  não se mostrando tóxica para as linhagens THP1 e L929.

Os resultados estão convergentes com aqueles apresentados no pedido de patente dessa substância (CALDERON *et al.*, 2021) e são complementares, uma vez que os resultados sobre viabilidade celular com fibroblastos são inéditos. No ensaio realizado por Calderon *et al.* (2021), a substância S4 apresentou menor citotoxicidade ( $CC_{50} = 302,55$ ) em relação aos fármacos de referência pentamidina ( $CC_{50} = 30,16$ ) e anfotericina B ( $CC_{50} = 8,26$ ).

Quando analisado o perfil de citotoxicidade da pelitorina, ela apresentou um valor de  $CC_{50}$  de 476,8  $\mu\text{M}$  para THP-1 e 363,7  $\mu\text{M}$  para células L929. Estes resultados são consistentes com os dados da literatura disponível, onde a substância não afetou a viabilidade celular quando testada em células endoteliais primárias da veia umbilical humana (HUVEC), células

mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e linha celular humana monocítica U-937 diferenciada em macrófagos, em concentrações mais baixas do que as utilizadas neste estudo (30  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ) (KU *ET AL.*, 2013; LEE *ET AL.*, 2014; WALKER *ET AL.*, 2016; NGO *et al.*, 2017).

O estudo de Ee *et al.*, (2010) classificam a amida como uma substância com potencial atividade anticancerígena, considerando que o pelitorina, isolada de *Piper nigrum*, foi citotóxico para a linhagem celular HL60 (células de leucemia promielocítica humana) com valor de CC<sub>50</sub> de 58,2  $\mu\text{M}$ , e tóxico para MCF-7 (linhagem celular de câncer de mama) com CC<sub>50</sub> de 8,06  $\mu\text{M}$ . Portanto, os estudos identificados para nossa análise indicam que o potencial citotóxico do pelitorine pode variar dependendo da linhagem celular utilizada.

Conhecendo as concentrações citotóxicas das substâncias, o próximo passo foi a avaliação leishmanicida, destas, contra as formas amastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. Considerando que as culturas de amastigotas intracelulares em células imortalizadas são reconhecidas como modelo biológico *in vitro* com maior semelhança às condições reais de infecção por *Leishmania* spp., optou-se pela utilização de macrófagos derivados da linhagem THP-1, aceita como modelo experimental para infecção de várias espécies de promastigotas de *Leishmania*, devido a sua similaridade e rendimento, fornecendo resultados que são reprodutíveis (AUWERX, 1991; ASHUTOSH GUPTA *et al.*, 2005; BOLHASSANI *et al.*, 2011).

No estudo de Calderon *et al.* (2021), foi verificado que a substância S4 inibiu 50% dos parasitos *in vitro* (amastigota de *L.(L.) amazonensis*) a 10  $\mu\text{M}$ . Tendo em vista que este ensaio foi conduzido por nosso grupo, não houve a necessidade de repetição do mesmo para este estudo. No presente estudo a S4 não demonstrou atividade frente amastigotas de *L. (V.) braziliensis* nas concentrações testadas. No entanto, demonstrou atividade frente amastigotas da espécie *L. (L.) infantum* com a concentração inibitória para 50 % dos parasitos estimada em  $145,7 \pm 2,8 \mu\text{M}$ . A caracterização inédita do espectro da S4 ampliado a outras espécies de *Leishmania* trouxe dados comparativos relevantes, mostrando a maior susceptibilidade das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* a essa substância. Essa observação ficou evidente ao comparar os valores de índice de seletividade da S4 que foi de 50 e 3,43 vezes mais tóxica para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, respectivamente, em relação à macrófagos de linhagem monocítica humana (THP-1) e para células fibroblásticas de linhagem L929.

A amida pelitorina também demonstrou inibição de crescimento contra formas amastigotas e apresentou um valor de IC<sub>50</sub> 128  $\mu\text{M}$  para a espécie *L. (V.) braziliensis*, IC<sub>50</sub> de 55,12  $\mu\text{M}$  para a espécie *L. (L.) infantum* e IC<sub>50</sub> de 27,31  $\mu\text{M}$  para a espécie *L. (L.) amazonensis*.

No estudo de Althaus *et al.* (2014) foi comprovada a atividade antiprotozoária dessa amida frente a forma promastigota de *L. (L.) danovani* (26,7  $\mu\text{M}$ ), assim como, contra o *Trypanosoma brucei* (24  $\mu\text{M}$ ) e *T. cruzi* (37,9  $\mu\text{M}$ ). Nesse mesmo estudo a pelitorina demonstrou atividade frente *Plasmodium falciparum*, com  $\text{IC}_{50}$  de 14,6  $\mu\text{M}$ . A atividade anti-plasmodial da amida também foi demonstrada no estudo de Goodman *et al.* (2019), com  $\text{IC}_{50}$  de 2  $\mu\text{g/mL}$  frente *P. falciparum*. No presente estudo a substância pelitorina demonstrou ser mais seletiva para a espécie *L. (L.) amazonensis*, em relação às células fibroblásticas de linhagem L929 e à macrófagos de linhagem monocítica humana- THP-1. Segundo as orientações do Fundo Global de Tecnologia Inovadora – GHIT, referenciados por Katsuno *et al.* (2015), podem ser considerados como promissores compostos leishmanicidas com  $\text{IC}_{50} < 10\mu\text{M}$  em amastigotas (intracelular), com janela de seletividade superior a 10 vezes para a citotoxicidade, usando linhagem celular.

A utilização de sistemas de entrega transdérmica de substâncias com atividade leishmanicida, tem se mostrado uma alternativa promissora, tanto como tratamento único, quanto em terapia combinada com drogas orais ou intravenosas (LANZA *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2021). Diante disso e do potencial antiparasitário das substâncias apresentado sobre as formas amastigotas principalmente para *L. (L.) amazonensis*, houve o prosseguimento com os ensaios de permeação cutânea *in vitro*, visando a avaliação tópica *in vivo* em modelo murino.

Neste sentido, considerando o desenvolvimento de adesivos transdérmicos, os autores Keleb *et al.* (2010) e Sharma *et al.* (2012) ressaltaram algumas características que os fármacos candidatos a permeação cutânea devem apresentar: peso molecular  $\leq$  a 500 Daltons; coeficiente de partição ( $\log P$ ) entre 1,0 e 4,0; ponto de fusão inferior a 200°C; coeficiente de permeabilidade cutânea  $> 5 \times 10^{-4}$  cm/hora; baixa dosagem ( $\leq 10$  mg/dia); Tempo de meia-vida  $\leq 10$  horas.

Utilizando a análise *in silico*, feita no *software* SwissAdme, algumas das propriedades citadas acima foram avaliadas, na qual os resultados indicaram que ambas as substâncias (S4 e pelitorina) apresentam características físico-químicas apropriadas para permeação cutânea. Outra propriedade condicionante da absorção cutânea de uma substância é o coeficiente de partição óleo/água ( $\log P$ ), tendo em vista que é fundamental que esta penetre através da pele e se dissolva perfeitamente nos fluidos aquosos do organismo (SHARMA *et al.*, 2011; BHOWMIK *et al.*, 2013). A S4 tem um valor de  $\log P$  ligeiramente menor (3,51) do que a pelitorina (3,64). Considerando que o valor ideal de  $\log P$  descrito acima, os valores das substâncias são aceitáveis para penetradores de pele (TANWAR; SACHDEVA, 2016). Substâncias que apresentam equilíbrio entre hidrossolubilidade e lipossolubilidade são

favoravelmente absorvidas pela pele. A rota intercelular é aplicável para medicamentos com coeficiente de partição intermediário e com alta lipofilicidade. A via transcelular provavelmente predomina para moléculas mais hidrofílicas. Desta forma, substâncias altamente hidrofílicas têm dificuldade em penetrar o estrato córneo, diferentemente das substâncias altamente lipofílicas que conseguem penetrar facilmente no estrato córneo, mas ficam retidas nas camadas subjacentes. Sendo assim, o coeficiente de partição deve estar entre 1,0 e 4,0 de modo que a substância penetre adequadamente nos diferentes estratos da pele (NAIK *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2010; KADAM *et al.*, 2014).

Neste trabalho, filmes transdérmicos contendo as substâncias S4 e pelitorina foram formulados utilizando copolímero eudragit RS100 e o plastificante Propilenoglicol (PG), descrito na literatura como promotor de permeação (MARTINS; VEIGA, 2002; BABY *et al.*, 2008). O copolímero eudragit RS100 tem sido amplamente utilizado em diversos tipos de formulações (nanopartícula, comprimido de camada dupla, comprimido de matriz, comprimidos vaginais, entre outras), dentre as formulações desenvolvidas com esses polímeros estão os adesivos transdérmicos (MUTÁLIK; UDUPA, 2004; OFOKANSI; KENECHUKWU; OGWU, 2015; AKHGARI, TAVAKOL, 2016; PATRA *et al.*, 2017).

Os filmes foram avaliados quanto a sua capacidade de liberação das substâncias (S4 e pelitorina) *in vitro*, para que consigam permear a pele, uma vez que, o perfil de permeação *in vitro* é uma importante ferramenta que prevê antecipadamente como uma droga se comportaria *in vivo* (RUELA *et al.*, 2016; NEUPANE *et al.*, 2020).

Inicialmente foi avaliada a linearidade que se trata da capacidade de um método de produzir resultados que são diretamente proporcionais a uma determinada faixa de concentração da substância de interesse (COELHO, 2020). Os dados apresentados na figura 29 demonstraram que houve um aumento proporcional na absorbância das amostras em relação ao aumento das concentrações, ou seja, atingiu-se uma linearidade, sendo o coeficiente de correlação obtido igual a 0,995 para S4 e 0,999 para pelitorina. Esse resultado está de acordo com a legislação vigente, a qual, admite um valor mínimo para coeficiente de correlação de 0,99 (ANVISA, 2017).

A substância S4 incorporada na formulação citada, apresentou uma permeação de aproximadamente 76,6% (correspondente a  $0,0958 \pm 0,0129$  mg) durante o período de 12 horas. Este é o primeiro relato experimental do potencial de permeação cutânea da substância S4. Após 12 horas de experimentação, foi verificada uma quantidade remanescente da substância na pele (0,01757 mg). Essa característica é importante para a entrega pela via tópica de substâncias potencialmente ativas contra *Leishmania* spp. (CARIDHA *et al.*, 2019). Em relação à

substância pelitorina, Veryser *et al.* (2014) já haviam demonstrado o seu perfil de permeação *in vitro* utilizando pele humana. Os autores compararam o perfil de permeação da substância pura (dissolvida em água e Etanol, 30:70) e em extrato da raiz de *Anacyclus pyrethrum* (dissolvido em água e Etanol, 30:70), demonstrando que houve uma permeação significativamente maior da pelitorina presente no extrato em relação a substância isolada. Os autores associaram esse resultado a presença dos outros compostos no extrato, que podem ter contribuído com a maior permeação da substância. O presente estudo é o primeiro a avaliar o perfil de permeação da substância incorporada a uma formulação transdérmica (eudragit/PG). Ao final de 12 horas de experimentação, cerca de 65 % (equivalente a 0,0695 mg) da substância já tinha permeado a pele. A capacidade da pelitorina ficar retida na pele foi demonstrada no presente estudo, corroborando com os dados apresentados por Veryser *et al.* (2014).

A partir dos dados obtidos na permeação cutânea das substâncias foi possível calcular outros parâmetros como o fluxo (J) de permeação cutânea, o coeficiente de permeabilidade aparente (Kp) e o tempo de latência (lag time). Os valores referentes à quantidade permeada das substâncias em função do tempo (fluxo J) foram de 2,69  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$  e 2,43  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ , para S4 e pelitorina, respectivamente. O tempo necessário para que a passagem através da pele atingisse o equilíbrio foi considerado baixo para ambas as substâncias, no qual o lag time foi de 0,9h para S4 e 1h para pelitorina (CAVALCANTI *et al.*, 2016). Pesquisas indicam que o tamanho molecular está relacionado ao lag time (NIELSEN *et al.*, 2009). Em nosso estudo, essa correlação não ocorreu uma vez que o tempo de latência da S4, (massa molar = 515,6) foi ligeiramente menor que o da pelitorina (massa molar = 223,35).

Segundo Schenk *et al.* (2018), embora parte da variabilidade no tempo de latência possa ser atribuída ao tamanho molecular da substância, outros fatores, entre eles polaridade e diluição, podem influenciar no tempo que a substância leva para atingir o equilíbrio durante o processo de permeação. A S4 apresentou valores de Kp mais altos ( $2,55 \times 10^{-2} \text{ cm/h}$ ) comparado aos Kp de pelitorina ( $1,75 \times 10^{-2} \text{ cm/h}$ ). Provavelmente um fator que colaborou para esse cenário tenha sido o seu valor logP ligeiramente mais ideal (3,51).

Nielsen *et al.* (2009) demonstraram em seu estudo que os valores de Kp aumentaram à medida que a hidrofobicidade dos compostos diminuía. Cadeias alifáticas, anéis aromáticos presentes nas substâncias, são responsáveis pelo aumento do carácter lipofílico do fármaco (DIAS, 2013). O valor Kp da substância pelitorina determinado em nosso estudo é substancialmente maior que o descrito por Veryser *et al.* (2014), essa diferença pode estar relacionada com a capacidade da formulação (eudragit/PG) em entregar a substância.

Diante dos resultados *in vitro* obtidos no presente estudo e dos resultados *in vitro* e *in vivo* (via intraperitoneal) frente a espécie *L. (L.) amazonensis* demonstrados por Calderon *et al.* (2021), avaliamos a atividade leishmanicida *in vivo* da formulação eudragit/PG contendo a S4 ou pelitorina frente a essa espécie através da via tópica. Nesse contexto, observou-se uma redução significativa da carga parasitária nos grupos tratados com a formulação do filme contendo pelitorina (cerca de 60%) ou S4 (cerca de 59%). Assim como, ocorreu no grupo tratado somente com a formulação do filme, aproximadamente 71%. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com as formulações do filme contendo ou não qualquer uma das substâncias.

Uma formulação de adesivo transdérmicos tipo matriz, semelhante à desenvolvida no presente estudo, foi elaborada para entrega transdérmica do fármaco lornoxicam, utilizado no tratamento da artrite reumatóide e da osteoartrite. Os autores verificaram que a formulação aumentou a biodisponibilidade do lornoxicam em 2,7 vezes, quando comparado com a forma de dosagem oral (BAVISKAR; PARIK; JAIN, 2013). O uso de um outro tipo de eudragit, (eudragit E 100) incluso na formulação de um hidrogel, se mostrou promissor para a entrega transdérmica, aproximadamente 20% em ensaios *in vitro*, do risedronato, um fármaco com atividade leishmanicida. A formulação desenvolvida foi avaliada *in vivo* frente *L. (L.) amazonensis* durante 22 dias, ocasionando a redução do tamanho das lesões em comparação com camundongos não tratados. Assim como, a diminuição da carga parasitária em cerca de 73% (PERALTA *et al.*, 2021).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que as substâncias S4 e pelitorina foram mais efetivas na inibição do crescimento *in vitro* de amastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis*. Ambas as substâncias apresentaram baixa citotoxicidade frente as duas células de linhagem investigadas (L929 e THP-1).

O presente estudo é o primeiro a descrever o potencial de permeação cutânea da substância S4. Assim como, é o primeiro a avaliar o perfil de permeação da substância pelitorina incorporada a uma formulação transdérmica.

A partir dos ensaios de permeação cutânea utilizando célula de difusão tipo Franz, com pele de orelha suína, ficou evidenciado que a formulação desenvolvida (eudragit RS 100/PG) foi capaz de realizar a entrega através da pele de ambas as substâncias. Sendo a substância S4 a que apresentou o melhor coeficiente de permeabilidade.

Além disso, uma porcentagem ambas as substâncias (S4 e Pelitorina) permaneceu retida na pele. Tal característica é importante para que substância potencialmente ativa consiga agir frente as amastigotas de contra *Leishmania* spp. que ficam internalizadas, principalmente em macrófagos, na derme.

Nos ensaios *in vivo*, embora não tenham sido observadas diferenças significativas no tamanho das lesões e peso dos animais entre os grupos tratados, a carga parasitária foi significativamente reduzida em camundongos tratados com a formulação de filme contendo ou não pelitorina ou S4. Além disso, os tratamentos não afetaram negativamente os parâmetros bioquímicos avaliados.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, Paulo. Histologia. Grupo GEN, 2016. E-book. ISBN 9788527730105. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527730105/>. Acesso em: 20 abril 2022.
- AHIRRAO, P.; TAMBAT, R.; CHANDAL, N.; MAHEY, N.; KAMBOJ, A.; JAIN, U. K.; NANDANWAR, H. S. MsrA efflux pump inhibitory activity of *Piper cubeba* L.f. and its phytoconstituents against *Staphylococcus aureus* RN4220. **Chem. Biod**, 2020.
- ALEXANDRINO-JUNIOR, F.; SILVA, K. G.; FREIRE, M. C. L. C.; LIONE, V. O. F.; CARDOSO, E. A.; MARCELINO, H. R.; GÊNERO, J.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Um curativo funcional como tratamento potencial para leishmaniose tegumentar. **Farmacêutica.**, v. 11, n. 5, p. 200, 2019.
- ALMEIDA, C. C. F. **Previsão da libertação de fármacos em pensos adesivos**. 2014. 126 p. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biológicos). Isec Engenharia, Departamento de Engenharia Química e Biológica. p. 126, Coimbra, 2014.
- ALTHAUS, J. B.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, T. J., Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkamide constituents. **Molecules**. v. 19, n. 5, p. 6428-38, 2014.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; den Boer, M. Leishmaniose em todo o mundo e estimativas globais de sua incidência. **PLoS ONE**. 7 (5): e35671, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol**. v. 35, p.699-705, 2010.
- ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. 2017**
- BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JÚNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S. O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Rev. Bras. Cienc. Farmac.**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.
- BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 19, n. 3, p. 173-191, 1986.
- BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. **Current Medic. Chem.**, v. 19, p. 4671-4677, 2012.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328 – 337, 2004.

BAVISKAR, D. T.; PARIK, V. B.; JAIN, D. J. Development of Matrix-Type Transdermal Delivery of Lornoxicam: In Vitro Evaluation and Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Studies in Albino Rats. **PDA J. Pharmac. Scienc. Technol**, v. 67, n. 1, p. 9–22, 2013.

BENSON, H. A. E. Skin Structure, Function, and Permeation. In: BENSON, H.A.E. e WATKINSON, A.C. Transdermal and Topical Drug Delivery - Principles and Practice. Wiley, 2012, 1, pp. 3-22. 78

BHOWMIK, D.; PUSUPOLETI, K. R. ; DURAVEL, S. ; KUMAR, K. P. S. Recent Approaches in Transdermal Drug Delivery System. **The. Pharm. Innovat. J.**, v. 2, n. 3, p. 99 – 108, 2013.

BOUWSTRAA, J. A.; HONEYWELL-NGUYENA, P. L.; GOORISA, G. S.; PONECB, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research.**, v. 42, p. 1–36, 2003.

BRAS, A. R. R. **Sistemas de administração transdérmica de fármacos: desafios e oportunidades**. Monografia. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. p. 36, Coimbra, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE / SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Portaria nº 56 de 30 de outubro de 2018. Torna pública a decisão de incorporar a Miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar em primeira linha de tratamento no âmbito do Sistema único de Saúde – SUS**. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543). Acessado em: 23 de julho de 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar. **Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018.** 2020a. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LT-Casos.pdf>. Acesso em: 26 de abril, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/1/leishmaniose-tegumentar-lt>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Relatório Técnico. Brasília, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Informativa nº 13/2020 – CGZV/DEIDT/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde, 2020b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/17/nota-informativamiltefosina.pdf>. Acesso realizado em 23 de julho de 2021.

CALDERON, L. A.; SILVA-JARDIM, I.; ZULIANI, J. P.; SILVA, A. A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L. H. P.; STÁBELI, R. G. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. **J. Braz. Chem.** v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.

CALDERON, Leonardo De Azevedo; Teles, Carolina Bioni Garcia; DOS SANTOS, Ana Paula de Azevedo; FIALHO, Saara Neri. Use of hexamethoxylobelanine, pharmaceutical composition, use of the pharmaceutical composition and treatment method. Depositante: Fundação Oswaldo Cruz. BR102020195085 e WO2022061429A1. Depósito: 25/09/2021.

CARIDHA, D.; VESELY, B.; VAN BOCXLAER, K.; ARANA, B.; MOWBRAY, C. E.; RAFATI, S.; ULIANA, S.; REGUERA, R.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; SCIOTTI, R.; BUFFET, P.; CROFT, S. L. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **Inter. J. Parasit. Drugs. Drug Resist.**, v.11, p. 106-117, 2019.

CARNEIRO, G.; AGUIAR, M. G.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Expert. Opin. Drug. Deliv.**, p. 1-15, 2012. 79

CAVALCANTI, A. L. M.; REIS, M. Y. F. A.; SILVA, G. C. L.; RAMALHO, I. M. M.; GUIMARAES, G. P.; SILVA, J. A.; SARAIVA, K. L. A.; DAMASCENO, B. P. G. L. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: In vitro release and in vivo evaluation. **Inter. J. Pharmac.**, v. 506, n.1-2, p. 351-360, 2016.

CDC – **Centers for Disease Control and Prevention; Biology**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Acessado em 07 de maio de 2022.

COELHO, D. S. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo chalconas com liberação controlada para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea**. 2020. 183 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

COELHO, D.; VELEIRINHO, B.; MAZZARINO, L.; ALBERTI, T.; BUZANELLO, E.; OLIVEIRA, R.E.; YUNES, R. A.; MORAES, M.; STEINDEL, M.; MARASCHIN, M.; Polyvinyl alcohol-based electrospun matrix as a delivery system for nanoemulsion containing chalcone against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, **Colloids and Surfaces B: Bioint**, v. 198, 2021.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; GRAFOVA, I.; NAIFF, M. F.; AVELLA, M.; GENTILE, G.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R.; Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 1, p. 39-46, 2017.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R (Org.). *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1, 2014.

COSTA, J.M. L. SALDANHA, A.C.R.S.; NASCIMENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L.M.; BARRAL, A.M.P. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. **Gaz Méd Bahia.**, v.79 (Supl.3): p. 70-83, 2009.

CROOKS, A. P.; ZHENG, G. ; VARTAK, P. A. ; CULVER, P. J. ; ZHENG, F. ; HORTON, B. D. ; DWOSKIN, P. L. Design, Synthesis and Interaction at the Vesicular Monoamine Transporter-2 of Lobeline Analogs: Potential Pharmacotherapies for the Treatment of Psychostimulant Abuse. **Current Topics. Medic. Chem.**, v. 11, n. 9, p.1103–1127, 2011.

CUNHA, R. C.; MOTERLE, D.; CUNHA, A. C.; MARTINELLI, F.; BAGGIO, M.; KANIS L. A.; Implantable polymeric device for diclofenac sodium delivery. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 49, n. 3, p. 232-239, 2016.

DALCIN, A. J. F.; OURIQUE, A. F.; GOMES, P.; Cationic nanocapsules containing Eudragit RS100® and its potential for application in nanomedicine. **Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas.**, v. 18, n. 3, p. 545-566, 2017.

DE AZEREDO COUTINHO, R.B.; MENDONÇA, S.C.F. **Formas clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas.** Leishmanioses do Continente Americano. Fátima Conceição-Silva e Carlos Alberto Alves (Org.). Rio de Janeiro: Fiocruz. 512p., 2014.

DHIMAN, S.; SINGH, T, G.; REHNI, A. K. Transdermal patches: a recent approach to new drug delivery system. **Inter. J. Pharm. Pharmaceut. Scien.**, v. 3, n. 5, p. 26-34, 2011. 80

DIAS, A. R. P. **Sistemas transdérmicos.** 2013. 49 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. p. 49, Lisboa, 2013.

DNDi, América Latina. Rumo a uma geração de tratamento para as leishmanioses. Disponível em: [https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi\\_Leishmaniasis\\_2019\\_POR.pdf](https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf). Acesso realizado em: 27 de julho de 2022, às 16h37min.

DNDi. InfoLeish. **Atualização Clínica e Terapêutica da Leishmaniose Mucosa.** Boletim informativo da redeLeish nº 2, maio de 2017. Disponível em: [https://dndi.org/wp-content/uploads/2016/09/DNDi\\_InfoLeish\\_Newsletter\\_02\\_PORTUGUESE\\_1705.pdf](https://dndi.org/wp-content/uploads/2016/09/DNDi_InfoLeish_Newsletter_02_PORTUGUESE_1705.pdf)

DWOSKIN, L. P.; CROOKS, P. A. A novel mechanism of action and potential use for lobeline as a treatment for psychostimulant abuse, **Bioch. Pharm.**, v. 63, n. 2, p.89-98, 2002.

EBRAHIMISADR, P.; GHAFARIFAR, F.; HASSAN, Z. M.; SIROUSAZAR, M.; MOHAMMADNEJAD, F. Effect of Polyvinyl Alcohol (PVA) Containing Artemether in Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania major* in BALB/c Mice. **Jundishapur. J. Microbiol.**, v. 7, n. 5, e9696, 2014.

EDDAIKRA, N.; AIT-LOUDHIA, K.; KHERRACHI, I.; OURY, B.; MOULTI-MATI, F.; BENIKHLEF, R.; HARRAT, Z.; SERENO D. Antimony susceptibility of *Leishmania* isolates collected over a 30-year period in Algeria. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 21, n. 12(3), e0006310, 2018.

EE, G.C.; LIM, C.M.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; BONG, C.F. Pelitorina, a Potential Anti-Cancer Lead Compound against HL60 and MCT-7 Cell Lines and Microbial Transformation of Piperine from *Piper nigrum*. **Molecules**, v. 15, p. 2398- 2404, 2010.

FLAIH, M. H. Geographical Distribution of Cutaneous Leishmaniasis and Pathogenesis. In (Ed.), *Leishmaniasis - General Aspects of a Stigmatized Disease.* 2022. **IntechOpen**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101841>

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E. *Epidemiologia clínica.* Porto Alegre: Artes Médicas, 1989.

GABRIEL Á, VALÉRIO-BOLAS A, PALMA-MARQUES J, MOURATA-GONÇALVES P, RUAS P, DIAS-GUERREIRO T, SANTOS-GOMES G. Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **J Immunol Res.**, n.1, 2603730, 2019.

GALATI, E.A.B. Morfologia e Taxonomia: Classificação de Phlebotominae. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebot. Bras.** v. 1, p. 23–52, 2003.

GERALDO, M. M.; COSTA, C. R.; BARBOSA, F. M. C.; VIVANCO, B. C.; GONZAGA, W. K. M.; NOVAES.; BRITO, R. R.; POPI, A. F.; LOPES, J. D.; XANDER, P. *In vivo* and *in vitro* phagocytosis of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes by B-1 cells. **Parasite Immunol.**, v. 38, p. 365-376, 2016.

GOIS, P.S.G. **Cepas TgChBrUD2 e ME49 de Toxoplasma gondii induzem polarização de macrófagos humanos para o perfil M1.** 2016. 77 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Universidade Federal de Uberlândia, p. 77, Uberlândia, 2016. 81

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOODMAN, C. D.; AUSTARHEIM, I.; MOLLARD, V.; MIKOLO, B.; MALTERUD, K. E.; MCFADDEN, G. I.; WANGENSTEEN, H. Natural products from *Zanthoxylum heitzii* with potent activity against the malaria parasite. **Malar J.**, v. 20, n. 15, p. 481, 2016. *Erratum in: Malar J.* v. 17, n. 15(1), p. 560, 2016.

GOODMAN, C.D; Hoang, A.T.; Diallo, D.; Malterud, K.E.; McFadden1, G.I.; Wangensteen, H. Anti-plasmodial Effects of *Zanthoxylum zanthoxyloides*. **Planta Med.**, v. 85, p.1073–1079, 2019.

GUIMARÃES, M. **Avaliação da liberação e permeação em membrana sintética do cetoconazol em cremes O/A.** 2001. 170 p. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

GUIMARÃES, S. B. A.; SANT'ANNA, C. F.; ABREU, L. R.; ALVES, F. V. Estudo fitoquímico do extrato etanólico dos frutos de *Piper tuberculatum* JACQ. (PIPERACEAE). trabalho apresentado no 57º Congresso Brasileiro de Química. Gramado – RS. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2017/trabalhos/7/12599-25295.html>. Acesso realizado em: 01 de agosto de 2022.

HAMIDIAN, H.; TAVAKOLI, T. Preparation of a new Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/starch- g -polyester nanocomposite hydrogel and a study on swelling and drug delivery properties. **Polym. Carboidr.**, v. 144, p. 140–148, 2016.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; HADGRAFT, J.; GUY, H. R. Pig Ear Skin *ex Vivo* as a Model for *in Vivo* Dermatopharmacokinetic Studies in Man. **Pharmac. Resear.**, v. 23, n. 8, p.1850- 1856, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 2009. Disponível em: <https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>. Acesso realizado em: 30 de julho de 2022, às 01h33.

IRENO, L. C.; GARCIA, N. P.; MOREIRA, M. R.; CASTRO, P. M.; ZOCCAL, K. F.; TEFÉ-SILVAL, C. Evaluation of the *Lobelia inflata* Extract in the Histopathological Profile of Melanoma *in* Experimental Model. **Biomed. J. Scien. Tech. Research.**, v. 26, n. 3, p. 19927-19934, 2020.

ITO, M.M.; CATANHÊDE, L.M.; KATSURAGAWA, T.H.; SILVA JUNIOR, C.F.; CAMARGO, L.M.A.; MATTOS, R.G.; VILALLOBOS-SALCEDO, J.M. Correlation between presence of Leishmania RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. **B. J. Otorhinol.**, v. 81, n. 5, p. 533-540, 2015.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. **Skin Resear. Technol.**, V. 13, p. 19–24, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 354 – 364.

KADAM, S. A.; RATNAPARKHI, M. P.; CHAUDHARY, S. P. Entrega transdérmica de medicamentos: uma visão geral. **Inter. J. Resear. Develop. Pharm. Lif. Scien.**, v. 3, n. 4, p. 1042-1053, 2014. 82

KANIS, L. A. **Caracterização de filmes de EMA/PCL-T e aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina. p. 122, Florianópolis, 2005.

KARRAM, S.; LOYA, A.; HAMAM, H.; HABIB, R. H.; KHALIFEH, I. (2012). Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. **J. Cut. Pathology.** , v. 39, n. 4, p. 406–412, 2012.

KATSUNO, K.; BURROWS, J.N.; DUNCAN, K.; HUIJSDUIJNEN, R.H.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C.E.; SCHMATZ, D.; WARNER, P.; SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

KELEB, E. *et al.* Transdermal Drug Delivery System- Design and Evaluation. **Internat. J. Advanc. Pharmaceut. Scienc.**, p. 201-210, 2010.

KHAN, B. A.; ASMAT, Y.; KHAN, T, H.; QAYUM, M.; ALSHAHRANI, S. M.; MENAA, F. KHAN, M. K. Novel insight into potential leishmanicidal activities of transdermal patches of *Nigella sativa*: formulation development, physical characterizations, and *in vitro/in vivo* assays. **Assay and drug develop. technol.**, v. 19, n. 6, p.339-349, 2021.

KOTLA, N. G. *et al.* Biomimetic lipid-based nanosystems for enhanced dermal delivery of drugs and bioactive agents. **ACS Biomat. Scien. Engine.**, v. 3, n. 7, p. 1262-1272, 2017.

KU, S. K.; LEE, I. C.; KIM, J. A.; BAE, J. S. Antithrombotic activities of Pelitorina *in vitro* and *in vivo*. **Fitoterapia.**, v. 91, p. 1-8, 2013.

KULINSKI, Z.; PIORKOWSKA, E.; GADZINOWSKA, K.; STASIAK, M. Plasticization of poly(L-lactide) with poly (propylene glycol). **Biomacromolecules.**, v. 7, n.7, p. 2128-35, 2006.  
 LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHANZER, S.; KNORR, F.; MEINKE, M.; STERRY, W.; PATZELT, A. Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.77, p. 465–468, 2011.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **Inter. J. Pharm.**, v. 447, n. 1-2, p. 12-21, 2013.  
 LANE, M.E. *et al.* **Passive Skin Permeation Enhancement**. [autor do livro] BENSON, H.A.E. e WATKINSON, A.C. Transdermal and Topical Drug Delivery. Wiley, 2012, 2, pp. 23-42. 17.  
 LANZA, J. S.; VUCEN, S.; FLYNN, O. ; DONADEI, A. ; COJEAN, S. ; LOISEAU, P. M. ; FERNANDES, A. P. S. M. ; FREZARD, F. ; MOORE, A. C. A. TLR9-adjuvanted vaccine formulated into dissolvable microneedle patches or cationic liposomes protects against leishmaniasis after skin or subcutaneous immunization. **Int J Pharm.** v. 30, p. 586 :119390, 2020.

LAYEGH, P. *et al.* Efficacy of Cryotherapy versus Intralesional Meglumine Antimoniate (Glucantime) for treatment of Cutaneous Leishmaniasis in children. **Amer. J. Trop. Med.**, v. 80, n.2, p.172-175, 2009.

LEE, W.; KU, S. K.; MIN, B. W, *et al.* Vascular barrier protective effects of Pelitorina in LPS-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. **Fitoterapia.**, v. 92, p.177-187, 2014. 83

LIEDER, B.; ZAUNSCHIRM, M.; HOLIK, A. K, *et al.* The Alkamide trans-Pelitorina Targets PPAR $\gamma$  via TRPV1 and TRPA1 to Reduce Lipid Accumulation in Developing 3T3-L1 Adipocytes. **Front Pharmacol.**, v. 8, p. 316. 2017.

LÓPEZ-JARAMILLO, P. ; RINCON, M. Y. ; GARCIA, R. G. ; SILVA, S. Y. ; SMITH, E. ; KAMPEERAPAPPUN, P. ; GARCIA, C. ; SMITH, D. J. ; LOPEZ, M. ; VELEZ, I. D. Controlled, Randomized-Blinded Clinical Trial to Assess the Efficacy of a Nitric Oxide Releasing Patch in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania (V.) panamensis*. **The Amer. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 1, p. 97-101, 2010.

MALI, A. D.; BATHE, R.; PATIL, M.; An updated review on transdermal drug delivery systems. **Inter. J. Adv. Scien. Research.**, v. 1, n. 6, 2015.

MARTIN, C. A.; NUZZO, P. A.; RANSEEN, J. D.; KLEVEN, M. S.; GUENTHNER, G.; WILLIAMS, Y.; WALSH, S. L.; DWOSKIN, L. P. Lobeline Effects on Cognitive Performance in Adult ADHD. **J Atten Disord.**, v. 22, n.14, p. 1361-1366, 2018.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Rev. Bras. Cienc. Farmac.** v. 38, n. 1 p. 33-54, 2002.

MARZULLI, F. N.; BROWN, D. W. C.; MAIBACI-I, H. I. Techniques for Studying Skin Penetration. **Toxicol. Applied. Pharmacol. Supplement.**, n. 3, p. 76-83, 1969.

MASIIWA, W. L.; GADAGA, L. L. Intestinal Permeability of Artesunate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Using the Everted Gut Method. **J Drug Deliv.**, v. 30, 3021738, 2018.

MBAH, C. J.; UZOR, P. F.; OMEJE, E. O. Perspectives on Transdermal Drug Delivery. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 3, n. 3, p. 680-700, 2011.

MEHTA, R. Topical and Transdermal Drug Delivery: What a Pharmacist Needs to Know. 2004. Disponível em: <http://inetce.com/articles/pdf/221-146-04-054-H01.pdf>. Acesso realizado em 01 de agosto de 2022, às 11h45min.

MEIRA, A. S. **Estudos de permeação/retenção cutânea in vitro empregando pele suína para comparação de desempenho de formulações semi-sólidas dermatológicas**. 2010. 45 p. Trabalho de Conclusão da Disciplina (Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2010.

MENDES, E.V. As Redes de Atenção à Saúde. **Ciênc. Saúd. Colet.**, v. 15, n. 5, p. 2297- 2305, 2010.

MENEZES, J.; SAMPAIO GUEDES, C.; PETERSEN, A.; FRAGA, D.; VERAS, P. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **Bio. Med. Res. Inter.** p.1-11. 10.1155, 2015.

MOUSSAVI, N.; MALTERUD, K. E.; MIKOLO, B.; DAWES, D.; CHANDRE, F.; CORBEL, V.; MASSAMBA, D.; OVERGAARD, H. J.; WANGENSTEEN, H. Identification of chemical constituents of *Zanthoxylum heitzii* stem bark and their insecticidal activity against the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Paras. Vect.**, v. 1, n. 8, p. 503, 2015.

MUTALIK, S.; UDUPA, N. Glibenclamide Transdermal Patches: Physicochemical, Pharmacodynamic, and Pharmacokinetic Evaluations. **J. Pharmac. Scien.**, v. 93, n. 6, p. 1577 – 1594, 2004.

NAIK, A. *et al.* Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Elsevier Science Ltd.**, v. 3, p. 318-324., 2002.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M., Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry.**, v. 55, n.6, p.621-626, 2000.

NAYAK, A. K. ; MOHANTY, B. ; SEN, K. K. Comparative evaluation of *in vitro* diclofenac sodium permeability across excised mouse skin from different common pharmaceutical vehicles. **Inter. J. Pharm. Tech Research.**, v. 2, n. 1, p. 920-930, 2010.

NEUPANE, R.; BODDU, S. H. S.; RENUKUNTLA, J.; BABU, R. J.; TIWARI, A. K. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. **Pharmaceut.**, v. 13, n. 12(2), p.152, 2020.

NIELSEN, B. J.; SORENSEN, J. A.; NIELSEN, F. The Usual Suspects—Influence of Physicochemical Properties on Lag Time, Skin Deposition, and Percutaneous Penetration of Nine Model Compounds. **J. Toxicol. Environment. Health, Part A.**, v. 72, n. 5, p. 315–323, 2009.

OFOKANSI, K. C.; KENECHUKWU, F. C.; OGWU, N.N. Design de novos filmes transdérmicos de nitrato de miconazol baseados em Eudragit RS100 e híbridos HPMC:

preparação, caracterização física, estudos in vitro e *ex vivo*. **Drug Delivery.**, v. 22, n. 8, p. 1078-1085, 2015.

OLIVEIRA, F. A. S.; PASSARINI, G. M.; MEDEIROS, D. S. S.; SANTOS, A. P. A.; FIALHO, S. N.; GOUVEIA, A. J.; LATORRE, M.; FREITAG, E. M.; MEDEIROS, P. S. M.; TELES, C. B. G.; FACUNDO, V. A. Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from *Piper tuberculatum* Jacq fruits., **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 51, n. 3, p. 382-386, 2018.

OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Act. Trop.**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Controle das leishmanioses. Relatório de uma reunião do Comitê de Especialistas da OMS sobre Controle de Leishmanioses.** Geneva, 22–26 March, 2010. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf;jsessionid=168CDF9171706BFE83A6E72268436F2E?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=168CDF9171706BFE83A6E72268436F2E?sequence=1)>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Tópicos de saúde: Leishmanioses** Disponível em: <[https://www.OMS.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_1](https://www.OMS.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1)>. Acesso em: junho de 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas** [Internet]. Núm. 10, dezembro del 2021. Washington, D.C.: OP; 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>>. 85

OYEDEMI, B. O. M.; OYEDEMI, S. O. ; SWAIN, S. S. ; PRIETO, J. M. ; STAPLETON, P. Bactericidal and antibiotic-modulation activities of methanol crude extracts of *Ligustrum lucidum* and *Lobelia inflata* against MRSA phenotypes: Molecular docking studies of some isolated compounds from both plants against DNA gyrase A. **South African J. Botany.**, v. 130, p. 54–63., 2020.

PACE, D. Leishmaniasis. **J. Infect.**, v. 69, n. 1, p. 10-18, 2014.

PAN, A. A.; DUBOISE, S. M.; EPERON, S.; RIVAS, L.; HODGKINSON, V.; TRAUB-CSEKO, Y.; MCMAHON-PRATT, D. Developmental Life Cycle of *Leishmania* Cultivation and Characterization of Cultured Extracellular Amastigotes. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 213-223, 1993.

PARK I. K.; LEE, S. G.; SHIN, S. C.; PARK, J. D.; AHN, Y. J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. **J Agric Food Chem.**, v. 27, n.50(7), p. 1866-70, 2002.

PARK I. K. Insecticidal activity of isobutylamides derived from *Piper nigrum* against adult of two mosquito species, *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. **Nat. Prod. Res.**, v. 26, n 22, p. 2129-31, 2012.

PATRA, CH. N.; PRIYA, R.; SWAIN, S.; JENA, G. K.; PANIGRAHI, K. CH.; GHOSE, D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Fut. J. Pharm. Scien.**, v. 3, n. 1, p. 33-45, 2017.

PEPPAS, N. A.; HILT, J. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. **Adv. Mater.**, v. 18, n. 11, p. 1345-1360, 2006.

PERALTA, M. F.; GUZMAN, M. L.; BRACAMONTE, M. E.; MARCO, J. D.; OLIVERA, M. E.; CARRER, D. C.; BARROSO, P. A. Efficacy of topical risedronate and risedronate - Eudragit E complex in a model of cutaneous leishmaniasis induced by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, **Heliyon.**, v. 7, n. 5, e07136, 2021.

PERESTRELO, A.F.; GIORGIO, S.; CALARGA, A.P.; BROCCHI, M.; KRYWACZ, K.C.S.; LEVY, C.E. Padronização de cultivo e manutenção de *Leishmania braziliensis*. **Rev Trab Inic Cient.UNICAMP.**, v. 26, 2018.

PERUMALSAMY, H.; KIM, J. R.; KIM, S. I.; WOOK, H. K.; AHN, Y. J. Toxicidade aumentada de misturas binárias de constituintes larvicidas de *Asarum heterotropoides* Root a *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae)., **J. Med. Entom.**, v. 49, n.1, p. 107–111, 2012.

PERUMALSAMY, H.; KIM, J. R.; OH, S.M.; JUNG, J.W.; AHN, Y.J.; KWON, H. W. Novel histopathological and molecular effects of natural compound Pelitorina on larval midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*., **PLoS One**. v. 8, n. 11, e80226, 2013.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Rev. Bras. de Ciên. Farm. Braz. J. Pharm. Sci.**, vol. 43, n. 4, 2007.

PIMENTA, P.F.P.; DE FREITAS, V.C.; SECUNDINO, N.F.C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. **Tóp A Ento Mol. INCT**, 2012.

PONTE-SUCRE. A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 14, n. 11(12), e0006052, 2017.

QUEIRÓS, P. J. P.; VIDINHA, T. S. S.; FILHO, A. J. A. Autocuidado: o contributo teórico de Orem para a disciplina e profissão de Enfermagem. **Revi. Enfer. Refer.**, v. 4, n. 3, p. 154-167, 2014.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da arte. **Quim. Nov.**, v. 26, n. 4, p. 550-55, 2003.

REITHINGER, R. *et al.* Efficacy of thermoterapy to treat Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afeganistan: A randomized, controlled trial. **Clinic. Infect. Disease.**, n. 40, p.1148-1155, 2005.

RISS, T. L. ; MORAVEC, R.A. ; NILES, A. L. ; DUELLMAN, S. ; BENINK, H.A. ; WORZELLA, J. ; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. 2016.In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, *et al.*, editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

RIVITTI, E. A. Anatomia e Fisiologia. In: RIVITTI, E. A. **Manual de Dermatologia Clínica de Sampaio e Rivitti**. 1 ed. São Paulo, Artes Médicas, 2014. p. 1-15.

ROBLEDO, S. M.; CARRILLO, L. M.; DAZA, A.; RESTREPO, A. M.; MUÑOZ, D. L.; TOBÓN, J.; MURILLO, J. D.; LÓPEZ, A.; RÍOS, C.; MESA, C. V.; UPEGUI, Y. A.; VALENCIA-TOBÓN, A.; MONDRAGÓN-SHEM, K.; RODRÍGUEZ, B.; VÉLEZ, I. D. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. **J. vis. experim.**, v. 62, 3533.

RONI, A. M ; RAHMAN, S. Antidepressant-like effects of lobeline in mice: Behavioral, neurochemical, and neuroendocrine evidence, *Progress. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych.*, v. 41, p.44-51, 2013.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QINN, M. E. **Manual de Excipientes Farmacêuticos** (sexta ed.), Pharmaceutical Press, EUA (2009).

RUELA A. L. M.; PERISSINATO, A. G.; LINO, M. E. S.; MUDRIK, P. S.; PEREIRA, G. R. **Brazil. J. Pharmaceut. Scien.**, v. 52, n. 3, p. 527 - 544, 2016.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Researc. Soc. Develop.**; v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.

SANTOS, A. P. A. **Avaliação da atividade leishmanicida in vitro e in vivo de compostos sintéticos derivados do metoxibenzeno**. 2019. 131 f. Tese (Doutorado em Biologia Experimental), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2019.

SANTOS, M. E. S. M; NOGUEIRA, E. F. C.; LOPES, P. S.; TORRES, B. C. A. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-maxilo-fac.**, v. 13, n. 2, p. 15 – 21, 2013.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Rev. Bras. Ciên. Farm. Brazilian J. Pharm. Scien.**, v. 43, n. 2, p. 195 – 203, 2007.

SCHENK L.; RAUMA M.; FRANSSON, M. N.; JOHANSON, G. Percutaneous absorption of thirty-eight organic solvents *in vitro* using pig skin. **PLOS ONE.**, v. 13, n. 10, e0205458, 2018.  
SCHLEIN, Y. Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today.**, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993.

SERAFIM, M. C.; GOBBI, C. M. S.; MILANESE, F. E; BARBOSA, L. H.; MILANESE, M. E. B. “A utilização da forma farmacêutica transdérmica como possibilidade terapêutica na medicina antroposófica”. **Art. Med. Ampl.**, v. 33, n. 4, p. 153–159, 2013.

SHAHZAD, Y. ; LOUW, R. ; GERBER, M. ; PLESSIS, J. D. Breaching the skin barrier through temperature modulations. **J. Control. Release.**, v. 202, p. 1–13, 2015.

SHAKER, D. S. *et al.* Nanoemulsion: A Review on Mechanisms for the Transdermal Delivery of Hydrophobic and Hydrophilic Drugs. *Scientia Pharmaceutica*, v. 87, n. 3, p. 17, 2019.

SHARMA, A.; GARG, R.; RAJU, J.; GOYAL, S. Transdermal drug delivery system: a review. **Rev. Mund. Pesq. Farm.**, v. 7, n. 7, p.260-288, 2018.

SHARMA, N. *et al.* Blooming Pharma Industry with Transdermal Drug Delivery System. **Ind. Glob. J. Pharmaceut. Scienc.**, v. 3, p. 262- 278, 2012.

SHARMA, N.; AGARWAL, G.; RANA, A. C.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. A Review: Transdermal Drug Delivery System: A Tool For Novel Drug Delivery System. **Inter. J. Drug Develop. Resear.**, v. 3, n. 3, p. 70 – 84, 2010.

SILVA, B. V. **Avaliação da potencialidade do uso de Hidrogéis poliméricos na terapêutica de Leishmaniose cutânea.** 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de São Carlos. p. 90, São Paulo, 2015.

SILVA, G. T. **Blendas poliméricas de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose com aplicação em sistemas de liberação controlada de fármaco.** 2016. 79 p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SILVA, J. A *et al.* Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev. de Ciênc. Farmac. Basic. Aplic.**, p. 125-131, 2010.

SILVA, M. A. **Atividade *in vitro* e *in silico* de uma amida natural e seus respectivos análogos sintéticos contra *Leishmania (V.) braziliensis*.** 2020. 126 p. Tese (Doutorado em Biologia Experimental), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2020.

SILVA, M. A.; FOKOUE, H. H.; FIALHO, S. N.; DOS SANTOS, A. P. A.; ROSSI, NORTON R. D. L. P.; GOUVEIA, A. J.; FERREIRA, A. S.; PASSARINI, G.M.; GARAY, A.F. G.; ALFONSO, J.J. SOARES, A.M.; ZANCHI, F.B.; KATO, M.J. TELES, C.B. G.; KUEHN, C.C. Antileishmanial activity evaluation of a natural amide and its synthetic analogs against *Leishmania (V.) braziliensis*: an integrated approach in vitro and in silico. **Parasitology Research.**, v. 120, p. 2199–2218, 2021. 88

SILVA-JARDIM, I. **Papel dos proteassomas na interação e desenvolvimento de *L. chagasi* em macrófagos murinos.** 2001. 101 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, p. 101, Ribeirão Preto, São Paulo. 2001.

SILVEIRA, L. M. C.; RIBEIRO, V. M. B. Compliance with treatment groups: a teaching and learning arena for healthcare professionals and patients, **Interface - Comunic., Saúde, Educ.**, v.9, n.16, p.91-104, 2005.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Químico. Nov.** [online]., v. 25, n. 5 pp. 801-807, 2002.

SINGH, I. e SRI, P. Percutaneous penetration enhancement in transdermal drug delivery. **Asian. J. Pharmac.**, v. 4, p. 92-101, 2010.

SOARES, C. S. M. **Sistemas de libertação de fármacos ativados por estímulos físicos e químicos administrados por via transdérmica**. 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. p. 69, Porto, 2013.

SOMEYA, T.; AMAGAI, M. Toward a new generation of smart skins. **Nat. Biotec.**, v. 37, n. 4, p. 382–388, 2019.

SONJE, A.; CHANDRA, A. Comprehensive review on Eudragit polymers. **Inter. Research. J. Pharmac.**, v. 4, n. 5, p. 71 – 74, 2013.

SRINIVASA REDDY, P.; JAMIL, K.; Madhusudhan, P.; Anjani, G.; Das, B., Antibacterial Activity of Isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. **Pharm Biol.**, v. 39, n. 3, p. 236-238, 2001.

TANWAR, H.; SACHDEVA, R. Transdermal drug delivery system: a review. **Inter. J. Pharmac. Scien. Resear.**, v. 7, n. 6, p. 2274-2290, 2016.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J.C.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P.F.; DE SOUZA, W. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. **PLoS pathogens.**, v. 9, n. 10, e1003594, 2013.

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K.; SINGH, S. P.; SINGH, R. K. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini. Reviews. Medic. Chem.**, v. 18, n. 1, 2018.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. **Skin. Pharma. Physiol.**, v. 19, p. 106–121, 2006.

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitol.**, v. 145, n.4, p. 464-480 2018.

VAN BOCXLAER, K. ; YARDLEY, V. ; MURDAN, S. ; CROFT, S. L. Drug permeation and barrier damage in Leishmania-infected mouse skin. **J. Antimicrob. Chemotherapy.**, v. 71, n. 6, p. 1578–1585, 2016.

VAN BOCXLAER, K.; MCARTHUR, K. N.; HARRIS, A.; ALAVIJEH, M.; BRAILLARD, S.; MOWBRAY, C. E.; CROFT, S. L. Film-Forming Systems for the Delivery of DNDI-0690 to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, 516, 2021.

VEGA, J. C. *et al.* Efficacy to thermotherapy to treat Cutaneous Leishmaniasis in Colômbia: a comparative observational study in an operational setting. **Transact. Royal. Soci. Tropic. Medic. Hygien.**, v.103, p.703-706, 2009.

VERYSER, L.; BRACKE, N.; WYNENDAELE, E.; JOSHI, T. ; TATKE, P. ; TAEVERNIER, L. ; DE SPIEGELEER, B. Quantitative In Vitro and In Vivo Evaluation of Intestinal and Blood-Brain Barrier Transport Kinetics of the Plant N-Alkylamide Pellitorine. **Biomed Res Int.**, v. 2016, Article ID 5497402, p. 11, 2016.

VERYSER, L.; TAEVERNIER, L.; ROCHE, N.; PEREMANS, K.; BURVENICH, C.; DE SPIEGELEER, B. Comportamento transdérmico quantitativo da Pelitorina do extrato de *Anacyclus pyrethrum*. **Phytomedicine.**, v. 21, n. 14, p. 1801-1807, 2014.

VIEIRA, S. P. P. **Promoção da Absorção Cutânea de Fármacos: Estado da Arte**. 2015. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. p. 90, Poro, 2015.

WILHELM, C. J.; JOHNSON, R A.; ESHLEMAN, A. J.; JANOWSKY, A. Lobeline effects on tonic and methamphetamine-induced dopamine release. **Bioch. Pharm.**, v. 75, n. 6, p. 1411-5, 2008.

YADAV, V. Transdermal drug delivery system: review. **Inter. J. Pharm. Scien. Research.**, v. 3, n. 2, p.376-382, 2012.

ZACARIAS, D. A.; ROLÃO, N.; PINHO, F. A.; SENE, I.; SILVA, J. C.; PEREIRA, T. C.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Causas e consequências da maior carga de *Leishmania infantum* em pacientes com calazar: um estudo com 625 pacientes. **Trop. Med. Inter. Health.**, v. 22, n. 6, p. 679–687, 2017.

ZARE, M. R. ; KHORRAM, M. ; BARZEGAR, S. ; SARKARI, B. ; ASGARI, Q. ; AHADIAN, S. ; ZOMORODIAN, K. Dissolvable carboxymethyl cellulose/polyvinylpyrrolidone microneedle arrays for transdermal delivery of Amphotericin B to treat cutaneous leishmaniasis, **Inter. J. Biol. Macromol.**, v. 182, p.1310-1321, 2021.

# Revista Eletrônica Acervo Saúde

Electronic Journal Collection Health ISSN 2178-2091

## Técnicas inovadoras de entrega transdérmica de fármacos na leishmaniose cutânea

Innovative Transdermal Drug Delivery Techniques in Cutaneous Leishmaniasis

Técnicas Inovadoras de Entrega Transdérmica de Fármacos en la Leishmaniasis Cutánea

Saara Neri Fialho<sup>1,2,3</sup>, Arlindo Gonzaga Branco Jr<sup>1,2,6</sup>, Vitória Morais de Oliveira<sup>5</sup>, Aurileya de Jesus Gouveia<sup>1,2</sup>, Leandro Do Nascimento Martinez<sup>1,2,3</sup>, Amália Santos Ferreira<sup>1,2</sup>, Minelly Azevedo da Silva<sup>5</sup>, Carolina Bioni Garcia Teles<sup>1,2,3</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** Identificar os estudos que analisaram o uso de distintos sistemas de entrega transdérmica, tanto para novas substâncias com potencial leishmanicida, quanto para os fármacos incluídos no arsenal terapêutico para o tratamento da leishmaniose cutânea. **Métodos:** Para tanto, foram utilizadas as seguintes etapas: identificação do tema, formulação da pergunta norteadora, delimitação dos descritores e seleção das bases de dados, estabelecimento de critérios de exclusão e de inclusão dos trabalhos, busca da amostragem na literatura e pré-seleção dos trabalhos (leitura de resumos e títulos); leitura dos estudos selecionados e, por fim, a interpretação dos resultados. **Resultados:** Diante disso, foram encontrados 903 estudos, sendo 305 com os descritores "leishmaniasis" AND "drug delivery systems" e 598 com os descritores "leishmaniasis" AND "transdermal administration". Desses, foram excluídos 820, após a leitura dos títulos e resumos e mais 67 após a leitura integral do trabalho. Após análise e leitura minuciosa foram selecionados 16 trabalhos. **Considerações finais:** Os estudos revisados neste artigo demonstram que os sistemas de entrega transdérmica têm se mostrado promissores e inovadores no tratamento da leishmaniose cutânea.

**Palavras-chave:** Leishmaniose, Sistema de entrega transdérmica, *Leishmania*.

### ABSTRACT

**Objective:** To identify studies that analyzed the use of different transdermal delivery systems, both for new substances with leishmanicidal potential and for drugs included in the therapeutic arsenal for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Methods:** To achieve this goal, the following steps were employed: theme identification, formulation of the guiding question, definition of descriptors and selection of databases, establishment of inclusion and exclusion criteria for the works, literature sampling, and pre-selection of works (reading abstracts and titles); reading of selected studies, and finally, interpretation of results. **Results:** As a result, 903 studies were found, with 305 using the descriptors "leishmaniasis" AND "drug delivery systems" and 598 with the descriptors "leishmaniasis" AND "transdermal administration". Among these, 820 were excluded after reading the titles and abstracts, and an additional 67 after full-text reading. After thorough analysis and reading, 16 studies were selected. **Final considerations:** The studies reviewed in this article

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – BIONORTE, Porto Velho - RO.

<sup>2</sup> Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose (PBML), Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, unidade Rondônia, Porto Velho – RO.

<sup>3</sup> São Lucas Educacional-Afya, Porto Velho – RO.

<sup>4</sup> Instituto Nacional de Epidemiologia da Amazônia Ocidental – EpiAmO. Porto velho – RO.

<sup>5</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – IFRO, Porto Velho - RO.

<sup>6</sup> Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Porto Velho – RO.

SUBMETIDO EM: 8/2023

| ACEITO EM: 8/2023

| PUBLICADO EM: 12/2023