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

AVALIAÇÃO DE UM TRATAMENTO EM FORMULAÇÃO TÓPICA COM O ANTIMALÁRICO CLOROQUINA EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*

ARLINDO GONZAGA BRANCO JUNIOR

Porto Velho – RO
2025

ARLINDO GONZAGA BRANCO JUNIOR

AVALIAÇÃO DE UM TRATAMENTO EM FORMULAÇÃO TÓPICA COM O ANTIMALÁRICO CLOROQUINA EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia Rede BIONORTE da Fundação Oswaldo Cruz – RO, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles
Coorientador: Prof. Dr. Luís Alberto Kanis

Porto Velho – RO
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

ARLINDO GONZAGA BRANCO JUNIOR

AVALIAÇÃO DE UM TRATAMENTO EM FORMULAÇÃO TÓPICA COM O ANTIMALÁRICO CLOROQUINA EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*

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

Aprovada em: 20/02/2025

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br CAROLINA BIONI GARCIA TELES
Data: 15/04/2025 10:39:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Carolina Bioni Garcia Teles
FIOCRUZ – RO

Documento assinado digitalmente
gov.br KARINE MODOLON ZEPON
Data: 27/04/2025 14:29:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Karine Modolon Zepon
UNISUL

Documento assinado digitalmente
gov.br ALEJANDRO FERRAZ DO PRADO
Data: 26/04/2025 13:04:28-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Alejandro Ferraz do Prado
UFPA

Documento assinado digitalmente
gov.br RAFAELA DINIZ SOUSA
Data: 23/04/2025 20:16:44-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Rafaela Diniz Sousa
UniSL

Documento assinado digitalmente
gov.br ANSELMO FORTUNATO RUIZ RODRIGUEZ
Data: 25/04/2025 11:57:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez
UFAC

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Arlindo Gonzaga Branco Junior, (X) autorizo ( ) não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada "AVALIAÇÃO DE UM TRATAMENTO EM FORMULAÇÃO TÓPICA COM O ANTIMALÁRICO CLOROQUINA EM LESÕES CUTÂNEAS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*" 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, 20 de fevereiro de 2025

gov.br
Documento assinado digitalmente
ARLINDO GONZAGA BRANCO JUNIOR
Data: 15/04/2025 11:29:13-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

_____

Arlindo Gonzaga Branco Junior

CPF: 009.160.112-67

RG: 1100018 SSP/RO

AGRADECIMENTOS

À Deus, que guia e ilumina meus caminhos pela vida, aceita minhas orações e me dá forças para seguir.

Agradeço à minha Orientadora Professora Doutora Carolina Bioni Garcia Teles, pelas orientações, suporte, paciência, incentivo e apoio de viver intensamente meu trabalho. Obrigado pela dedicação e pelo papel importante que teve nesta caminhada.

À minha turma de Doutorado, pelo prazer da convivência durante nossa formação.

À minha família Maria da Conceição, Adislei Gonzaga, Advaldo Gonzaga e Ítalo Diógenes que tanto me apoiaram nessa jornada.

Ao Dr. Luiz Alberto Kanis pela capacitação e colaboração no desenvolvimento dos filmes poliméricos.

Agradeço imensamente pelo apoio, ensinamentos e amizade de Minelly e Saara nesses momentos intensos de estudos.

À todos os integrantes da minha família PBML (Amália, Aurileya, Leandro, Welington, Marcinete, Mariana, Norton, Sol Sol, Guilherme, Ana Paula, Laerth, Rebeca, Karen Almeida, Karen Silva e Wallyson). Gratidão a todos por todo apoio, dedicação e pelos inúmeros momentos de descontração.

Ao PPG-Bionorte – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, que oportunizou uma aprendizagem significativa.

Aos funcionários e usuários da Fundação Oswaldo Cruz, que deram auxílio material e profissional neste trabalho que foi de um valor inestimável.

Aos funcionários, alunos e usuários do Instituto Federal de Rondônia que auxiliaram direta ou indiretamente neste trabalho que foi de um valor inestimável.

A Fundação Rondônia de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia - Fapero que por meio do Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde – PPSUS auxiliou com fomento desta pesquisa.

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

"As pessoas costumam dizer que a motivação não dura sempre. Bem, nem o efeito do banho, por isso recomenda-se diariamente."

Zig Ziglar (1926-

BRANCO JUNIOR, A. G. **Avaliação de um tratamento em formulação tópica com o antimalárico Cloroquina em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis.*** 2025. 85f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Porto Velho, 2025.

RESUMO

Novas formas de tratamento, principalmente de forma tópica nas lesões de leishmaniose são de suma importância para saúde pública brasileira e constituem uma boa alternativa terapêutica. Sob esse viés, justifica-se a realização desse trabalho embasando-se em um estudo prévio da equipe PBML - Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose que foi realizado mostrando êxito para o tratamento de leishmaniose cutânea em modelo murino com Cloroquina via intraperitoneal (DE_{50} *in vivo* próximo de 27 mg/kg). A partir disso, sugere-se que esse antimalárico pode constituir um perfil promissor no custo-efetividade do tratamento das leishmanioses, inclusive, devido ao benefício de sua ação já comprovada em microrganismos intracelulares. Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial de permeação cutânea da Cloroquina e avaliar a eficácia do tratamento tópico e menos invasivo em modelos murinos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, a metodologia se baseou na realização de duas formulações a do tipo Hidrogel e tipo Filme contendo cloroquina (CQ), que tiveram o seu perfil de liberação avaliado através do teste de permeação cutânea *ex vivo* utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* e a quantidade do fármaco permeado foi determinado por espectrofotometria. Além disso, o perfil de susceptibilidade de *L. (L.) amazonensis in vivo* em camundongos BALB/c foi avaliado. Ambos os tratamentos com o adesivo do tipo Hidrogel e Filme contendo CQ foram realizados por 15 dias e durante esse período os parâmetros: peso dos animais, tamanho da lesão, além dos níveis sorológicos de transaminases hepáticas, ureia e creatinina foram avaliados. Após o tratamento também foram realizadas análises da determinação da carga parasitária das lesões no dorso e dos linfonodos dos camundongos. Os resultados *ex vivo* obtidos com adesivo do tipo Hidrogel+CQ demonstraram que houve a permeação média de 15% dessa formulação em 12 h de exposição, sendo que no quadragésimo segundo dia permeou 20,26%. Já da matriz Filme+CQ os resultados demonstraram uma permeação inicial baixa (9,360% ou 56,877 μg/cm² no 1º dia), que aumentou progressivamente, atingindo um pico no 28º dia (26,793% ou 162,801 μg/cm²). Quanto ao resultado do tratamento *in vivo*, o grupo de animais com adesivo do tipo Hidrogel+CQ não apresentou diminuição do tamanho das lesões, mas apresentou eficiência quando avaliada a diminuição da carga parasitária comparada ao grupo não tratado (inibição de 76,33%). Após o tratamento com Filme, o grupo com adesivo do tipo Filme+CQ também não apresentou diminuição do tamanho das lesões, mas apresentou eficiência quando avaliada a diminuição da carga parasitária (inibição de 83%) quando comparado ao grupo não tratado. No entanto, a combinação desse tratamento tópico com o tratamento intraperitoneal com Anfotericina não foi capaz de reduzir a parasitemia, como foi observado na formulação com Hidrogel+CQ. Todos os grupos apresentaram disseminação do parasito para os linfonodos regionais. Os testes por via tópica podem auxiliar na adesão do tratamento, diminuição da toxicidade e controle da doença. Ao fim deste estudo, observou-se que a aplicação tópica da CQ em formulação hidrogel e filme foi confirmada a partir dos resultados *in vivo* no tratamento por 15 dias de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis.*

Palavras chaves: *Leishmania* spp.; Cloroquina; Tratamento transdérmico; Hidrogel.

BRANCO JUNIOR, A. G. **Evaluation of a topical formulation treatment with the antimalarial Chloroquine in skin lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania (L.) amazonensis.*** 2025. 85f. Thesis (Doctorate in Biodiversity and Biotechnology) – Oswaldo Cruz Foundation, Porto Velho, 2025.

ABSTRACT

New treatment strategies, particularly topical applications for leishmaniasis lesions, are of utmost importance for Brazilian public health and represent a promising therapeutic alternative. Under this perspective, the present study is justified based on previous research conducted by the PBML - Malaria and Leishmaniasis Bioassay Platform, which demonstrated successful treatment of cutaneous leishmaniasis in a murine model using intraperitoneal chloroquine (DE_{50} *in vivo* approximately 27 mg/kg). This finding suggests that this antimalarial drug may represent a cost-effective therapeutic option for leishmaniasis, given its proven efficacy against intracellular microorganisms. Thus, the objective of this study was to evaluate the cutaneous permeation potential of chloroquine and assess the efficacy of a less invasive topical treatment in murine models infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The methodology involved the development of two different formulations: a hydrogel-based system and a film-based system containing chloroquine (CQ). The drug release profile was evaluated through *ex vivo* skin permeation tests using *Sus scrofa domesticus* (pig) skin, with the permeated drug quantified by spectrophotometry. Additionally, the *in vivo* susceptibility profile of *L. (L.) amazonensis* in BALB/c mice was analyzed. Both hydrogel and film-based CQ adhesive treatments were administered for 15 days, during which animal weight, lesion size, and serum levels of hepatic transaminases, urea, and creatinine were monitored. Following treatment, analyses were conducted to determine the parasite burden in dorsal lesions and lymph nodes of the mice. The *ex vivo* results obtained with Hydrogel+CQ demonstrated an average permeation of 15% within 12 hours of exposure, reaching 20.26% permeation by the 42nd day. In contrast, Film+CQ showed an initially low permeation rate (9.360% or 56.877 μg/cm² on the 1st day), which progressively increased, peaking on the 28th day (26.793% or 162.801 μg/cm²). Regarding the *in vivo* treatment results, the Hydrogel+CQ group did not exhibit a reduction in lesion size, yet it proved effective in reducing the parasite burden when compared to the untreated group (76.3% parasite inhibition rate). Similarly, the Film+CQ group did not show lesion size reduction, but it exhibited an 83% parasite inhibition rate, indicating efficacy when compared to the untreated group. However, the combination of this topical treatment with intraperitoneal Amphotericin B did not result in reduced parasitemia, unlike the Hydrogel+CQ formulation, which demonstrated a better outcome. All experimental groups exhibited parasite dissemination to regional lymph nodes. Topical administration strategies may contribute to treatment adherence, toxicity reduction, and improved disease control. At the end of this study, it was observed that the topical application of CQ in hydrogel and film formulations was confirmed based on in vivo results from a 15-day treatment of mice infected with *L. (L.) amazonensis*.

Keywords: *Leishmania* spp.; Chloroquine; Transdermal treatment; Hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*. CDC - *Center for Disease Control and Prevention*, 2024. **18**

Figura 2 - Tendência da leishmaniose tegumentar na região das Américas entre 2001 e 2022. **19**

Figura 3 - Tendência da leishmaniose visceral na região das Américas entre 2001 e 2022 **20**

Figura 4. Estrutura molecular da cloroquina. **29**

Figura 5. Visualização da Célula de Difusão de Franz utilizada para os testes de Permeação Cutânea **33**

Figura 6. Ilustração do Sistema de Permeação Cutânea **34**

Figura 7. Esquema ilustrativo da coleta e quantificação das amostras durante o ensaio de permeação cutânea utilizando a célula de Franz. **35**

Figura 8. Fluxograma de infecção na avaliação da lesão em Balb/c com *L. (L.) amazonensis*. **37**

Figura 9. Identificação dos grupos que compuseram o tratamento com adesivo dérmico, tipo hidrogel ou filme incorporado a Cloroquina, associado ou não ao uso de Anfotericina B em Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. **38**

Figura 10. Camundongo BALB/c com matriz aplicado no dorso. **38**

Figura 11. Tratamento com a matriz estudada com cloroquina associado ao uso de Anfotericina em DE_{50} em Balb/c. **39**

Figura 12. Curva de calibração da Cloroquina obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta **40**

Figura 13. Perfil de liberação *ex vivo* da Cloroquina (CQ) incorporada na formulação matricial em hidrogel ou filme, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco). **42**

Figura 14. Análise do perfil de liberação *ex vivo* de cloroquina incorporada na formulação matricial em hidrogel, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) ao longo de 42 dias **43**

Figura 15. Perfil de permeação *in vitro* da substância Cloroquina ao longo de 42 dias, incorporada na formulação matricial em filme, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco). **44**

Figura 16. Análise ex vivo da quantidade retida de cloroquina incorporada na formulação matricial em hidrogel, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) ao longo de 42 dias. **45**

Figura 17. Quantidade da substância Cloroquina proveniente da formulação matricial em filme, retida na pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) após 12 horas de contato. **46**

Figura 18. Imagens de lesões durante o tratamento com hidrogel de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente. **48**

Figura 19. Imagens de lesões durante o tratamento com hidrogel de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente. **51**

Figura 20. Tamanho médio das lesões do dorso dos camundongos Balb/c após inoculação de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não com CQ em formulação matricial tipo Filme (A) e Hidrogel (B) e anfotericina (AFT) via intraperitoneal **54**

Figura 21: 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 cloroquina (CQ) em adesivos com matriz tipo hidrogel (via tópica) e da Anfotericina B (via intraperitoneal). **56**

Figura 22: 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 CQ em matriz do tipo hidrogel e Anfotericina. **58**

Figura 23: 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 CQ em matriz do tipo hidrogel e Anfotericina. **60**

Figura 24: Concentrações séricas de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) de animais Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados e não tratados com CQ em matriz do tipo filme e Anfotericina **61**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Agentes quimioterápicos para leishmaniose, 2023. **23**

Quadro 2. Formulação utilizada na produção da matriz em Hidrogel e Filme **32**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados comparativos sobre a retenção da cloroquina (CQ) em pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) em amostras armazenadas por até 42 dias, após uso do sistema de permeação com célula de Franz **47**

Tabela 2: Avaliação da inibição da parasitemia da lesão de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com Anfotericina (via ip) e CQ (via tópica/ matriz tipo hidrogel). **56**

Tabela 3: Avaliação da inibição da parasitemia da lesão de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com Anfotericina (via ip) e CQ (via tópica/ matriz tipo filme **58**

Tabela 4: Avaliação da disseminação da parasitemia nos linfonodos de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com Anfotericina (via ip) e CQ (via tópica). **59**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	**Demanda Bioquímica de Oxigênio**
CQ	**Cloroquina**
CLIOC	**Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz**
DMSO	**Dimetilsulfóxido**
LCD	**Leishmaniose Cutânea Difusa**
LCDi	**Leishmaniose Cutânea Disseminada**
LCL	**Leishmaniose Cutânea Localizada**
LT	**Leishmaniose Tegumentar**
LV	**Leishmaniose Visceral**
OPAS	**Organização Panamericana de Saúde**
PBS	**Salina tamponada com fosfato**
Sb	**Antimônio**
OMS	**Organização Mundial da Saúde**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
1.1 Objetivo Geral 13
1.2 Objetivos Específicos 13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 LEISHMANIOSES 15
2.2 CICLO BIOLÓGICO 16
2.3 EPIDEMIOLOGIA 18
2.4 TRATAMENTO 21
2.5 LEISHMANIOSE E SAÚDE PÚBLICA 24
2.6 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS 27
2.7 CLOROQUINA 28
3. MATERIAIS E MÉTODOS 31
3.1 Preparação do Hidrogel e do Filme 31
3.2. Ensaios de permeação e retenção cutânea 32
3.2.1 Obtenção e preparo da pele suína 32
3.2.2 Montagem das células de Franz 33
3.2.3 Coleta e quantificação das amostras 34
3.2.4 Retenção cutânea in vitro 35
3.2.5 Análises estatísticas dos dados *ex vivo* 36
3.3 Ensaio in vivo **36**
3. 2.1 Obtenção dos animais 36
3.2.2 Infecção dos camundongos Balb/c, tratamento e acompanhamento do tamanho da lesão 36
4. RESULTADOS 41
4.1 Perfil de Liberação 41
4.2 Retenção de cloroquina na pele após 12 horas 42
4.3 Avaliação longitudinal da permeação e retenção da Cloroquina nas formulações com matriz Hidrogel e Filme 42
4.4 Experimento *In vivo* 47
4.4.1 Acompanhamento do tamanho da lesão 47
4.4.2 Quantificação da recuperação de parasitos da lesão do dorso dos camundongos infectados e tratados por via tópica com cloroquina em formulação tipo Hidrogel e Filme 55
4.4.3 Análise bioquímica *in vivo* 59
5. DISCUSSÃO 62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70
ANEXOS 79

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças de caráter antropozoonótico, com alta prevalência em regiões subtropicais, sendo reconhecida pela OMS como uma doença negligenciada (OMS, 2022).

Em 2023, o Brasil registrou aproximadamente 13 mil casos de leishmaniose tegumentar. Os estados da Região Norte, como Pará e Amazonas, são as áreas mais afetadas, com alta incidência de novos casos. A leishmaniose visceral, além de ser a forma mais grave e potencialmente fatal, apresentou uma média de 2 mil casos notificados anualmente, com uma tendência de estabilização, mas com surtos localizados, especialmente no Norte e Nordeste (Brasil, 2024).

Todas as formas de leishmaniose são tratáveis e curáveis, porém, a eficácia do tratamento está diretamente relacionada a diversos fatores, sendo o estado imunológico do paciente um dos mais determinantes. Indivíduos com um sistema imunocompetente e que aderem integralmente ao regime terapêutico apresentam uma taxa de recuperação mais elevada, uma vez que os medicamentos disponíveis não eliminam completamente o parasito, mas controlam sua disseminação e reduzem a carga parasitária no organismo (Brasil, 2022; OMS, 2023). No entanto, a adesão ao tratamento pode ser comprometida devido a fatores como efeitos colaterais adversos, a necessidade de administrações prolongadas e a via de aplicação dos fármacos, o que representa um desafio adicional para o sucesso terapêutico.

A diretriz da Organização Pan-Americana da Saúde de 2022 recomenda a aplicação intralesional de antimoniais pentavalentes para pacientes com leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*. A mudança ocorreu a partir da introdução da miltefosina como linha de tratamento em pacientes adultos diagnosticados com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania panamensis, Leishmania mexicana, Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* (OPAS, 2022).

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).

Uma abordagem para acelerar a descoberta de medicamentos é encontrar novos usos para medicamentos aprovados existentes, sendo denominado de "reposicionamento de fármacos" ou "reutilização de fármacos". Outra estratégia é avaliar combinações de fármacos aprovados objetivando uma ação sinérgica, como já descrito para tratamentos contra câncer, HIV e *Mycobacterium tuberculosis* (Ekins *et al*., 2011).

Um exemplo de reposicionamento de fármacos é a miltefosina (hexadecilfosfocolina) que é uma droga pertencente à classe das alquilfosfocolinas, inicialmente empregada como agente tópico no tratamento de metástases cutâneas do câncer de mama e foi incorporado para tratamento de Leishmaniose Tegumentar no SUS por meio da Nota Informativa nº 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS.

A partir disso, a Cloroquina pode ser um fármaco candidato interessante devido ao benefício de sua ação já comprovada em microrganismos intracelulares e eficácia (tratamento via intraperitoneal) em diminuir a parasitemia em camundongos com leishmaniose cutânea (LC) (Rossi *et al*., 2024).

Baseado nessa premissa, o objetivo deste trabalho é avaliar um tratamento em formulação tópica do antimalárico Cloroquina em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L.* (*L.*) *amazonensis*.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar um tratamento em formulação tópica da Cloroquina em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil de permeação cutânea *ex vivo* da Cloroquina (CQ) na formulação do tipo Hidrogel após o período de 12 horas, considerando amostras com diferentes períodos de armazenamento;
- Determinar o perfil de retenção cutânea *ex vivo* da CQ na formulação do tipo Hidrogel após o período de 12 horas;
- Quantificar a carga parasitária de *Leishmania* da lesão e linfonodo de camundongos Balb/c após o tratamento com e sem adesivos em hidrogel contendo CQ;
- Quantificar a carga parasitária de *Leishmania* da lesão e linfonodo de camundongos Balb/c após o tratamento com o adesivo de CQ em hidrogel quando associado à Anfotericina B;

- Avaliar os parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos pós-tratamento com o composto sozinho na formulação do tipo Hidrogel ou em combinação com a Anfotericina B;
- Determinar o perfil de permeação cutânea *ex vivo* da Cloroquina (CQ) na formulação do tipo Filme após o período de 12 horas, considerando amostras com diferentes períodos de armazenamento;
- Determinar o perfil de retenção cutânea *ex vivo* da CQ na formulação do tipo Filme após o período de 12 horas;
- Quantificar a carga parasitária de *Leishmania* da lesão e linfonodo de camundongos Balb/c após o tratamento com e sem adesivos em Filme contendo CQ;
- Quantificar a carga parasitária de *Leishmania* da lesão e linfonodo de camundongos Balb/c após o tratamento com o adesivo de CQ em Filme quando associado à Anfotericina B;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos pós-tratamento com o composto sozinho na formulação do tipo Filme ou em combinação com a Anfotericina B.

2. **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

2.1 LEISHMANIOSES

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), um grave problema de saúde pública, estando entre uma das sete doenças tropicais mais importantes do mundo. É causada por 20 das 30 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ross, 1903), classe Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Cupolillo; Boité, 2014; OMS, 2022). O parasito é transmitido aos seres humanos através da picada de flebotomíneos (fêmeas), principalmente dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Gabriel *et al*., 2019; Flaih, 2022; OMS, 2022).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose em humanos, classificados principalmente nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. No subgênero *Leishmania*, destacam-se as espécies dos complexos *donovani* (*L. don*ovani e *L. infantum*) e mexicana (*L. mexicana, L. amazonensis* e *L. venezuelensis*), além de *L. tropica, L. major* e *L. aethiopica*. O subgênero *Viannia* inclui espécies como *L. braziliensis, L. guyanensis, L. panamensis* e *L. peruviana*. No Brasil, foram identificadas sete espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania: L. (Viannia) braziliensis, L. (Viannia) guyanensis, L. (Viannia) lainsoni, L. (Viannia) naiffi, L. (Viannia) lindenbergi* e *L. (Viannia) shawi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Brasil, 2017).

É importante destacar que a leishmaniose é conhecida como uma doença endêmica oscilante, não controlada, que possui um espectro de manifestações clínicas, com diferentes níveis de gravidade que depende da espécie envolvida e da resposta imune do hospedeiro, presença de potenciais vetores no ambiente, fatores ecológicos e climáticos, e em alguns casos pode ter um desfecho potencialmente fatal (Conceição-Silva; Alves, 2014; OMS, 2022). Alguns autores dividem a leishmaniose em dois grandes grupos sendo: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV) (Conceição-Silva; Alves, 2014; Flaih, 2022; OMS, 2022).

A LC é caracterizada pelo acometimento de estruturas cutâneas, de forma localizada ou difusa, podendo acometer também as mucosas oral e/ou nasal (Costa, 2005). No Novo Mundo, a LC é classificada segundo as manifestações clínicas, as características histopatológicas e a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito (Gontijo, 2003; Silveira *et al*., 2004; Silveira *et al*., 2009).

A LC pode se manifestar em diferentes formas clínicas, incluindo a forma localizada, difusa e mucosa. A Leishmaniose Tegumentar Localizada (LTL) é a forma mais comum da LC, caracterizada por uma única lesão ou poucas lesões ulceradas na pele, geralmente em áreas

expostas. A infecção ocorre devido à picada de flebotomíneos infectados e a resposta imunológica do hospedeiro limita a disseminação do parasita (Brasil, 2017).

Já a Leishmaniose Tegumentar Difusa (LTD), diferente da forma localizada, apresenta múltiplas lesões nodulares e não ulceradas espalhadas pelo corpo, devido à falha na resposta imunológica mediada por células (Guimarães *et al.*, 2020).

Quando se fala da Leishmaniose Mucosa (LTM) esta se caracteriza pelo acometimento das mucosas do trato respiratório superior, especialmente nariz, faringe e laringe, podendo levar a graves deformidades. A LTM ocorre frequentemente como uma evolução tardia da forma localizada, devido à disseminação hematogênica ou linfática do parasita (Gomes; Souza; Oliveira, 2019).

No Brasil, as espécies de *Leishmanias* mais importantes envolvidas na ocorrência de casos de LC são: *Leishmania (L.) amazonensis, L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* (Brasil, 2021).

Na América do Sul, a doença é generalizada. Países como: Bolívia, Brasil e Peru apresentam os maiores registros de leishmaniose mucocutânea (LMC) (OPAS, 2018; OMS, 2022).

A LV, também conhecida como leishmaniose visceral humana, é popularmente conhecida como “calazar” ou “febre negra”. Trata-se de uma enfermidade infecciosa não contagiosa de caráter crônico e evolução sistêmica que, se não tratada, pode ser fatal em até 90% dos casos (Brasil, 2024).

A LV é diferenciada pela disseminação dos parasitos para outros órgãos não cutâneos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, sendo potencialmente letal (10% dos casos) caso não seja instituído rapidamente o tratamento. A LV apresenta diferentes manifestações clínicas, variando entre a forma assintomática, a oligoassintomática e a forma clássica da doença, caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Drumond, 2011).

2.2 CICLO BIOLÓGICO

Os insetos vetores da leishmaniose são pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae,* gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como “mosquito-palha”, “tatuquira” e “birigui (Brasil, 2024).

Independente da espécie do parasito envolvida na infecção natural, a porta de entrada do patógeno é a mesma durante a infecção por *Leishmania* (Murray *et al*., 2005). A transmissão (Figura 1) inicia no momento em que formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são

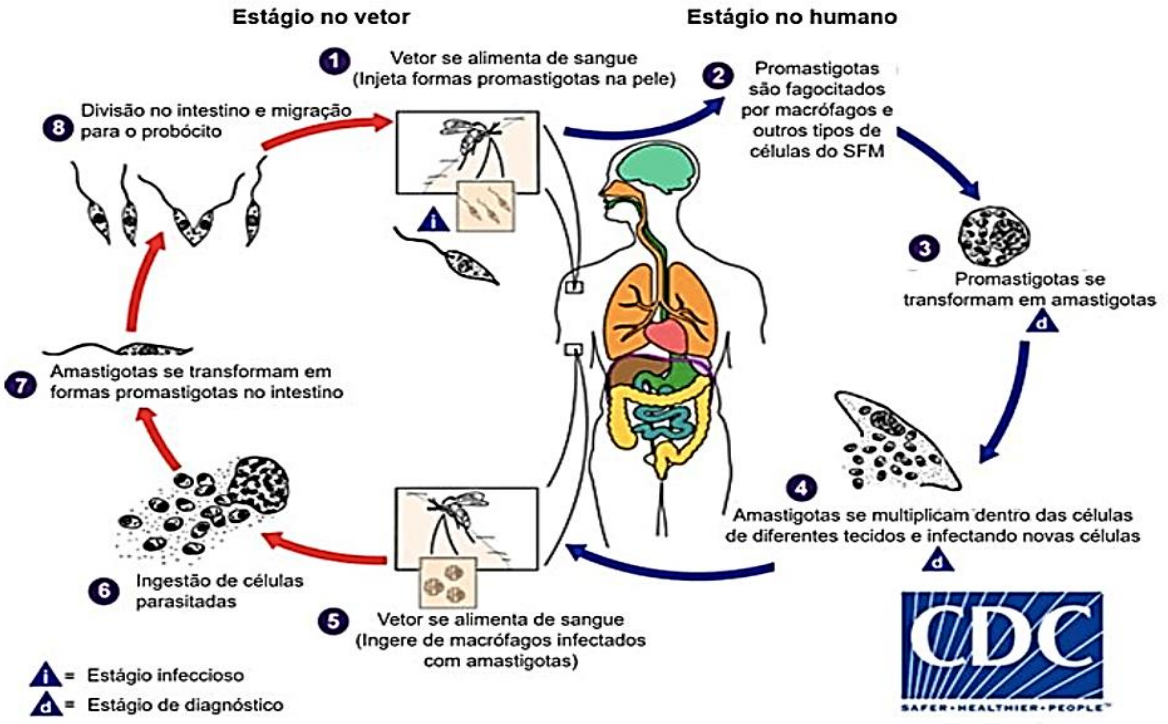
inoculadas na derme do hospedeiro mamífero no momento do repasto sanguíneo de fêmeas de insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Santos *et al*., 2008).

As promastigotas encontradas no intestino do inseto vetor são móveis e possuem flagelos externalizados que conferem mobilidade ao parasito. Elas sobrevivem em torno de 25-26 °C e condições de pH alcalino, têm aproximadamente 10-15 µm de comprimento e 1,5-3,5 µm de largura e podem variar entre as espécies (Barral-Netto *et al*., 1986; Conceição-Silva; Alves, 2014).

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea infectada inocula as promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado. Em seguida, 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. Após um novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, as fêmeas dos flebotomíneos não infectadas podem ingerir células infectadas, e por ação de enzimas digestivas, as células infectadas se rompem e liberam as amastigotas no sistema digestivo do vetor. 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 poderão infectar novo hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (Teixeira *et al.*, 2013; CDC - *Center for Disease Control and Prevention*, 2024).

Vale salientar que o homem se torna hospedeiro quando entra acidentalmente no ciclo silvestre do protozoário, em regiões ou áreas próximas, até mesmo no interior das florestas (Almeida; Leite; Cardoso, 2018).

Figura 1. Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*. CDC - *Center for Disease Control and Prevention*, 2024.



Legenda: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Etapas 1 a 4: estágio do parasita no hospedeiro vertebrado. Etapas 5 a 8: estágio do parasita no hospedeiro invertebrado: vetor.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

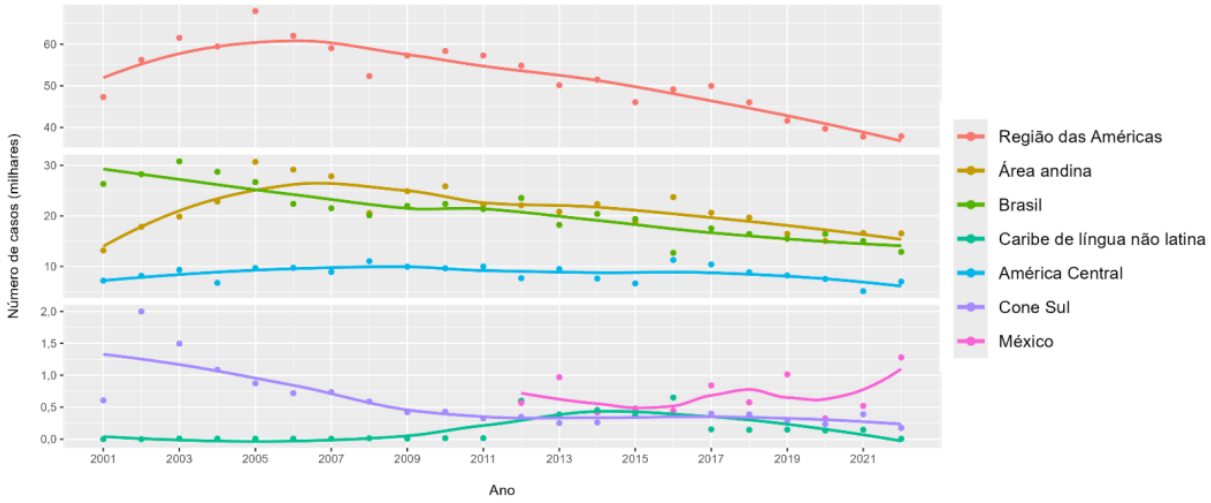
A leishmaniose, afeta mais de 12 milhões de pessoas no mundo e é endêmica em mais de 90 países. Entre essas nações, 89 são endêmicas para a LC 80 para a LV e 71 para ambas as formas clínicas (OPAS, 2024).

Na Região das Américas, a LC é notificada desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção das ilhas do Caribe e do Chile. Entre 2001 e 2022, foram registrados 1.105.545 casos de LT, Figura 2 (OPAS, 2024).

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 é 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 (Gontijo; Carvalho, 2003; Alvar *et al*., 2012; OPAS, 2018; Gabriel *et al*., 2019; OMS, 2022).

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, 2018; OMS, 2022).

Figura 2 - Tendência da leishmaniose tegumentar na região das Américas entre 2001 e 2022.



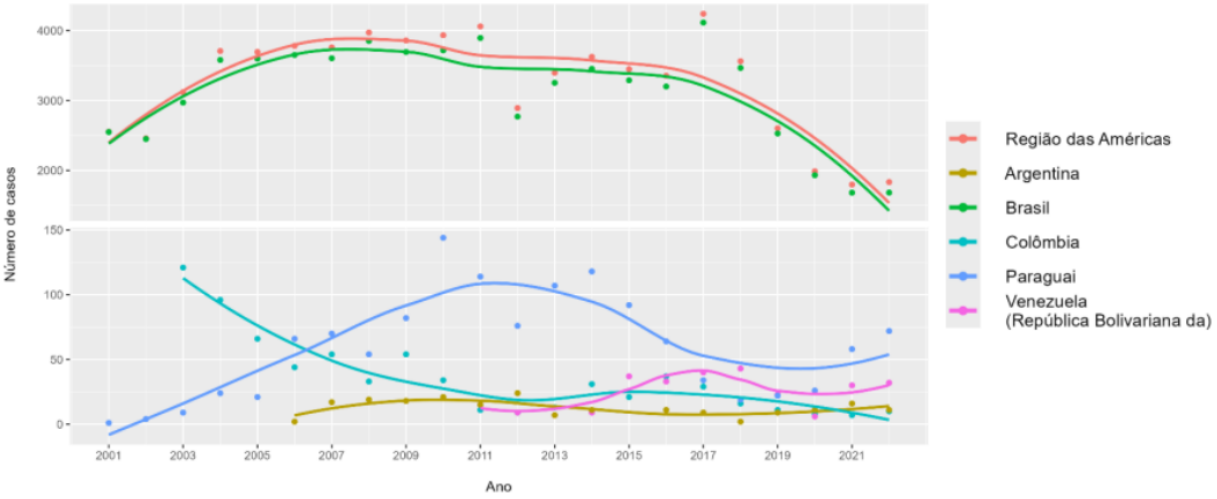
Fonte: OPAS, 2024.

Em relação à LV em 2022, 44% dos casos globais foram registrados no Mediterrâneo Oriental, seguidos por 33% na Região Africana, 14% nas Américas e 8% no Sudeste Asiático. Apenas quatro países — Brasil, Quênia, Sudão do Sul e Sudão — relataram mais de 1.000 casos de LV cada, somando 8.662 casos e representando 68% do total global em 2022 (OPAS, 2024). Na região das Américas foram reportados 37.890 casos de leishmaniose tegumentar por 16 países em 2022. A incidência regional foi de 17,42 casos por 100 mil habitantes, representando um aumento de 10% em relação a 2021. Observou-se um aumento expressivo de casos no México (146%), Nicarágua (94%), Honduras (41%) e Guatemala (35%). Por outro lado, houve redução significativa na Argentina (65%), Equador (30%), El Salvador (22%), Brasil (14%) e Costa Rica (13%) (OPAS, 2023).

No período de 2001 e 2021, ocorreram 69.665 novos casos de LV, com uma letalidade média de 8%, a mais alta entre os continentes, Figura 3 (OPAS, 2024).

Seis países apresentaram maior percentual de casos em mulheres, com destaque para El Salvador (54%) e Panamá (45,6%). A faixa etária mais acometida entre as mulheres foi entre 20 e 50 anos (51,3%). Em menores de 10 anos, registrou-se o menor número de casos desde 2012, correspondendo a 9,8% do total (OPAS, 2023).

Figura 3 - Tendência da leishmaniose visceral na região das Américas entre 2001 e 2022.



Fonte: OPAS, 2024.

De acordo com Plano de Ação para Fortalecer a Vigilância e o Controle das Leishmanioses nas Américas 2023 à 2030, em setembro de 2023, 48 dos 90 países endêmicos notificaram à OMS casos de LC em 2022, e 47 dos 80 países notificaram casos de LV. Em 2023, mais de 94% dos casos de LC registrados no mundo concentraram-se na região do Mediterrâneo Oriental, que respondeu por 76% dos casos, e nas Américas, que representaram 18%. Oito países notificaram mais de 5.000 casos de LC, totalizando 85% da carga global: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru e República Árabe Síria (OPAS, 2024).

Em 2023, o Brasil registrou aproximadamente 13 mil casos de leishmaniose tegumentar. Os estados da Região Norte, como Pará e Amazonas, são as áreas mais afetadas, com alta incidência de novos casos. A LV, além de ser a forma mais grave e potencialmente fatal, apresentou uma média de 2 mil casos notificados anualmente, com uma tendência de estabilização, mas com surtos localizados, especialmente no Norte e Nordeste (Brasil, 2024).

Os inúmeros casos de leishmaniose tegumentar americana registrados no Brasil chama a atenção dos órgãos responsáveis pela saúde pública, pois, apesar de não ser contagiosa, a doença vem ocasionando inúmeros agravos no setor de saúde pública do país (Brasil, 2019).

A média anual é de aproximadamente 21.000 casos, com um coeficiente de incidência de 8,6 casos por 100.000 habitantes nos últimos cinco anos. A maior taxa de incidência é observada na região Norte, com 46,4 casos por 100.000 habitantes, seguida pelas regiões Centro-Oeste (17,2 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (8 casos por 100.000 habitantes) (Brasil, 2024).

Conforme dados do DATASUS, a situação da LC no Brasil entre 2020 e 2023 demonstra uma tendência de queda geral, embora com variações ao longo dos anos. Em 2020, foram

registrados 849 casos, seguido de uma redução em 2021 para 754 casos. Em 2022, houve uma leve alta para 766 casos, que se manteve estável em 2023, com um aumento discreto para 811 casos (Brasil, 2024).

De acordo com o Painel de Monitoramento da Situação Epidemiológica da Leishmaniose no Brasil, os municípios com maior número de casos de leishmaniose tegumentar em Rondônia demonstram uma concentração significativa em algumas localidades nos anos de 2020 a 2024. Vilhena lidera a lista com 363 casos registrados, seguido por Porto Velho com 287 casos e Espigão D'Oeste com 254. Machadinho D'Oeste aparece em quarto lugar com 152 casos, e Ji-Paraná contabiliza 125. Há ainda outros municípios com números expressivos incluem Chupinguaia, São Francisco do Guaporé, Nova Mamoré, Alta Floresta D'Oeste e Cacoal (Brasil, 2024).

Nesse contexto, corroborando os resultados de Branco Júnior (2022), Porto Velho e a região sudeste do estado por serem regiões metropolitanas em crescimento populacional no estado de Rondônia (IBGE, 2022), podem ter esse destaque quanto às notificações de casos de leishmaniose. Convergente a isso, as pesquisas científicas em quimioterapia de leishmaniose na região Norte são fundamentais para contribuir não apenas para a saúde da população afetada, mas também para o avanço do conhecimento e inovação na luta contra essa doença endêmica.

Diante do exposto, fica evidente a importância da LC no mundo, e mais especificamente no Brasil, tornando de extrema necessidade que medidas de controle da doença sejam elaboradas por meio da vigilância epidemiológica e entomológica, e do estabelecimento de tratamentos eficazes, seguros e viáveis economicamente (Rocha, 2012).

2.4 TRATAMENTO

No Brasil, o tratamento para a leishmaniose é gratuito, diferentemente dos demais países endêmicos onde a assistência à saúde é limitada e o tratamento apresenta um custo elevado, impactando negativamente nos esforços de controle e manejo da doença. Além disso, a OMS relata vários problemas quanto ao tratamento: os protocolos de tratamento destes países não acompanham as últimas descobertas; a indústria farmacêutica não visa o desenvolvimento de novas moléculas, pois não há mercado lucrativo; o fornecimento de medicamentos não é contínuo; a maioria dos medicamentos anti-*Leishmania* são produzidos por apenas um único fabricante e a falta de logística devido à instabilidade de pedidos pelos países. Esse quadro acarreta problemas com qualidade, baixa capacidade de produção e falta de uma previsão adequada de necessidades, resultando em longos prazos para pedidos (Brasil, 2017; OMS, 2017; Rossi, 2018).

Mesmo com grande prevalência da doença, poucos avanços foram obtidos no tratamento das Leishmanioses, inclusive, há aproximadamente sessenta anos, o tratamento clássico para todas as formas dessa parasitose consiste nos mesmos fármacos: antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (Pentostan) e Antimoniato de Meglumina (Glucantime). Outros fármacos como: anfotericina B lipossomal, desoxicolato de anfotericina B, isetionato de pentamidina, pentoxifilina e paromomicina foram reposicionados para a quimioterapia das leishmanioses, no entanto, todos apresentam desafios na adesão ao tratamento e graves efeitos colaterais (Rath *et al.*, 2003; Silva, 2021).

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

Nesse contexto, em 2020, foi lançado o informativo nº 13 para orientar o uso do medicamento miltefosina (hexadecilfosfocolina) a ser utilizado no tratamento da leishmaniose cutânea no âmbito do SUS. De acordo com o documento, recomenda-se cautela no uso do medicamento em formas mucosas, em pacientes pediátricos, devido aos seus efeitos tóxicos e teratogênicos. Não é recomendado também para lactantes, mulheres grávidas e pacientes em idade fértil (Brasil, 2020b).

Muitos anos se passaram, no entanto, ainda existe a necessidade de novos tratamentos com menores efeitos colaterais e maior facilidade de aplicação (Ameen, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Comandolliwyrepkowski *et al.*, 2017).

No esquema terapêutico (Quadro 1), deve-se considerar fatores como espécie dos parasitos, forma clínica, quantidade, tamanho e local das lesões sendo essas informações relevantes na escolha do tratamento. Porém, ainda existem casos em que se faz necessária a utilização de combinação de fármacos na tentativa de obter uma resposta à quimioterapia, a fim de melhorar a ação e reduzir a toxicidade (Brasil, 2017; Silva, 2021).

Acerca do antimoniato de metilglucamina (glucantime), esse fármaco foi desenvolvido em 1912 por Gaspar Vianna sob a forma do composto tartarato de sódio. Apesar de sua toxicidade e das queixas quanto a sua administração, o fármaco ainda é considerado eficaz, onde no Brasil há 68% de taxa de cura pós-tratamento. Passados mais de cem anos, a quimioterapia ainda é insatisfatória, pois apresenta um número limitado de fármacos com elevada toxicidade, alto custo e aumento nos casos de resistência (PAHO, 2019; Schubach, Conceição-Silva, 2014; Silva, 2021).

Quadro 1. Agentes quimioterápicos para leishmaniose, 2023.

Medicamento	Forma de administração	Efeitos colaterais
Antimoniais	- Endovenosa sem diluição: infusão lenta (mínimo de cinco minutos). - Endovenosa diluída em 100 mL de soro glicosado: infusão em 30 minutos. - Intramuscular. -Intralesional de forma subcutânea.	Cardiotoxicidade; pancreatite; nefrotoxicidade; hepatotoxicidade.
Isetionato de pentamidina	Endovenosa lenta ou intramuscular profunda.	Hiperglicemia; hipotensão; taquicardia; alterações eletrocardiográficas.
Anfotericina B lipossomal	Endovenosa	Calafrios e calafrios durante a injeção; nefrotoxicidade leve.
Desoxicolato de anfotericina B	Endovenosa	Toxicidade renal; reações relacionadas à injeção; hipocalemia.
Miltefosina	Oral	Toxicidade renal e hepática; teratogenicidade.
Pentoxifilina	Oral	Flush (rubor facial com sensação de calor) e distúrbios gastrintestinais como sensação de pressão gástrica, plenitude, náusea, vômito ou diarreia.
Paromomicina	Intramuscular/Tópico	Hepatoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, edema e irritação no local da administração.

Fonte: Brasil (2017); Pradhan *et al.* (2022) adaptado.

É importante destacar que há outras formas de terapias medicamentosas tais como as locais como a Terapia Fotodinâmica que envolve o uso de ácido aminolevulínico ou metil-aminolevulinato aplicado topicamente na pele, sendo que estudos *in vivo* mostraram que o ALA-PDT tópico resultou em extensa destruição tecidual e redução significativa da carga parasitária (Pradhan *et al*., 2022).

Outra forma de esquema terapêutico que pode ser realizada é a intralesional, sendo mais indicada quando for lesão única com até 3 cm no seu maior diâmetro, em qualquer localização, exceto cabeça e regiões periarticulares, incluindo recidiva cútis e sem imunossupressão (Brasil, 2017).

Há de se destacar a importância da crioterapia, pois auxilia na formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares que resultam em danos às células infectadas e destruição de amastigotas em temperaturas abaixo de zero. Nesse aspecto, tem-se observado uma boa resposta em pacientes com lesões cutâneas de 10 a 30 mm de tamanho, com evolução menor que três meses (Pradhan *et al*., 2022).

Nesse sentido, as mudanças das demandas do sistema de saúde implicam em transformações necessárias no cuidado do paciente que procura o Sistema Único de Saúde. Baseado nessa premissa e considerando as características da lesão da leishmaniose, bem como pacientes que apresentam doenças renais e cardíacas que contraindicam o uso do glucantime,

faz-se necessário, portanto, a realização de pesquisas que busquem desenvolvimento de novos fármacos para esta doença.

2.5 LEISHMANIOSE E SAÚDE PÚBLICA

Como descrito anteriormente, a leishmaniose é uma infecção zoonótica que afeta animais selvagens, animais domésticos e o homem. Os animais selvagens representam os verdadeiros reservatórios, enquanto o homem é considerado um hospedeiro acidental. A leishmaniose apresenta incidência importante e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e pessoas afetadas por Vírus da Imunodeficiência Adquirida (Foganholi; Zappa, 2011).

Pensando na leishmaniose e na dinâmica populacional, observa-se a importância da leishmaniose na saúde pública quando se discute a transição demográfica, o envelhecimento populacional e a transição epidemiológica. Tais processos estão estreitamente correlacionados e observamos que o crescimento demográfico altera o peso dos grupos etários, assim desencadeando o processo irreversível de envelhecimento populacional (Castiglioni, 2008).

Mesmo com esse pensamento de mudança no perfil da população com a teoria da Transição Epidemiológica, ainda se tem um número significativo de óbitos atribuídos às doenças transmissíveis e causas externas. Em grande parte, isso pode ser em decorrência do Brasil ter uma região bastante heterogênea que apresenta desigualdades, ocasionadas pelas distintas realidades econômicas, sociais e culturais. Sendo assim, apesar do país se apresentar em processo mais avançado de Transição Demográfica, as taxas de mortalidade por doenças transmissíveis ainda são relativamente altas (Vasconcelos *et al*., 2012).

Este fato se destaca, pois acarreta mudança do pensamento para o controle das doenças antes responsáveis pela alta mortalidade, principalmente doenças infecto-parasitárias. É importante salientar que cada vez mais indivíduos que “escapam” do risco de morte nas primeiras idades, atingem idades mais avançadas nas quais serão submetidos aos riscos de morte por doenças de cura mais difíceis no atual estágio de desenvolvimento médico e científico (Castiglioni, 2012), dita essas as doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs).

Atrelado a isso, as DCNTs vêm sendo responsáveis por 41 milhões de mortes anualmente. Entre as mais frequentes estão as enfermidades cardiovasculares (17,9 milhões), cânceres (9 milhões) e diabetes mellitus (1,6 milhões). Torna-se assim um problema de saúde pública, pois apenas 25% das pessoas com DCNTs são assistidas e, dentre elas, somente cerca de metade alcança as metas desejadas de tratamento clínico. Esse resultado se deve, sobretudo,

ao acesso insuficiente à atenção à saúde e ao manejo inadequado das DCNT (OMS, 2019; Agreli *et al*., 2019).

Com essa insuficiência de manejo das DCNT associado ao aumento do padrão exploratório das florestas e à migração do homem para regiões próximas às áreas de mata modificada, ocorre também uma alteração no padrão de transmissão de algumas doenças infectocontagiosas, surgindo o padrão rural periflorestal. O inseto vetor da leishmaniose pode vir a se desenvolver de forma estável em regiões de peridomicílios, incluindo, assim, o envolvimento de animais domésticos, como cães na forma de reservatório e, consequentemente, ampliando a distribuição do agente etiológico da LC (Santos, 2021; Pinheiro; Granzoto, 2023).

Diante disso, há de se enfatizar que a aproximadamente sessenta anos o tratamento clássico para todas as formas dessa parasitose consiste nos seguintes fármacos: antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (Pentostan), antimoniato de meglumina (glucantime). E a grande maioria desses fármacos está associada 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). Com isso pode-se ter pacientes com DCNT e LC para tratamento sendo que muitos efeitos colaterais dos medicamentos podem interferir/descompensar a sua doença base e dificultar a cura da LC.

Devido aos efeitos colaterais dos medicamentos e à mudança do perfil populacional, é essencial buscar novas formas de cuidado que garantam tratamentos eficazes, minimizem impactos sobre doenças crônicas não transmissíveis e incentivem a participação ativa do usuário no processo de tratamento e cura. Na saúde pública, essa participação é fundamental para a continuidade do cuidado, sendo um aspecto central na humanização da medicina. Nesse contexto, a abordagem da medicina centrada no paciente, considerada por alguns autores como um novo método clínico (McWhinney, 1997), surge como uma estratégia relevante para fortalecer essa relação e melhorar os desfechos terapêuticos.

O grande desafio para a saúde pública no Brasil, diante da recente urbanização da leishmaniose, está diretamente relacionado com a dificuldade no diagnóstico clínico e laboratorial, na subnotificação dos casos e na orientação da população sobre a prevenção, o que impede conhecer a real magnitude do problema (Silva, 2017; Pinheiro; Granzoto, 2023). Com isso, o sistema público de saúde deve rever e otimizar as estratégias para tratamento que tenham uma eficácia terapêutica e participação do usuário para findar na cura da doença.

"O tratamento de uma doença pode ser totalmente impessoal, o cuidado do paciente precisa ser totalmente pessoal" (Peabody, 1927) então, estratégias de medicamentos onde o usuário tenha participação ativa no cuidado torna-se importante para organizar o tratamento eficaz para a doença.

Caprara e Rodrigues (2004) destacaram uma necessidade crescente em desenvolver uma comunicação mais aberta entre médicos e pacientes que possibilite uma maior qualidade na relação. O médico deve incorporar aos seus cuidados a percepção do paciente acerca de sua doença, que possivelmente diverge do modelo clínico, visto que são valores e compreensões próprias daquele caso. Há a necessidade de conhecer a realidade do paciente, ouvir suas queixas e encontrar, junto com ele, estratégias que facilitem sua adaptação ao estilo de vida influenciado pela doença.

Este ponto torna-se importante pois o usuário portador de leishmaniose tem além da doença toda uma singularidade biopsicossocial que pode interferir direta ou indiretamente na continuidade do tratamento. Pesquisas que visam novos tratamentos onde o usuário tem participação ativa no processo de cura são importantes para o sistema de saúde em decorrência a maior possibilidade de sucesso e claro, o emprego do método clínico centrado na pessoa tornando assim o tratamento mais humano e por consequência mais eficaz.

Branco Junior *et al*. (2022) destacaram em seu trabalho que 56,87% dos casos de leishmaniose cutânea, no estado de Rondônia, entre 2016 a 2020 evoluíram para cura, 38,05% em sua evolução foram ditos como ignorado ou branco e 3,16% dos casos notificados como abandono do tratamento. Tal fato pode ser explicado pela condução inadequada dos registros dos pacientes durante o tratamento ou descontinuidade deste por diversos fatores não investigados em sua pesquisa, dentre elas aderência ao tratamento, por exemplo.

LC é considerada um agravo de notificação compulsória, sendo necessário que os casos confirmados devem ser notificados e investigados pelos serviços de saúde responsáveis, por meio de uma ficha de investigação padronizada e disponibilizada pelo SINAN (Brasil, 2017). A oferta de um sistema de saúde eficiente no diagnóstico e condução clínica dos casos, seria uma alternativa para abrandar os agravos causados pela endemia.

Branco Junior *et al.* (2022) destacaram que a LC possui uma prevalência considerável no estado de Rondônia fazendo necessário maiores investimentos e estudos para viabilizar ações preventivas, o diagnóstico precoce e o tratamento, oferecendo assim uma possível melhoria na qualidade de vida da população acometida pela doença.

Para os investimentos em pesquisa visando novos tratamentos para leishmaniose, há de se pensar formas de tratamento onde se tenha a participação ativa do usuário com foco no método clínico centrado na pessoa; medicamentos com menos efeitos colaterais e mais tolerabilidade por pessoas com DCNTs e fármacos com abordagens inovadoras, eficazes e de baixo custo.

2.6 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

A introdução de um novo fármaco no mercado é um processo complexo, competitivo, longo, oneroso e com uma probabilidade muito pequena de sucesso. Estima-se que desde a concepção do projeto até a introdução de um único fármaco no mercado, se gasta de 12 a 15 anos e cerca de US$ 800 milhões, podendo em alguns casos chegar a US$ 1,8 bilhão (Paul *et al.*, 2010; Mestre-Ferrandiz; Sussex; Towse, 2012).

Já as Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPs) que ainda provocam um alto índice de morbi-mortalidade na população, principalmente em países subdesenvolvidos (Ministério da Saúde, 2010) tem um nível de investimento pequeno devido à baixa expectativa de retorno financeiro para estes projetos (Johnston; Ford; Taylor, 2014).

Há uma alta taxa de falhas nos projetos durante o desenvolvimento e isso representa uma das principais causas deste cenário (Waring *et al.*, 2015). Baseado nessa problemática, vem a fala de Markus (2001), onde relata que a reutilização do conhecimento, torna-se a matéria-prima dos processos inovadores que trarão as melhorias na saúde e em todos os sistemas que dela dependem. Isso acaba por refletir nas percepções de que nenhum alvo está sozinho, mas é incorporado em uma rede altamente complexa e heterogênea, e a reatividade cruzada de diferentes dosagens com outros alvos devem ser consideradas (Eichborn *et al.*, 2011).

Ponderando esta exposição, acredita-se que a elaboração de um método baseado no reuso (Markus, 2001) de documentos textuais digitais sejam um potencial promissor no sentido de facilitar o reposicionamento de medicamentos, no qual, outros pesquisadores podem utilizar destes métodos para dar continuidade aos estudos em laboratórios com projetos *in silico, in vitro* até o experimento *in vivo*.

A estratégia conhecida como reposicionamento de fármacos, pode acelerar o processo de desenvolvimento de fármacos. Isto porque são compostos cujas características farmacocinéticas (absorção, metabolização, distribuição e excreção) e toxicológicas já estão bem estabelecidas, e sabe-se que esses dois fatores são os principais responsáveis por 50% das falhas nos estágios pré-clínicos e clínicos do processo de desenvolvimento de fármacos (Oprea *et al*., 2011).

Outra estratégia é analisar combinações de fármacos aprovados na expectativa de que sejam sinérgicos, considerando suas atividades em tratamentos contra câncer, HIV e *Mycobacterium tuberculosis* (Ekins *et al*., 2011), dentre outros.

Outro exemplo de reposicionamento de fármacos é a Miltefosina, inicialmente comercializada para o tratamento do câncer de mama (Clive *et al*., 1999) e após estudos foi

publicada a Portaria n° 56, de 30 de outubro de 2018, incorporando o fármaco ao tratamento oral da Leishmaniose Tegumentar, em primeira linha de tratamento, no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

Pode-se também citar a Anfotericina B, fármaco descoberto em 1953, como outro exemplo de reposicionamento de fármacos pois ainda permanece como substância fungicida de escolha no tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos, e é utilizada no tratamento de LTA (Barros, 2013; Brasil 2017).

Mais uma exemplificação seria a da pentamidina (PNT), inicialmente investigada na década de 1920 devido à sua ação hipoglicemiante e foi identificada como tripanossomicida ao demonstrar eficácia contra o *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma rhodesiense* em estudos experimentais. Sua atividade terapêutica emergiu das pesquisas sobre amidinas aromáticas, destacando-se como um dos três compostos com potencial curativo para infecções parasitárias, o que levou ao seu reposicionamento para o tratamento de doenças como a leishmaniose (Costa, 1993).

Uma alternativa para novos tratamentos contra leishmaniose é o reposicionamento de fármacos já usados contra outros protozoários intracelulares, como o *Plasmodium* ssp., podendo ser uma estratégia viável para acelerar a pesquisa no tratamento e prevenção desta doença. No Paquistão houve dois estudos em humanos com tratamento de Cloroquina, sendo um por via intralesional e outro por via oral com resultados promissores (Noor *et al*., 2005; Khan *et al.*, 2007).

Nessa perspectiva, vários fármacos, incluindo os antimaláricos, são listados como potenciais alternativas para estudos mais avançados no tratamento dessa doença (INFOLEISH, 2018). Um trabalho mais antigo com essa abordagem foi publicado por Rocha *et al*. (2013), cuja eficácia *in vivo* da cloroquina no tratamento de leishmaniose cutânea foi demonstrada. Nesse cenário, esse fármaco foi o candidato selecionado para o aprofundamento da sua potencial aplicação tópica para leishmaniose cutânea no presente estudo.

2.7 CLOROQUINA

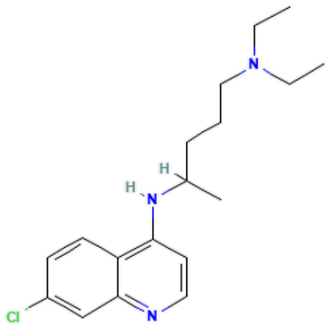
A quinolina é também conhecida como benzopiridina, benzo[b] piridina, 1-Benzazina e simplesmente benzazina. Apresenta-se como um líquido oleoso, amarelo, higroscópico, ligeiramente solúvel em água e um pouco mais solúvel em álcool e outros solventes orgânicos. Por apresentar atividades biológicas diversificadas e também terem uma estrutura relativamente simples, tem atraído o olhar da comunidade científica, especialmente os pesquisadores envolvidos na química dos produtos naturais (Jains *et al*., 2016; Silva *et al*. 2017).

A aplicação dos derivados da quinolina na forma de fármacos é amplamente conhecida, abrangendo diversas classes terapêuticas. Entre os principais compostos, destacam-se os antimaláricos, como quinina, quinidina, cloroquina, mefloquina, amodiaquina e primaquina; os antivirais, como saquinavir; os antibacterianos, incluindo ciprofloxacina, sparfloxacina e gatifloxacina; além do antifúngico e antiprotozoário clioquinol. Também fazem parte desse grupo o anti-helmíntico oxamniquina, o anestésico local dibucaína, os antineoplásicos camptotecina, irinotecano e topotecano, os antipsicóticos aripiprazol e brexpiprazol, e o cardiotônico vesnarinona (Afzal et al., 2015).

A cloroquina (Figura 4) é o fármaco alvo deste estudo e os seus mecanismos de ação sugerem: i) a interação com DNA do *Plasmodium* spp., ii) comprometimento da função do lisossoma levando-o a condições menos ácidas e, assim, diminuindo a sua função; iii) inibição da síntese de proteínas pelo parasito heme-dependente e iv) inibição da enzima heme redutase. Estudos também demonstraram que a cloroquina e análogos se ligam covalentemente ao grupamento heme e sugerem que o complexo hemocloroquina pode ser tóxico para a membrana parasitária (Vangapandu *et al*., 2007; Kimura *et al*., 2013).

A cloroquina é uma molécula lipofílica que atravessa facilmente a membrana plasmática por difusão passiva. Quando administrada por via oral, a molécula é rapidamente absorvida e apresenta biodisponibilidade de 75-80%. Devido às suas características físico-químicas, a cloroquina é amplamente distribuída e acumulada nos tecidos, com tempo de meia-via de 3-6 dias em humanos (Cooper, 2008). O mecanismo de ação destas 4-aminoquinolinas sugere, juntamente com evidências da sua ação terapêutica, de que estas moléculas são efetivas no tratamento de infecções causadas por microrganismos intracelulares capazes de se multiplicarem em vacúolos acidificados, como bactérias e fungos (Rolain *et al*., 2007).

Figura 4. Estrutura molecular da cloroquina.



Fonte: Adaptado de PubChem - Chemistry and biological activity database at the U.S. National Institutes of Health (NIH). (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Estudos anteriores já demonstraram que o tratamento com cloroquina inibiu a multiplicação de *Legionella pneumophila* em células mononucleares infectadas (Byrd *et al*., 1991) através do mecanismo de redução da disponibilidade de íons ferro para o microrganismo. Associado a isto, sabe-se que a aquisição de íons ferro é de extrema importância para a manutenção da viabilidade da *Leishmania* spp. e para a sua multiplicação no interior do vacúolo parasitóforo (Huynh *et al*., 2006).

Baseado no supracitado, observa-se a potencialidade da aplicação desse fármaco frente a diversas patologias, dentre elas a leishmaniose, logo, essa poderia ser uma estratégia viável para acelerar a pesquisa no tratamento da leishmaniose (Ekins *et al*., 2011).

Outros pesquisadores realizaram alguns trabalhos com cloroquina e *Leishmania* spp. Nesse contexto, Hanif *et al*. (2016), compararam a cloroquina intralesional *versus* a oral no tratamento da Leishmaniose cutânea, chegando à conclusão de que as duas formas alcançam a cura dessa patologia, todavia, a duração do tratamento e a dose é, consideravelmente, menor na cloroquina intralesional. Malik *et al*. (2019), analisaram 50 pacientes com leishmaniose cutânea, 25 tratados com cloroquina 250 mg duas vezes ao dia por via oral (grupo A) e 25 tratados com doxiciclina 200 mg por via oral (grupo B). O grupo A obteve 100% de eficácia e o grupo B 92%, demonstrando que a doxiciclina oral é tão resolutiva no tratamento de leishmaniose cutânea, como a cloroquina.

Wijnant *et al*. (2017), usaram a combinação de cloroquina e paromomicina em teste *in vitro* e *in vivo* em *Leishmania major* e *Leishmania mexicana*. Esse estudo evidenciou que a terapia combinada desses dois fármacos não foi eficaz, demonstrando uma associação improvável para desenvolvimento pré-clínico futuro. Embora esses dados sejam contraditórios aos estudos de Hanif *et al*. (2016) e Malik e*t al.* (2019), o cenário apresentado nos últimos cinco anos aponta para a necessidade urgente de mais pesquisas e desenvolvimento científico aplicado envolvendo o reposicionamento de fármacos já usados contra outros protozoários intracelulares, como o *Plasmodium* ssp. para o tratamento e prevenção da leishmaniose (Branco Junior *et al*., 2022). Essa estratégia torna-se mais evidente, quando se constata que a doença envolve lesões em pacientes que apresentam doenças renais e/ou cardíacas que contraindicam o uso do glucantime, anfotericina e pentamidina.

Portanto, dada a importância da discussão de novas alternativas terapêuticas para as leishmanioses e considerando a existência de alguns estudos promissores sobre o uso da cloroquina contra essa patologia, este trabalho teve como objetivo demonstrar o efeito desse fármaco no tratamento tópico e menos invasivo em modelos murinos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparação do Hidrogel e do Filme

As formulações empregadas neste estudo (o hidrogel e o filme) foram desenvolvidas com a colaboração do Dr. Luiz Alberto Kanis, diretor de Pesquisa e Desenvolvimento da Airela Indústria Farmacêutica Ltda. A produção dessas formulações ocorreu em parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO), Campus Porto Velho - CALAMA.

O adesivo transdérmico matricial caracteriza-se por conter uma matriz semissólida, na qual a substância ativa é incorporada na forma de solução ou suspensão. Essa matriz é parcialmente recoberta por uma camada adesiva, que facilita sua fixação e controle da liberação do fármaco ao longo do tempo (Yadav, 2012; Mali, 2015).

O Hidrogel foi sintetizado através da técnica de evaporação de solvente em placas de *Teflon*®, por ser inerte e apresentar baixa aderência aos filmes formados (Kanis, 2005; Parhi; Swain, 2018). O copolímero de poli acrilato metacrilato (Eudragit RS 100, Evonik), o plastificante propilenoglicol (PG), juntamente com a cloroquina 0,68 mg/cm² foram misturados com o solvente de acetona (9 mL), conforme descrito na Quadro 2. A escolha da concentração foi baseada na dose efetiva necessária para a morte de 50% dos parasitas, conforme determinado em estudos prévios sobre a administração intraperitoneal de cloroquina descrito por Rossi *et al.* (2018).

Para o preparo, os reagentes foram pesados e acondicionados em becker de Teflon e, em seguida, foram aquecidos sob constante agitação até que o copolímero estivesse completamente dissolvido. Após, adicionou-se a cloroquina e a solução foi imediatamente transferida para o *Teflon*® (63,585 cm^2), que permaneceu aberta por 24 horas à 24 ºC para completa evaporação do solvente. Após a solidificação, o Hidrogel produzido foi cortado em tamanhos padronizados (1x1 cm²) e adequados à utilização na área do ensaio de permeação.

Para a formulação do filme (Quadro 2), os reagentes empregados foram Eudragit RS 100 e propilenoglicol, que foram previamente pesados e acondicionados em um recipiente de Teflon®. Em seguida, a mistura foi aquecida a 40°C sob agitação contínua até a completa dissolução do copolímero. Como solvente, utilizou-se acetona (Rowe; Sheskey; Quinn, 2009).

Após a dissolução, a solução foi mantida sob agitação por mais dois minutos para garantir a homogeneidade dos componentes nos polímeros. Posteriormente, a solução aquecida foi vertida sobre placas Teflon® (63,585 cm²), material escolhido por sua inércia química e baixa aderência aos filmes formados. O solvente foi evaporado à temperatura ambiente em

capela de exaustão ao longo de 24 horas. As matrizes resultantes foram cuidadosamente removidas e armazenadas em dessecador até o momento de sua utilização (Kanis, 2005).

Quadro 2. Formulação utilizada na produção da matriz em Hidrogel e Filme.

Hidrogel	**Quantidade**
Carragena (CGN) 0,8 %	0,2 g
LBG 0,4%	0,1 g
Propilenoglicol (PPG) 30%	7,5 g
Cloreto de Potássio (KCL) 0,1%	0,025 g
Água (H_2O) 100%	25 mL
Filme	**Quantidade**
Polímero – EUDRAGIT RS 100	60%
Plastificante – Propilenoglicol	40%
Solvente – Acetona	10 mL

3.2. Ensaios de permeação e retenção cutânea

3.2.1 Obtenção e preparo da pele suína

Para a realização dos ensaios de permeação e retenção cutânea, foram utilizadas orelhas de porco (*Sus scrofa domesticus*), adquiridas na cidade de Porto Velho em estabelecimentos comerciais que as disponibilizam para consumo doméstico.

Inicialmente, as orelhas passaram por um processo de higienização com água corrente, seguido de secagem com papel absorvente. Em seguida, os pelos foram removidos com auxílio de uma tesoura previamente esterilizada. A pele foi cuidadosamente separada da cartilagem e qualquer resíduo da camada subcutânea foi eliminado. Durante essa etapa, descartaram-se as regiões que apresentavam danos visíveis, como manchas ou arranhões.

Na sequência, utilizando um bisturi, a pele a ser empregada nos experimentos foi retirada, garantindo-se que não houvesse remoção indesejada de gordura ou cartilagem ao longo do processo. Após essa preparação, as amostras foram recortadas em dimensões padronizadas para os ensaios de permeação *ex vivo*. O material processado foi então acondicionado em filme plástico e papel alumínio e armazenado em congelador, sendo mantido sob essas condições por um período máximo de 30 dias, até sua utilização (Meira, 2010).

3.2.2 Montagem das células de Franz

As amostras de pele suína, previamente preparadas conforme descrito por Meira (2010), foram posicionadas nas células de Franz, garantindo-se o contato adequado com a solução receptora (tampão pH 7,4) e evitando a formação de bolhas de ar. A face externa, correspondente ao estrato córneo, foi orientada para o compartimento doador, enquanto a face interna, representada pela derme, permaneceu em contato direto com a solução receptora, assegurando uma interface homogênea e sem bolhas.

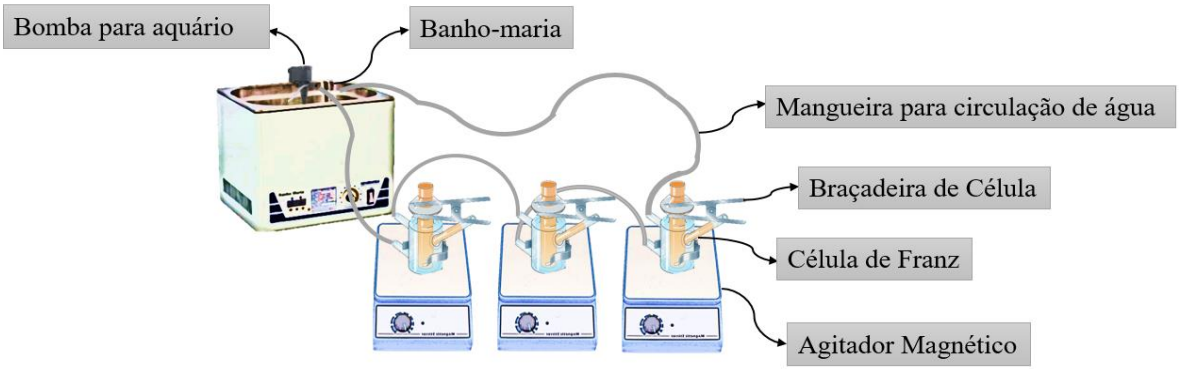
No compartimento doador, foram aplicadas as formulações contendo Hidrogel ou Filme, cada um com dimensões de 1 x 1 cm². A cloroquina foi incorporada à matriz dessas formulações na concentração de 0,68 mg/cm², garantindo sua adequada dispersão no sistema experimental. (Figura 5). Também foram consideradas amostras como controle, aplicando sobre a superfície da pele de porco somente a formulação sem o fármaco.

Figura 5. Visualização da Célula de Difusão de Franz utilizada para os testes de Permeação Cutânea.

Fonte: Fialho (2024).

O sistema foi mantido sob agitação constante (300 rpm) e as células foram mantidas em banho circulante a 35 ºC (Figura 6).

Figura 6. Ilustração do Sistema de Permeação Cutânea



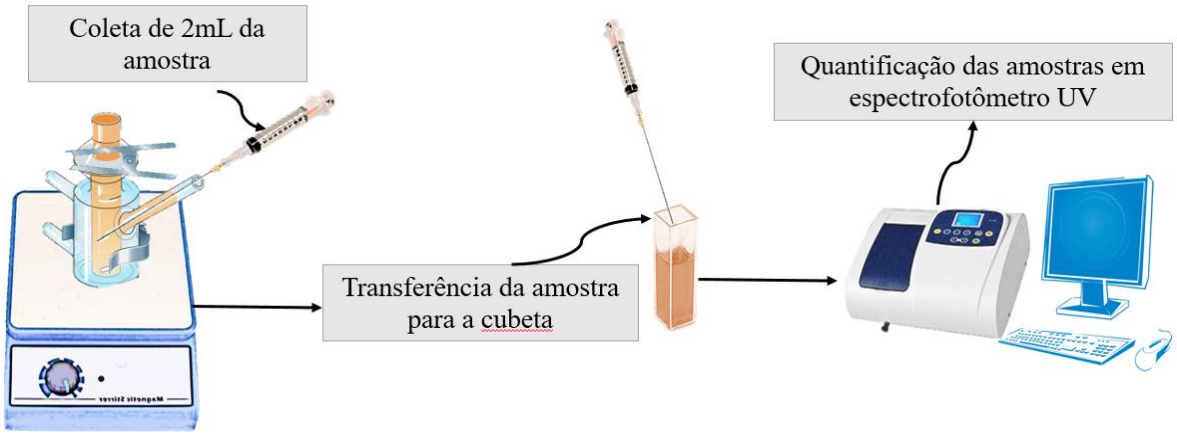
Fonte: Fialho (2024).

3.2.3 Coleta e quantificação das amostras

O comprimento de onda (λ) correspondente à máxima absorção da cloroquina (342 nm) foi determinado por meio de uma varredura espectrofotométrica utilizando um espectrofotômetro Bel, modelo UV-M51. A análise foi realizada dentro do intervalo de leitura de 190 a 1100 nm, empregando uma solução hidroalcoólica composta por 50% de etanol e 50% de água, na concentração de 2 mg/mL da substância. Para a calibração do equipamento, utilizou-se a mesma solução hidroalcoólica, porém sem a presença da cloroquina, como controle branco.

A quantificação das amostras foi conduzida em intervalos de uma hora, sendo coletadas alíquotas de 2 mL da solução receptora a cada ciclo. As coletas foram realizadas em triplicata e analisadas no espectrofotômetro UV-M51 a 342 nm (Figura 7). Como controle de qualidade, também foram testadas formulações de Hidrogel e Filme sem a incorporação de cloroquina, servindo como branco analítico. Após cada leitura espectrofotométrica, o volume correspondente das alíquotas retiradas era imediatamente reinserido no respectivo compartimento receptor da célula de Franz, garantindo a manutenção do equilíbrio experimental.

Figura 7. Esquema ilustrativo da coleta e quantificação das amostras durante o ensaio de permeação cutânea utilizando a célula de Franz.



Fonte: Fialho (2024).

3.2.4 Retenção cutânea *in vitro*

Nesta etapa, as peles previamente utilizadas nos experimentos de difusão foram removidas das células de Franz e submetidas a um processo de limpeza com água destilada para a remoção de eventuais resíduos do Hidrogel e do Filme. Em seguida, as amostras foram secas utilizando papel absorvente, fragmentadas e trituradas com o auxílio de um bisturi.

Os fragmentos de pele foram transferidos para tubos contendo 10 mL de metanol (álcool metílico) e submetidos à agitação em vórtex por 2 minutos para facilitar a extração da substância retida. Posteriormente, as amostras foram processadas em banho ultrassônico por 30 minutos, visando a ruptura celular e a liberação do conteúdo intracutâneo.

O sobrenadante resultante foi filtrado utilizando filtro de seringa PTFE e analisado por espectrofotometria UV a 342 nm, permitindo a quantificação da quantidade residual da substância na pele. O mesmo procedimento foi replicado para amostras de pele que haviam sido expostas ao adesivo controle, contendo apenas a matriz sem o princípio ativo (Adaptado de Sato *et al*., 2007).

As formulações contendo cloroquina (géis e/ou filmes) foram incorporados a curativos adesivos antissépticos (Labor Care). Em seguida, os adesivos foram armazenados em câmara climática B.O.D. com uma temperatura média de 24 °C.

Para avaliar a estabilidade da permeação da cloroquina ao longo do tempo, amostras do lote de adesivos produzidos foram analisadas a cada 7 dias, totalizando oito ensaios de permeação *ex vivo* distribuídos ao longo de 42 dias (1º, 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias). Além dos ensaios de permeação, a retenção cutânea também foi avaliada nesses mesmos intervalos, seguindo os procedimentos previamente descritos, com o objetivo de verificar a capacidade de liberação do fármaco pela formulação ao longo do tempo.

3.2.5 Análises estatísticas dos dados *ex vivo*

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando os softwares GraphPad Prism (versão 8.0). Para avaliar diferenças significativas entre os grupos experimentais, foi aplicada ANOVA one-way seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Em todas as análises, diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

3.3 Ensaio *in vivo*

3. 2.1 Obtenção dos animais

Este estudo foi conduzido em conformidade com os princípios éticos e normativos estabelecidos pela legislação vigente, incluindo a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ RONDÔNIA, sob o número 2020/04, em 27 de julho de 2020.

Para os experimentos, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com peso corporal variando entre 18 e 20 g, adquiridos no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz).

Os camundongos foram então alocados no Biotério da FIOCRUZ - RO, localizado na rua da Beira, 7671, bairro Lagoa em Porto Velho, Rondônia.

3.2.2 Infecção dos camundongos Balb/c, tratamento e acompanhamento do tamanho da lesão

Antes da indução da infecção, os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal utilizando um barbeador elétrico. A infecção foi realizada por via subcutânea, aproximadamente 3 cm da base da cauda, utilizando promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8), cultivadas *in vitro* em fase estacionária e submetidas a três passagens consecutivas.

Para o preparo da suspensão parasitária, as formas promastigotas foram lavadas em tampão PBS 1x, contados em câmara de Neubauer, e ajustadas a uma concentração final de 1×10^7 parasitas/mL. Como veículo de inoculação, utilizou-se PBS 1x em um volume final de 150 µL (Figura 8) (Godinho *et al*., 2012).

Após a infecção, os camundongos foram monitorados duas vezes por semana para acompanhar o desenvolvimento das lesões. A progressão da infecção foi avaliada utilizando um paquímetro para mensuração da largura e comprimento das lesões, e uma balança digital para registrar o peso corporal dos animais ao longo do experimento.

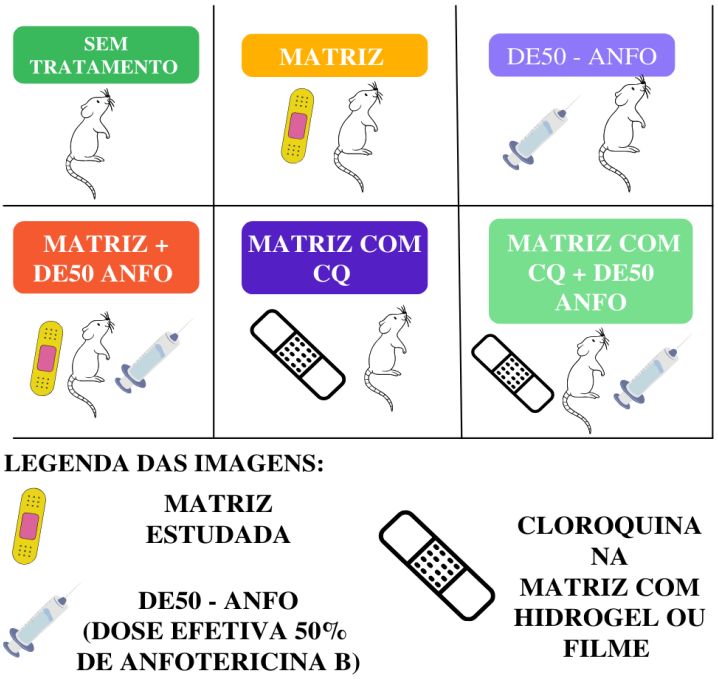
Figura 8. Fluxograma de infecção na avaliação da lesão em Balb/c com *L. (L.) amazonensis*.

Após a progressão da infecção e o alcance de uma área mínima de lesão de 0,3 cm² em 80% dos animais, com a maioria apresentando lesões iguais ou superiores a essa medida, foi iniciado o protocolo de tratamento. Para evitar a remoção dos adesivos, os camundongos foram alocados individualmente e aleatoriamente em caixas separadas. O delineamento experimental incluiu seis grupos de tratamento, conforme ilustrado na Figura 9.

Os adesivos contendo a matriz de hidrogel ou filme foram aplicados diretamente sobre as lesões, sendo mantidos no local por 12 horas diárias, ao longo de 15 dias consecutivos (Figura 11). Durante esse período, os grupos tratados com adesivos permaneceram com as lesões cobertas, exceto nos seguintes casos:

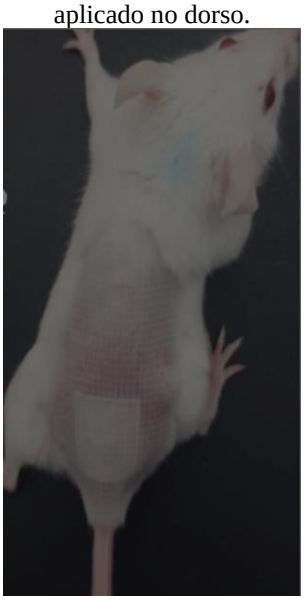
- Grupo Anfotericina (DE_{50} ANFO): recebeu administração da substância por via intraperitoneal, na concentração de 0,63 mg/Kg (DE_{50}), em um volume de 200 µL, totalizando oito doses fixas em dias alternados (adaptado de Wijnant *et al*., 2018).
- Grupo sem tratamento: incluiu animais infectados que não receberam tratamento.

Figura 9. Identificação dos grupos que compuseram o tratamento com adesivo dérmico, tipo hidrogel ou filme incorporado a Cloroquina, associado ou não ao uso de Anfotericina B em *Balb/c* infectados com *L. (L.) amazonensis*.



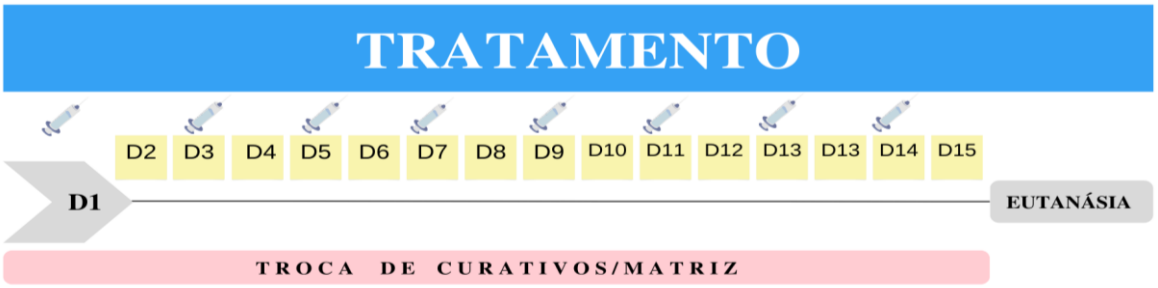
Cada adesivo utilizado nesta etapa do estudo apresentou dimensões de 1 x 1 cm², contendo cloroquina (CQ) incorporada à matriz na concentração de 0,68 mg/cm² (Figura 10). Durante o período de tratamento, os camundongos foram mantidos individualmente em caixas separadas, garantindo controle adequado das condições experimentais.

Figura 10. Camundongo *BALB/c* infectado com *L. (L.) amazonensis* com adesivo contendo matriz do tipo filme aplicado no dorso.



Com o objetivo de prevenir infecções secundárias ao longo do experimento, todas as lesões foram higienizadas com solução salina estéril, tanto antes quanto após a aplicação do tratamento tópico. Esse procedimento foi padronizado e realizado em todos os grupos experimentais, garantindo a integridade das condições experimentais.

Figura 11. Tratamento com a matriz estudada com cloroquina associado ao uso de Anfotericina em DE_{50} em Balb/c.



Após 24 horas da última troca dos adesivos, os camundongos foram submetidos à anestesia intraperitoneal utilizando uma combinação de quetamina/xilazina/morfina nas doses de 50/10/2 mg/kg, respectivamente. Em seguida, aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado da veia cava para posterior análise dos parâmetros bioquímicos.

Na sequência, as lesões dorsais e os linfonodos foram removidos assepticamente e pesados em balança analítica. Parte do tecido da lesão foi destinada à avaliação da retenção cutânea, conforme descrito previamente na Seção 3.2.4 - Retenção Cutânea *in vitro*. Já os demais fragmentos das lesões e linfonodos foram macerados separadamente em meio RPMI completo. Após a maceração, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100 em meio RPMI completo e distribuídas em placas de 96 poços, com um volume final de 200 µL por poço.

Para controle negativo, amostras de pele de dois camundongos saudáveis foram processadas da mesma forma e plaqueadas separadamente.

As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 24 ºC, por um período de sete dias, para posterior quantificação da carga parasitária utilizando o método do AlamarBlue. Para essa análise, 20 µL de AlamarBlue (2 mM) foram adicionados a cada poço, seguido de uma nova incubação em estufa B.O.D. a 24 ºC por cinco horas.

A leitura da fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro Biotek, modelo Synergy, utilizando parâmetros de excitação/emissão de 530/25 nm e 590/35 nm, respectivamente (adaptado de Masic, 2015; Macedo, 2015). A quantificação da carga parasitária foi determinada com base na equação descrita abaixo, onde o controle branco

correspondia ao macerado de pele de camundongos BALB/c saudáveis não infectados. O grupo sem tratamento foi considerado como referência para 100% de viabilidade dos parasitas.

(% dos parasitos vivos) = (Fluorescência teste – Fluorescência Branco)/Peso da lesão X 100/
(Fluorescência do controle – Fluorescência Branco)/Peso da lesão

O sangue coletado dos camundongos foi centrifugado a 1.500 rpm por 15 minutos, permitindo a separação do soro, que foi utilizado para a quantificação dos seguintes biomarcadores bioquímicos:

- Transaminase glutâmica pirúvica (TGP)/ Alanina aminotransferase (ALT)
- Transaminase glutâmica oxaloacética (TGO)/ Aspartato aminotransferase (AST)
- Ureia
- Creatinina

As dosagens foram realizadas por ensaios colorimétricos, utilizando kits comerciais da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, Brasil), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

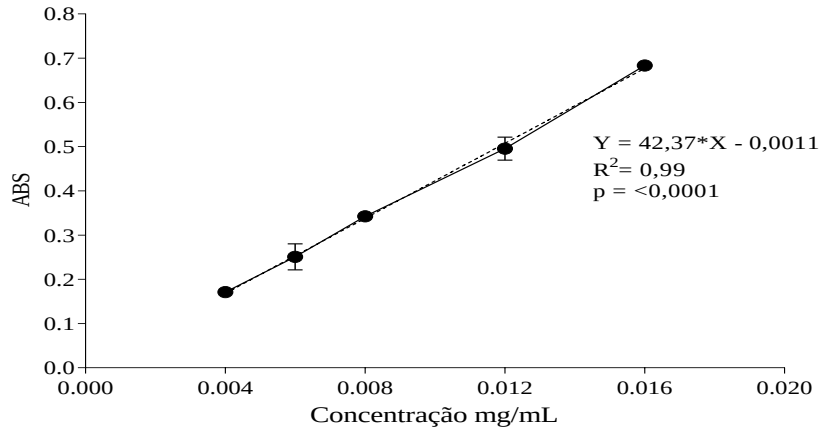
Para a análise estatística dos resultados, os dados foram processados nos programas GraphPad Prism, versão 5.0, e Origin, versão 9.1. A evolução do tamanho das lesões, os níveis séricos bioquímicos (TGO, TGP, ureia e creatinina) e a quantificação da parasitemia foram avaliados utilizando o teste estatístico Two-way repeated measures ANOVA, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey para identificar diferenças significativas entre os grupos. Em todas as análises, foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$, considerando diferenças estatisticamente significativas para valores inferiores a esse limite.

4. **RESULTADOS**

4.1 Perfil de Liberação

O passo inicial para detectar a Cloroquina (CQ) nas amostras *ex vivo*, foi determinar os valores da absorbância pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta, com a Cloroquina em diferentes concentrações (0,0004 a 0,0016 mg/mL); esse resultado foi demonstrado na Figura 12. Por meio desses valores obteve-se a equação da reta, na qual curva obtida foi f(x) = 42,37 X - 0,0011, com R^2= 0,99, corroborando com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2017). Essa mesma equação foi utilizada para determinar a concentração de CQ permeada. Percebe-se ainda que a reta apresenta tendência linear e crescente, aumentando a absorbância à medida que a concentração da solução aumenta.

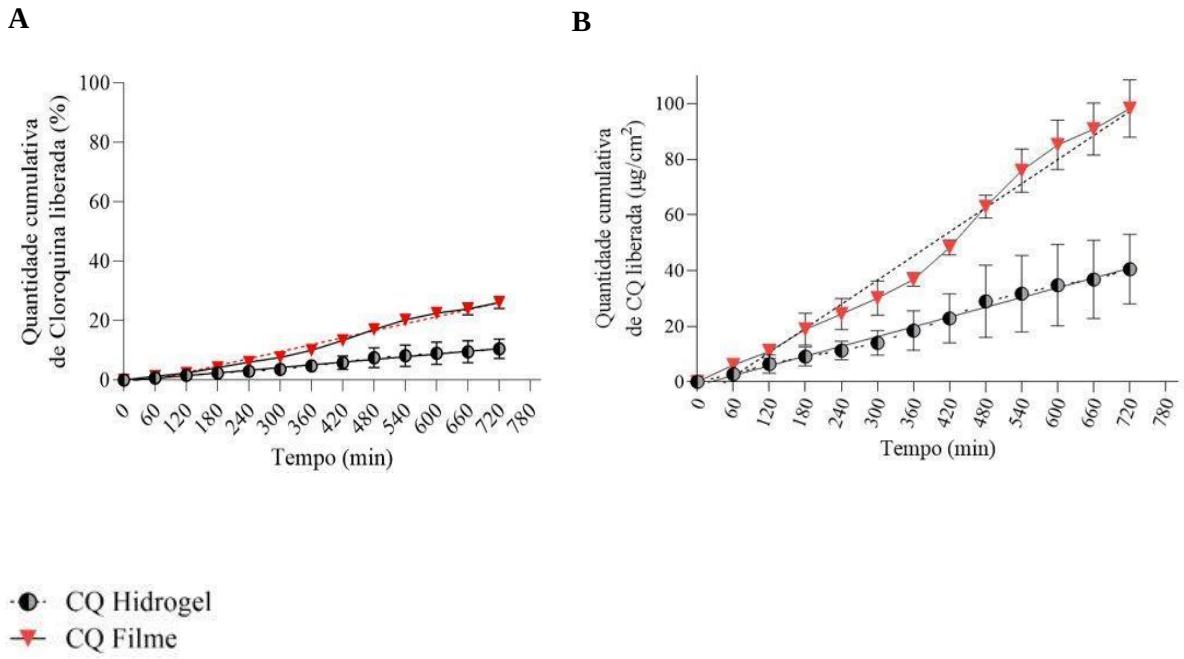
Figura 12. Curva de calibração da Cloroquina obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta



Curva de calibração obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta. Concentração das soluções de 0,0004 a 0,0016 mg/mL de Cloroquina em solução aquosa. Os resultados referem-se à média e desvio padrão (±) de triplicatas de dois experimentos independentes. Leituras efetuadas a 342,0 nm.

O ensaio de liberação foi conduzido para verificar a capacidade das formulações tipo hidrogel e filme de liberar o princípio ativo e a quantidade liberada ao longo de 12 horas, permitindo caracterizar o modelo cinético de liberação. Para esse teste, utilizou-se uma área de liberação de 1,77 cm², contendo 680 µg de CQ (0,68 mg/cm²) incorporada. Conforme demonstrado na Figura 13A, em 12 horas houve liberação de 10,5% da CQ incorporada no adesivo matricial em hidrogel, equivalente a 71,54 µg ou 40,5 µg/cm², conforme observado na Figura 13B, após passagem pela pele de *Sus scrofa domesticus* (porco). Para a matriz filme, observou-se um perfil de liberação mais gradual, com liberação de 26% da CQ incorporada após 12 horas, correspondendo a 98,1 µg/cm².

Figura 13. Perfil de liberação *ex vivo* da Cloroquina (CQ) incorporada na formulação matricial em hidrogel ou filme, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco).



Nota: Perfil de liberação *ex vivo* da Cloroquina (CQ) incorporada na formulação matricial hidrogel ou filme, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco). (A) Percentagem de liberação; (B) Quantidade permeada da CQ em µg/cm^2. A curva foi obtida pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta, no qual as leituras foram efetuadas a 342,0 nm. Os gráficos referem-se à média e desvio padrão (±) de triplicatas de um experimento.

4.2 Retenção de cloroquina na pele após 12 horas

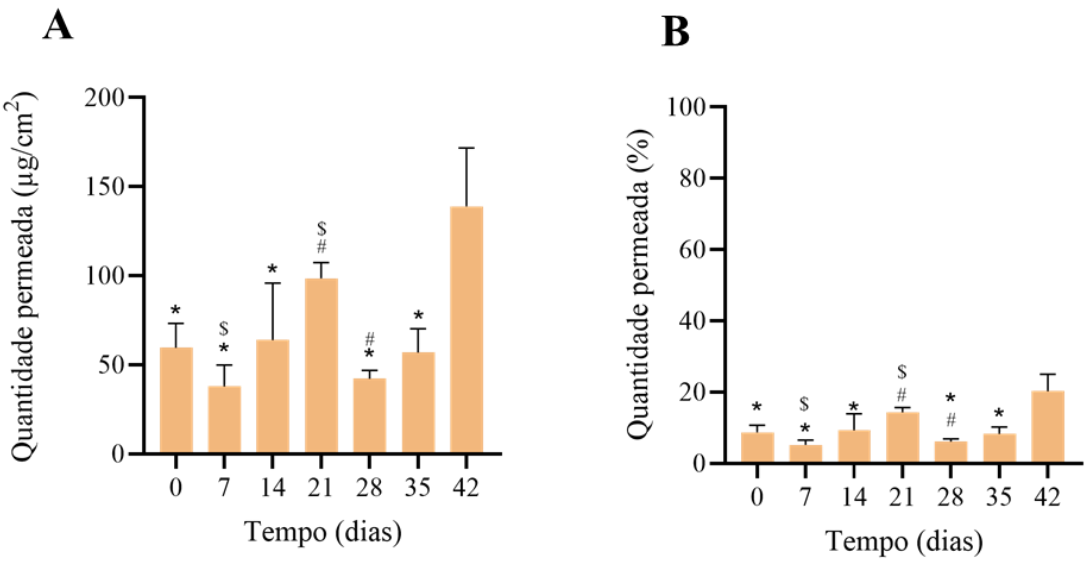
Após o contato da pele de porco com a formulação do tipo hidrogel e filme contendo a CQ, por 12 horas, foi observada a retenção cutânea do fármaco após a extração direta em metanol. Os resultados da tabela 1, demonstraram que a quantidade de CQ retida na pele foi de 51,19 µg no após exposição do hidrogel e no filme 34,82µg. Esse resultado sugere que no tempo mínimo de exposição dos adesivos nos modelos animais, ou seja, 12 horas, haverá liberação do fármaco na derme.

4.3 Avaliação longitudinal da permeação e retenção da Cloroquina nas formulações com matriz Hidrogel e Filme

Visando avaliar a durabilidade da formulação desenvolvida bem como a qualidade de liberação da CQ, realizou-se os mesmos ensaios de permeação e retenção cutânea em amostras armazenadas durante o período de 42 dias.

Para os adesivos com a matriz do tipo hidrogel contendo cloroquina, observou-se que o perfil de liberação manteve constante até o 35º dia (variando de 5,2% a 14,38%), havendo diferença estatística somente na formulação testada no 7º dia (liberação de 5,2%) em relação ao 21º dia (liberação de 14,38%) de armazenamento do adesivo (Figura 15, colunas marcadas com $). E no 21º dia (liberação de 14,38%) em relação ao 28º dia (liberação de 6,15%) de armazenamento do adesivo (Figura 15, colunas marcadas com #). Considerando o último dia da análise, 42º dia, o aumento da CQ permeada foi significativo em relação aos dias 0, 7, 14, 28 e 35. Destaca-se que nesse período (42º dia de armazenamento do adesivo) o hidrogel apresentou-se visivelmente menos espesso em relação a matriz inicialmente produzida (tempo zero) (Figura 14).

Figura 14. Análise do perfil de liberação *ex vivo* de cloroquina incorporada na formulação matricial em hidrogel, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) ao longo de 42 dias.

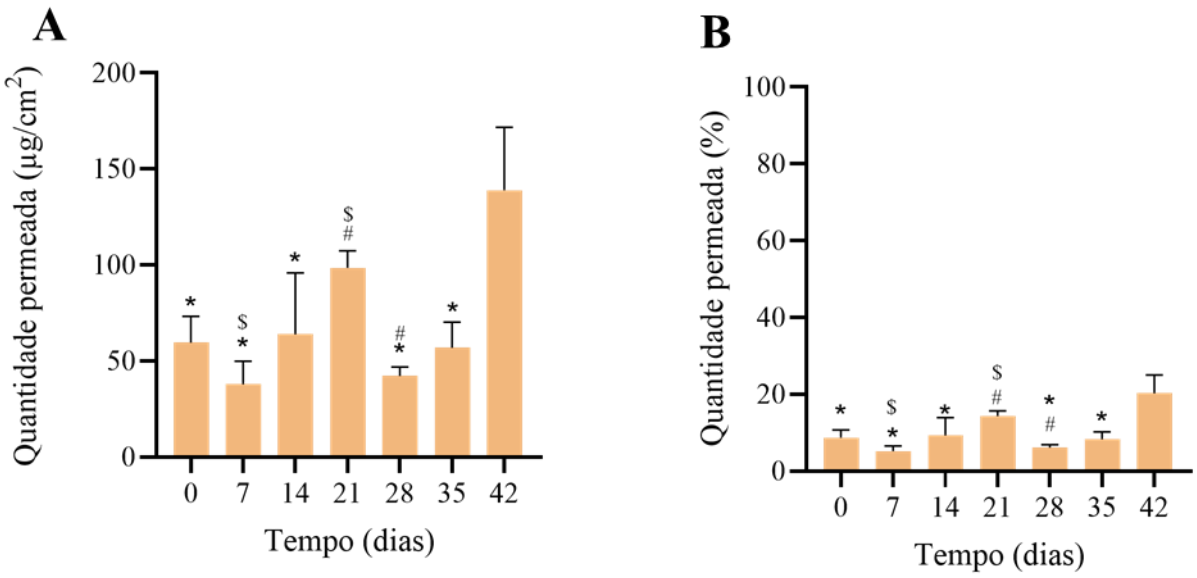


Nota: Análise do perfil de liberação *ex vivo* de cloroquina incorporada na formulação matricial em hidrogel, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) ao longo de 42 dias. Cada triplicata de adesivo armazenado foi exposta ao sistema de célula de Franz e a quantidade permeada após 12 horas foi expressa nessa Figura. (A) quantidade cumulativa permeada em µg/cm^2; (B) quantidade cumulativa permeada em porcentagem. 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 dia 42. Colunas marcadas com $ e # diferem estatisticamente entre si. Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado Pós-teste de Tukey. Os dados foram coletados pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta, no qual as leituras foram efetuadas a 342,0 nm.

Os gráficos apresentados na Figura 15 ilustram o perfil de permeação *in vitro* da cloroquina ao longo de 42 dias, incorporada em uma formulação matricial em filme e utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) como modelo experimental.

Os resultados mostram que a permeação inicial foi relativamente baixa (9,360% ou 56,877 µg/cm² no 1º dia), aumentando progressivamente até atingir um pico no 28º dia (26,793% ou 162,801 µg/cm²). Após esse período, houve uma redução na permeação, com valores de 11,825% (71,850 µg/cm²) no 35º dia e 6,807% (41,362 µg/cm²) no 42º dia.

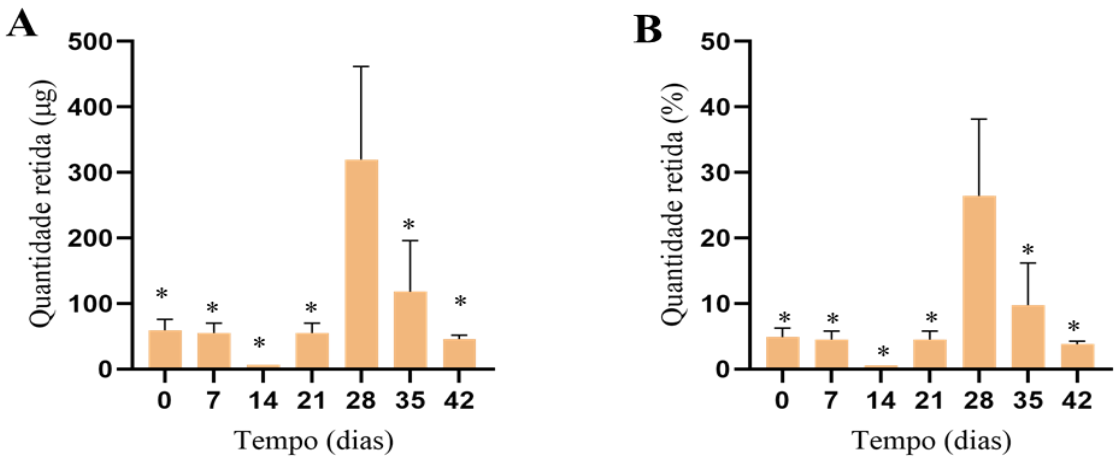
Figura 15. Perfil de permeação *in vitro* da substância Cloroquina ao longo de 42 dias, incorporada na formulação matricial em filme, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco).



Legenda: Dados obtidos pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta, no qual as leituras foram efetuadas a 342 nm. (A) Quantidade cumulativa permeado em µg/ cm^2 pelo tempo (dias). (B) Quantidade cumulativa permeada em porcentagem (%) em relação ao tempo (dias). Os gráficos referem-se à média e desvio padrão (±) de triplicatas de um experimento a cada sete dias durante 42 dias. Foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para $p<0,05$. Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado o Pós-teste de Tukey.

Após o tempo de armazenamento de cada adesivo e execução do ensaio de permeação cutânea, as peles expostas após 12 horas no sistema de célula de Franz foram retiradas, lavadas com água destilada, cortadas, submetidas ao metanol e sonicadas. O produto resultante foi filtrado e posteriormente analisado em espectrometria para demonstração da quantidade de CQ retida na pele de porco. Considerando os resultados das amostras contendo a matriz hidrogel, nota-se que houve retenção em todos os lotes observados (59,196 µg a 46,24 µg), porém há uma maior quantidade de CQ retida quando os adesivos foram armazenados por 28 dias (319,994 µg), ocorrendo diferença estatística entre eles, conforme ilustrado na Figura 16.

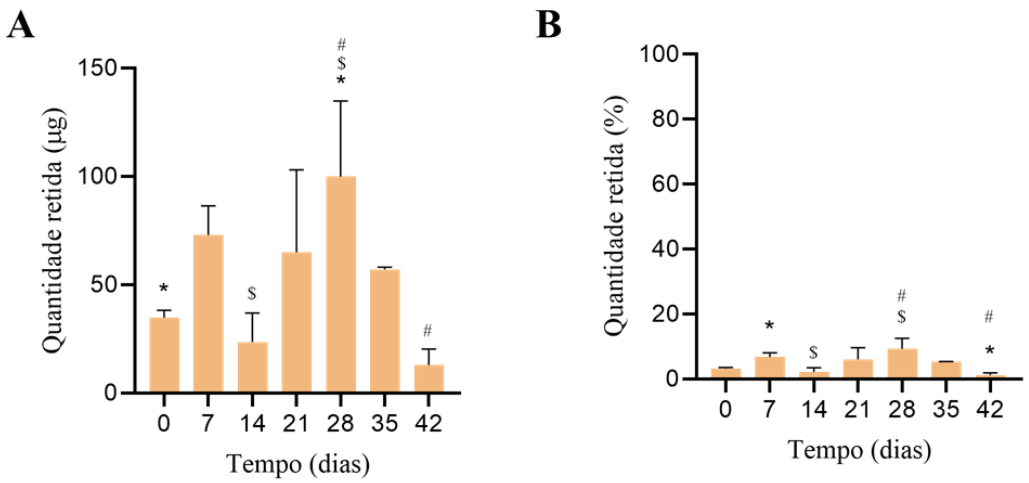
Figura 16. Análise *ex vivo* da quantidade retida de cloroquina incorporada na formulação matricial em hidrogel, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) ao longo de 42 dias.



Nota: Análise *ex vivo* da quantidade retida de cloroquina incorporada na formulação matricial em hidrogel, utilizando pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) ao longo de 42 dias. (A) Quantidade retida na pele de poco em µg em cada dia de experimento. (B) Quantidade retida na pele de porco em porcentagem (%) em cada dia de experimento. 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 dia 28. Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado Pós-teste de Tukey. Os dados foram coletados pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta, no qual as leituras foram efetuadas a 342,0 nm.

Já nos adesivos contendo a matriz filme no ensaio de retenção ocorreu diferença estatística entre o 14º dia (liberação de 2,19%) com o 28º (liberação de 9,31%) dia (Figura 17, colunas marcadas com *), bem como do 28º com 42º dia (liberação de 1,21%) (Figura 17, colunas marcadas com $).

Figura 17. Quantidade da substância Cloroquina proveniente da formulação matricial em filme, retida na pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) após 12 horas de contato.



Dados obtidos pelo método espectrofotométrico direto no ultravioleta, no qual as leituras foram efetuadas a 342 nm. (A) *=. (B) Quantidade retida na pele de porco em porcentagem (%) em cada dia de experimento. Os resultados referem-se à média e desvio padrão (±) de triplicatas de um experimento realizado a cada sete dias durante 42 dias. Foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para $p<0,05$. Colunas marcadas com (*, $, #) diferem estatisticamente entre si. Para as análises de múltiplas comparações foi utilizado o Pós-teste de Tukey.

A retenção da CQ na pele de *Sus scrofa domesticus* variou entre as formulações testadas ao longo de 42 dias (Tabela 1). Os resultados indicam que a formulação em hidrogel apresenta maior capacidade de retenção cutânea da CQ ao longo do tempo, atingindo seu pico de absorção no 28º dia. Em contrapartida, a formulação em filme demonstrou uma absorção mais rápida nos primeiros sete dias, porém com menor retenção total ao final do período de 42 dias.

Esses achados sugerem que a formulação em hidrogel pode ser mais eficiente para sistemas de liberação prolongada, enquanto o filme pode ser mais adequado para uma liberação inicial mais rápida do fármaco.

Tabela 1: Dados comparativos sobre a retenção da cloroquina (CQ) em pele de *Sus scrofa domesticus* (porco) em amostras armazenadas por até 42 dias, após uso do sistema de permeação com célula de Franz.

	Quantidade de CQ (μg) retida na pele	
Tempo de Armazenamento (dias)	Formulação em Hidrogel	Formulação em Filme
1	59,196	34,821
7	55,001	72,95
14	6,675	23,50933333
21	55,001	64,98433333
28	319,994	99,954
35	118,302	57,07166667
42	46,238	12,94166667

4.4 Experimento *In vivo*

4.4.1 Acompanhamento do tamanho da lesão

Durante o tratamento, o tamanho da lesão no dorso dos camundongos Balb/c foi monitorado a cada três dias usando um paquímetro para determinar o diâmetro da lesão. Além disso, houve o registro fotográfico das lesões. O tamanho de cada lesão foi determinado pela obtenção do valor médio entre as direções horizontal e vertical, e a área da úlcera foi expressa em mm^2.

Não foram observadas lesões com características de infecção secundária ou presença de exsudato purulento em nenhum dos grupos analisados. As fotografias representativas dos animais de cada grupo no primeiro e no último dia de tratamento foram apresentadas na Figura 18 e 19.

Figura 18. Imagens de lesões durante o tratamento com Filme contendo cloroquina de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente.

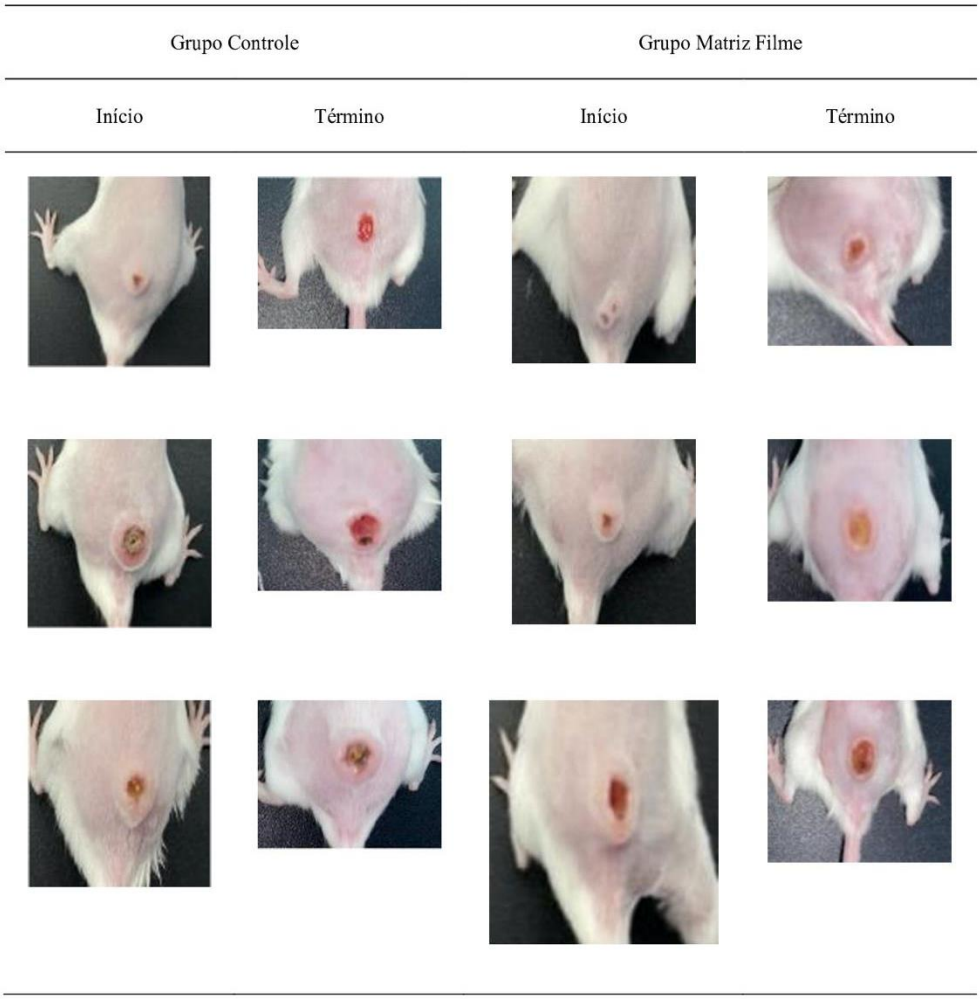


Figura 18. (continua)

Figura 18. (continuação) Imagens de lesões durante o tratamento com Filme contendo cloroquina de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente.

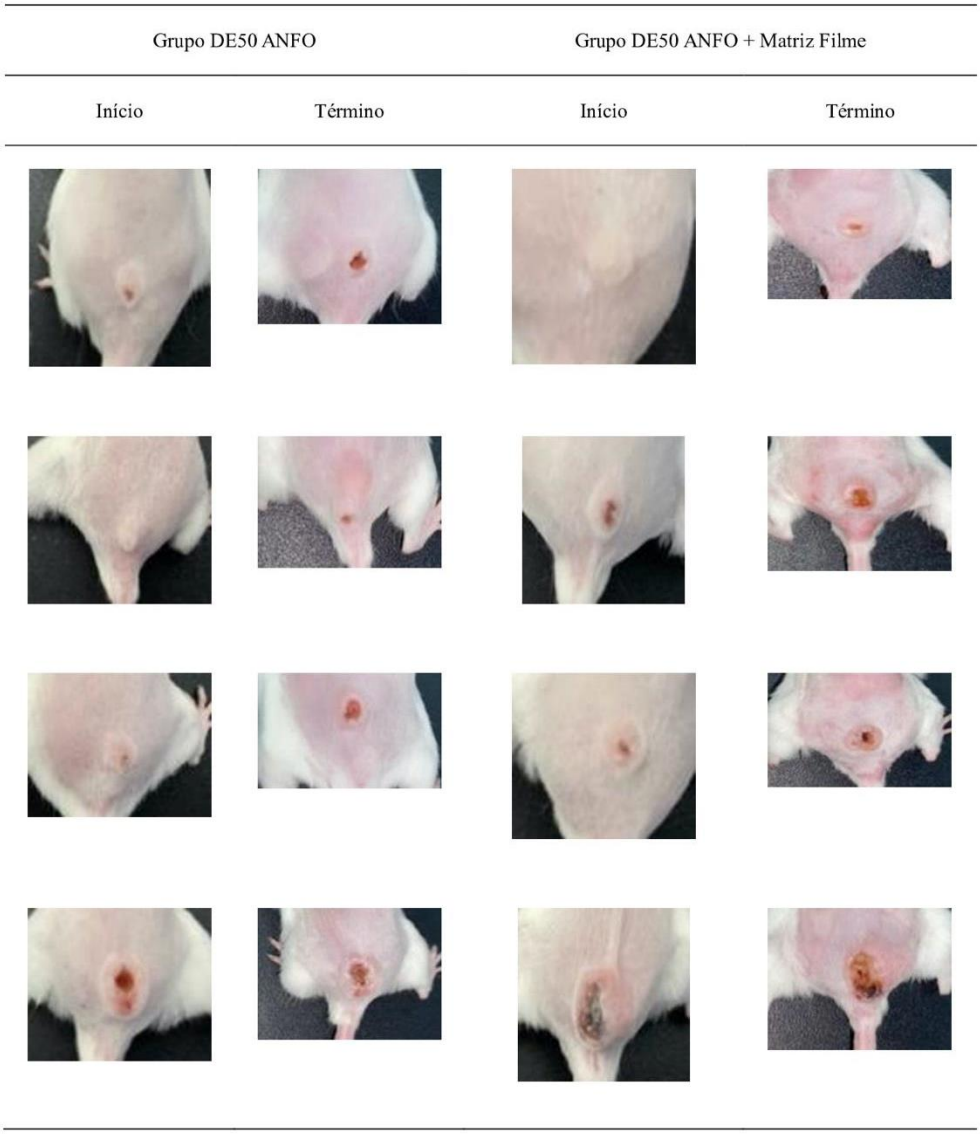
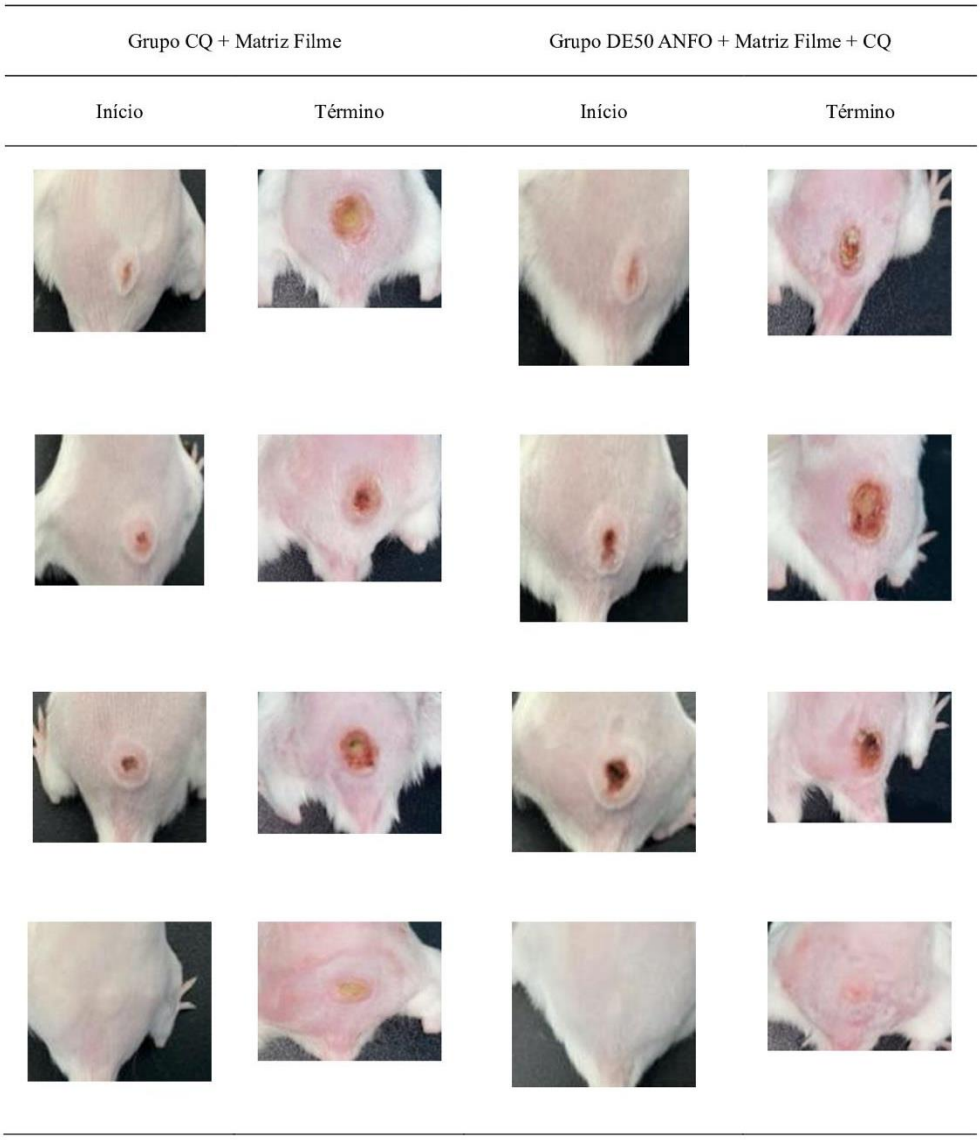


Figura 18. (continua)

Figura 18. (final) Imagens de lesões durante o tratamento com Filme contendo cloroquina de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente.



Grupos de camundongos fêmeas BALB/c infectadas com *L. (L.) amazonensis* no dorso. Grupo controle = Controle infectado e sem tratamento; Grupo Matriz filme = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação filme (via transdérmica); Grupo DE50 Anfo = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal); Grupo DE50 Anfo + Matriz Filme = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação matricial (via transdérmica) + Anfotericina B na concentração de 0.63 mg/kg (via intraperitoneal); Grupo CQ + Matriz Filme = Grupo infectado e tratado com a cloroquina formulada em filme (via transdérmica); Grupo DE50 Anfo + Matriz Filme + CQ = Grupo infectado e tratado com a cloroquina formulada em filme (via transdérmica) + Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal).

Durante o período de tratamento, que se estendeu por 15 dias, foi observado um aumento progressivo do tamanho das lesões no dorso dos camundongos em todos os grupos experimentais. Essa progressão seguiu o curso natural da infecção, independentemente da intervenção terapêutica aplicada.

Figura 19. Imagens de lesões durante o tratamento com hidrogel de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente.

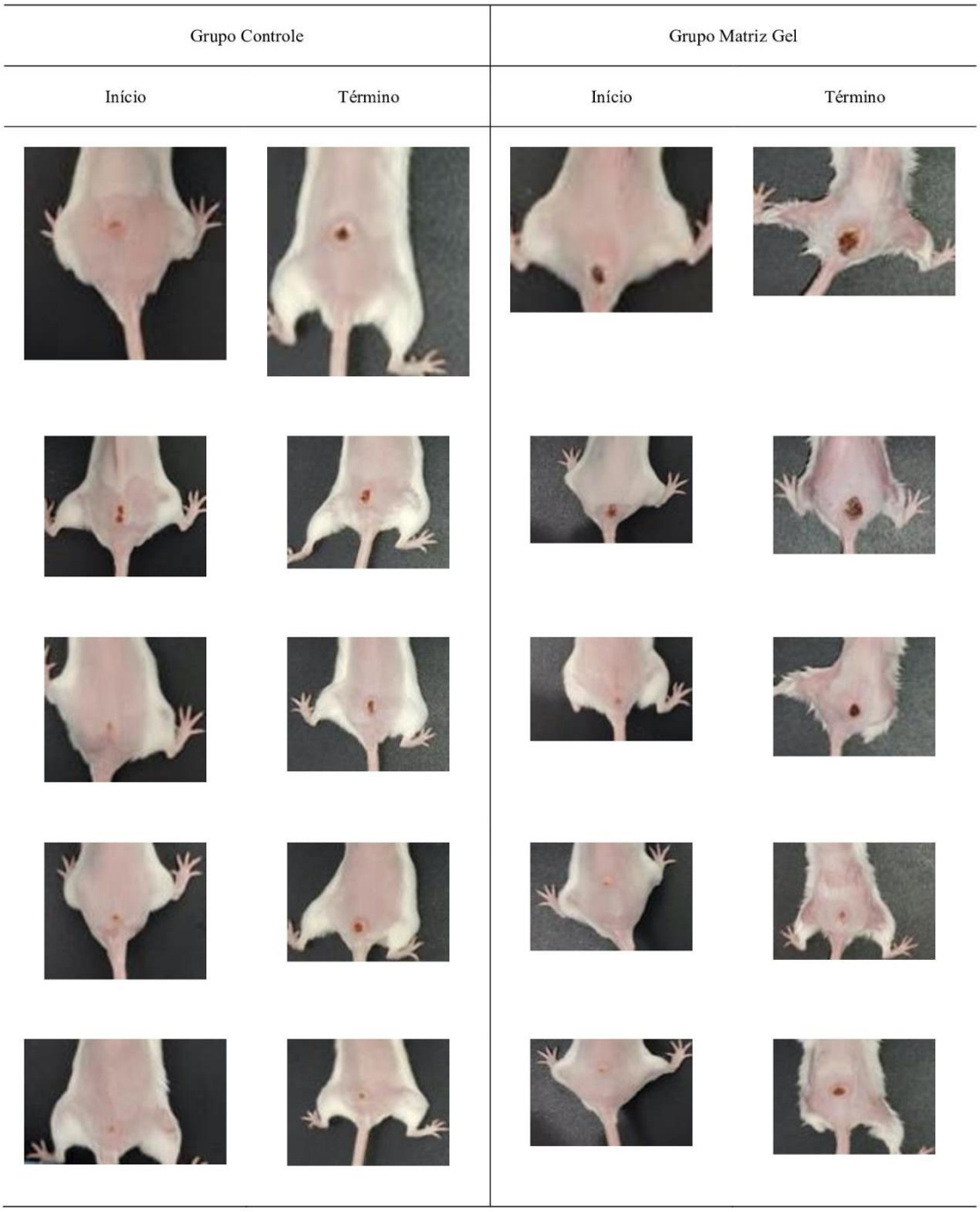


Figura 19. (continua)

Figura 19. (continuação). Imagens de lesões durante o tratamento com hidrogel de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente.

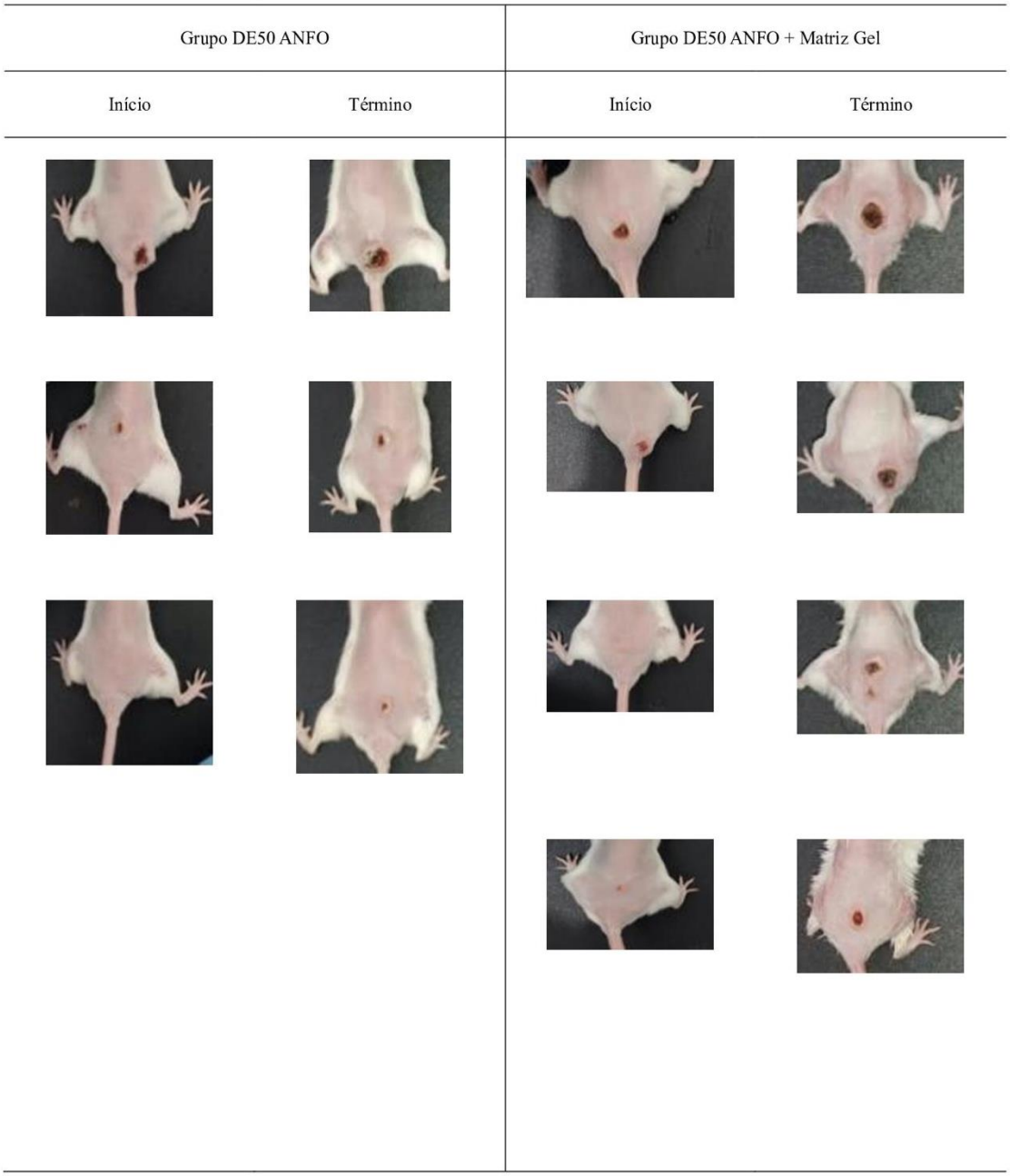
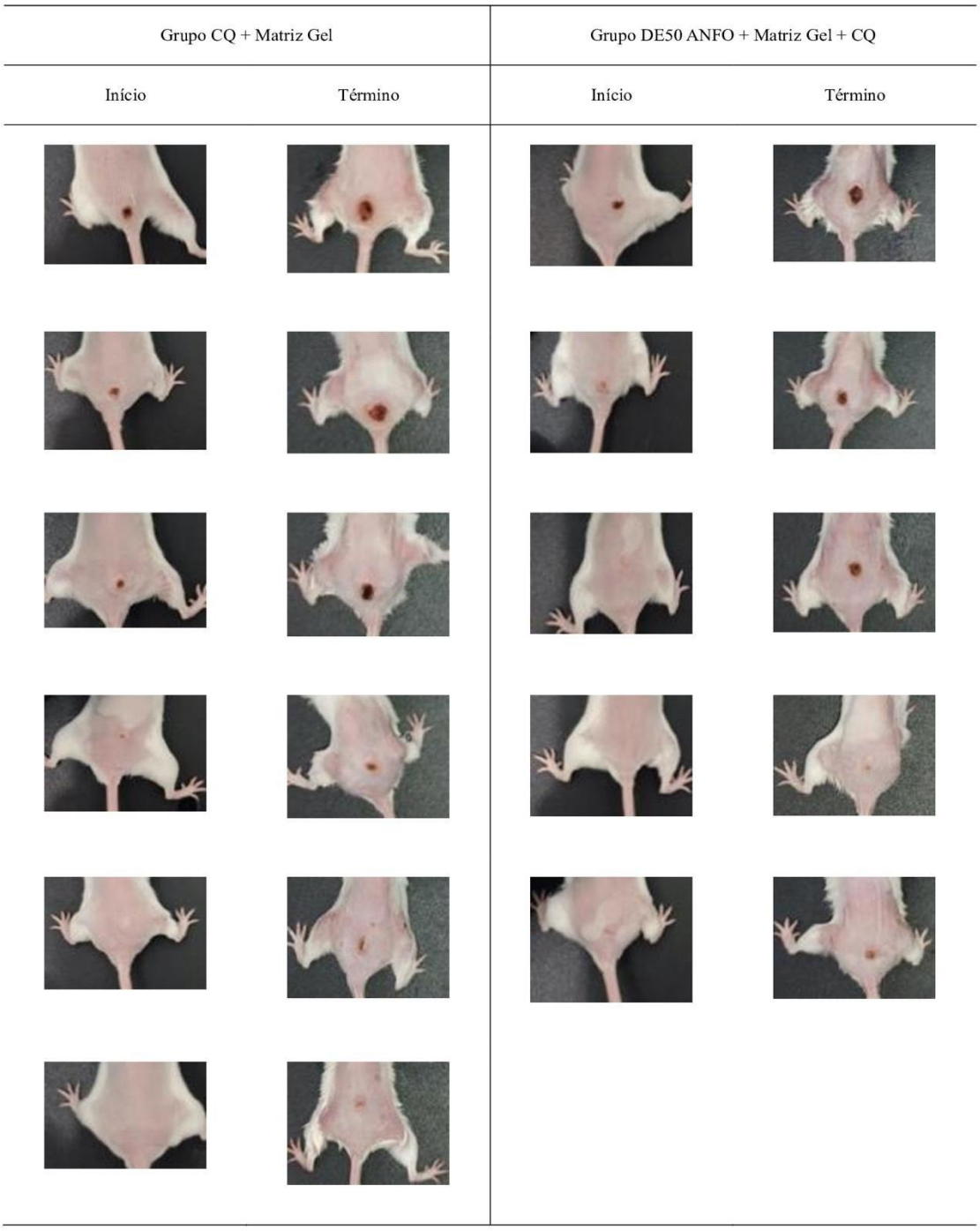


Figura 19.. (continua)

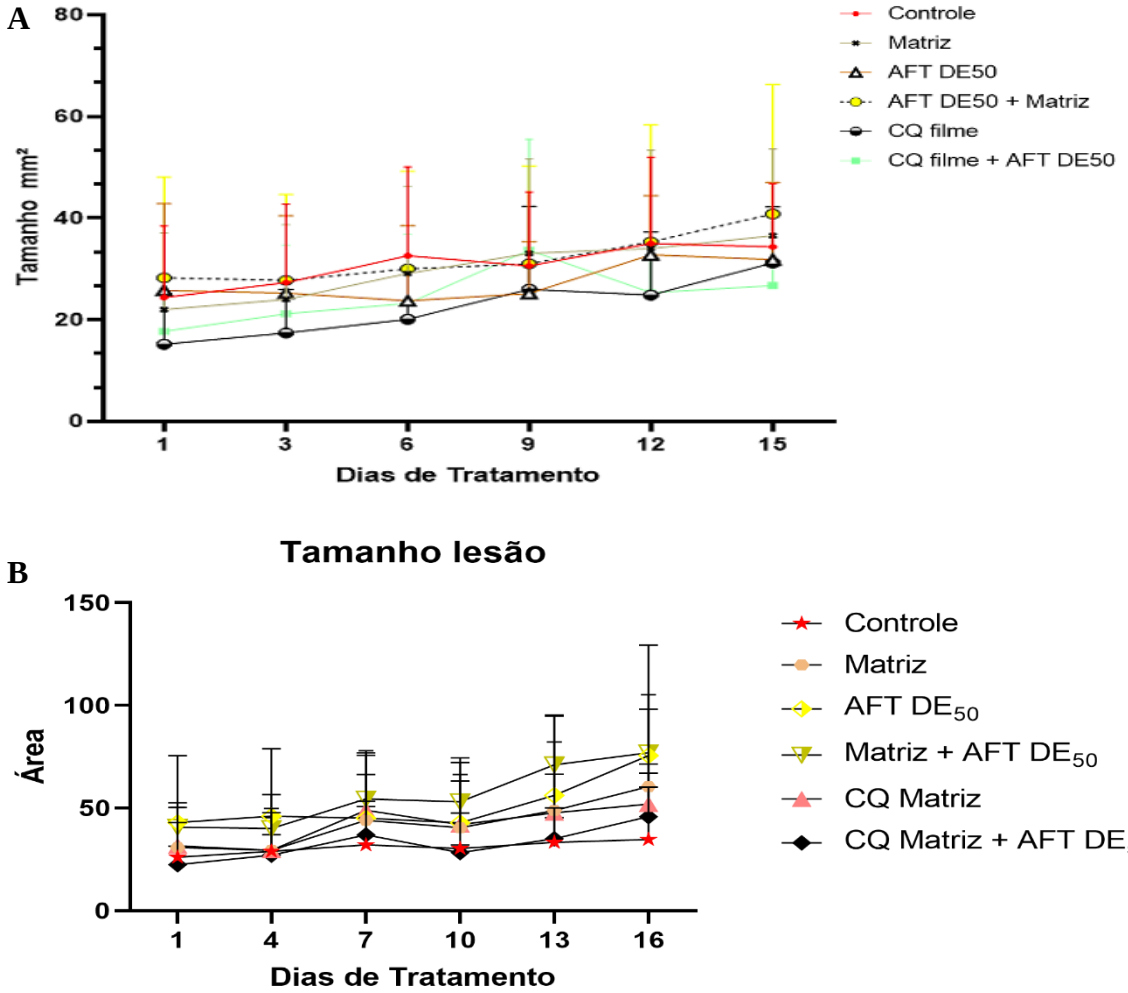
Figura 19. (final). Imagens de lesões durante o tratamento com hidrogel de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*. As fotografias foram tiradas no primeiro e no último dia de tratamento, respectivamente.



Grupos de camundongos fêmeas BALB/c infectadas com *L. (L.) amazonensis* no dorso. Grupo controle = Controle infectado e sem tratamento; Grupo Matriz Gel = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação hidrogel (via transdérmica), Grupo DE50 Anfo = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal), Grupo DE50 Anfo + Matriz Gel = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação matricial (via transdérmica) + Anfotericina B na concentração de 0.63 mg/kg (via intraperitoneal); Grupo CQ + Matriz Gel = Grupo infectado e tratado com a cloroquina formulada em hidrogel (via transdérmica); Grupo DE50 Anfo + Matriz Gel + CQ = Grupo infectado e tratado com a cloroquina formulada em hidrogel (via transdérmica) + Anfotericina B na concentração de 0.63 mg/kg (via intraperitoneal).

A análise estatística revelou que não houve diferenças significativas entre os grupos quanto à evolução da lesão, tanto nos animais tratados com formulações hidrogel e filme quanto nos que receberam Anfotericina B isoladamente ou em associação com cloroquina. Durante o acompanhamento do tratamento *in vivo*, foram avaliados o tamanho das lesões e o peso corporal dos animais nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados, conforme demonstrado na Figura 20.

Figura 20. Tamanho médio das lesões do dorso dos camundongos Balb/c após inoculação de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não com CQ em formulação matricial tipo Filme (A) e Hidrogel (B) e anfotericina (AFT DE50) via intraperitoneal



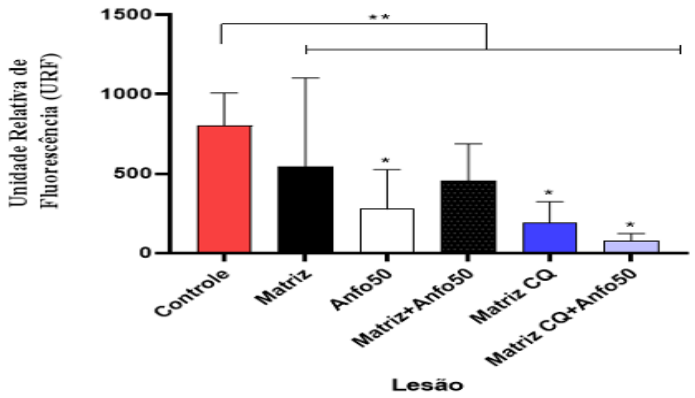
Tamanho médio das lesões do dorso dos camundongos Balb/c após inoculação de *Leishmania (L.) amazonensis* tratados ou não com CQ em formulação matricial tipo hidrogel e anfotericina (AFT) via intraperitoneal. Controle = Grupo infectado e sem tratamento, Matriz = Grupo infectado e tratado com somente com a formulação matricial (via transdérmica), AFT DE_{50} = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal), Matriz + AFT DE_{50}= = Grupo infectado e tratado com a formulação matricial (via transdérmica) + Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal), CQ Matriz= Grupo infectado e tratado com a cloroquina formulada em hidrogel (via transdérmica). CQ Matriz + DE_{50} = Grupo infectado e tratado com a cloroquina formulada em hidrogel (via transdérmica) + Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal).

4.4.2 Quantificação da recuperação de parasitos da lesão do dorso dos camundongos infectados e tratados por via tópica com cloroquina em formulação tipo Hidrogel e Filme

A carga parasitária em animais tratados ou não com a CQ em formulação tipo hidrogel foi avaliada por análise indireta das amastigotas sobreviventes, recuperadas a partir do macerado da lesão em diluição limitante, cuja viabilidade foi determinada por AlamarBlue (Resazurina). A Figura 21 mostra a leitura da Unidade Relativa de Fluorescência (URF) de cada grupo, onde foi visto uma diferença estatística do grupo controle infectado e não tratado em relação a todos os outros grupos experimentais. Também houve diferença significativa entre o grupo de animais tratados com a matriz (Figura 22 “Matriz") e o grupo tratado com Anfotericina na dose DE_{50} (grupo Anfo50) e grupos de animais tratados com a formulação em hidrogel contendo CQ sozinha (Matriz CQ) ou em combinação com a Anfo50 (Matriz CQ+Anfo50).

A diminuição da carga parasitária nos camundongos tratados com a cloroquina tipo hidrogel quando comparado ao grupo controle também foi representada em porcentagem de inibição na Tabela 2, onde se observa que a combinação da aplicação do adesivo com matriz contendo a CQ com Anfo50 resultou na maior taxa de inibição da parasitemia (90,1% ± 5,6), embora não sendo significativo. O tratamento com CQ isolado também apresentou uma eficácia significativa (inibição de 76,3% ± 17,9 quando comparado com o controle sem tratamento).

Figura 21: 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 cloroquina (CQ) em adesivos com matriz tipo hidrogel (via tópica) e da Anfotericina B (via intraperitoneal).



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 cloroquina (CQ) em adesivos tipo hidrogel (via tópica) e da Anfotericina B (via intraperitoneal). Diferenças estatísticas do grupo Controle em relação aos grupos são indicadas pelo símbolo (**). Diferenças estatísticas do grupo Matriz em relação aos grupos são indicadas pelo símbolo (*). Não houve diferença estatística entre o grupo $Anfo_{50}$ e as combinações Matriz+Anfo50 e Matriz CQ+Anfo50. Os dados representam médias aritméticas ± DP (desvio padrão) de 3-6 animais por cada grupo, onde foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para $p<0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tuckey).

Por outro lado, os grupos tratados apenas com a Matriz ou com a combinação Matriz + Anfo50 demonstraram taxas de inibição mais baixas (46,6% ± 39,8 e 43% ± 32,3, respectivamente), evidenciando uma menor eficácia comparativa. O tratamento com Anfo50 isolado exibiu um efeito intermediário, com inibição de 65,6% ± 37,2 (Tabela 2)

Tabela 2: Avaliação da inibição da parasitemia da lesão de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com Anfotericina (via ip) e CQ (via tópica/ matriz tipo hidrogel).

		Lesão	
	Grupos	**Inibição da Parasitemia** (%; ±desvpad)	**n**
A	Controle	-	5
B	Matriz	46,6 ±39,8	6
C	Anfo50	65,6 ±37,2	3
D	Matriz+Anfo50	43 ±32,3	4
E	CQ	76,3 ±17,9	6
F	CQ+Anfo50	90,1 ±5,6	5

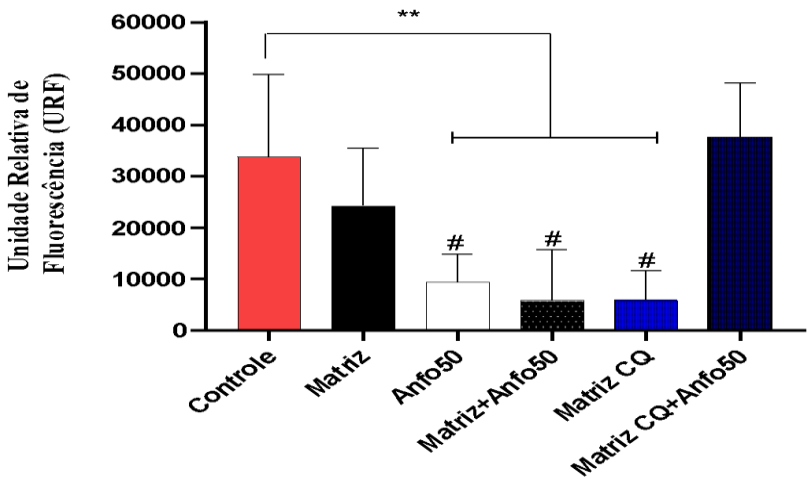
Nota: Controle (A) = Grupo infectado e sem tratamento; Matriz (B) = Grupo infectado e tratado somente com a formulação de hidrogel (via transdérmica); Anfo50 (C) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal); Matriz + Anfo50 (D) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 (via intraperitoneal) e com a matriz de hidrogel; CQ (E) = Grupo infectado e tratado com cloroquina formulada em hidrogel 0,68 mg/cm² (via transdérmica); CQ + Anfo50 (F) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal) e com cloroquina formulada em hidrogel 0,68 mg/cm² (via transdérmica). Os dados foram representados por médias ± DP (desvio padrão) de 3 a 6 animais por grupo.

Nos experimentos *in vivo* utilizando a matriz do tipo filme, observou-se que a aplicação tópica do adesivo tipo filme contendo apenas cloroquina (Matriz CQ) resultou em uma diminuição significativa da carga parasitária em relação ao grupo controle.

A Figura 22 apresenta a Unidade Relativa de Fluorescência (URF) dos diferentes grupos experimentais, permitindo avaliar a eficácia dos tratamentos aplicados. A comparação entre os grupos indica diferenças estatisticamente significativas, conforme indicado pelos símbolos (**) e (#). A Cloroquina administrada por adesivos (Matriz CQ) reduziu a URF, no entanto a combinação de Cloroquina tópica com Anfotericina (Matriz CQ+Anfo50) apresentou um aumento expressivo da fluorescência, sugerindo um possível antagonismo entre os fármacos.

Os dados contidos na Tabela 3 demonstraram que o tratamento com Anfotericina B isolada (Anfo50) reduziu a carga parasitária na lesão, atingindo 72,9% ± 15,5 de inibição, enquanto a combinação Matriz + Anfo50 apresentou um valor ligeiramente maior (83,7% ± 28). Ambos os grupos citados anteriormente não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si (Figura 22). O grupo de animais tratados apenas com a matriz tipo filme sem fármaco obteve um efeito discreto com 38,4% ± 20 de inibição da parasitemia, porém não significativo quando comparado com o grupo controle (Figura 22). A formulação tipo filme contendo a cloroquina isolada (CQ) mostrou uma inibição similar à combinação Matriz + Anfo50, com 83,3% ± 16,6 (ambos com resultados significativos em relação ao controle, Figura 23). No entanto, a associação da formulação tipo filme com Cloroquina e Anfotericina B intraperitoneal (CQ + Anfo50) resultou em apenas 4,11% ± 4,8 de inibição da parasitemia nos animais infectados por *L. (L.) amazonensis*, sugerindo uma interação negativa entre os fármacos.

Figura 22: 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 cloroquina (CQ) em curativos tipo filme (via tópica) e da Anfotericina B (via intraperitoneal).



Legenda: Como controle usou-se animais infectados sem nenhum tratamento (Controle) e infectados e tratados com adesivos contendo somente a matriz utilizada sem adição de fármaco (Matriz). Um grupo de animais foi tratado com Anfotericina na dose efetiva de 50% (DE_{50}) sendo 0,63 (Anfo50); outro recebeu DE_{50} de Anfotericina e foi aplicado o adesivo contendo somente a matriz (Matriz+Anfo50); um outro grupo de animais foi tratado somente com cloroquina em adesivos do tipo filme (Matriz CQ). Foi avaliada a combinação do uso tópico contendo a CQ e administração intraperitoneal de Anfotericina DE_{50} (Matriz CQ+Anfo50). Diferenças estatísticas do grupo Controle em relação aos grupos são indicadas pelo símbolo (**). Diferenças estatísticas do grupo Matriz em relação aos grupos são indicadas pelo símbolo (#). Os dados representam médias aritméticas ± DP (desvio padrão) de 3-5 animais por cada grupo, onde foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para $p<0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tuckey).

Tabela 3: Avaliação da inibição da parasitemia da lesão de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com Anfotericina (via ip) e CQ (via tópica/ matriz tipo filme).

	Lesão	
Grupos	**Inibição da Parasitemia** (%; ±desvpad)	**n**
A Controle	-	3
B Matriz	38,4 ±20	3
C Anfo50	72,9 ±15,5	4
D Matriz+Anfo50	83,7 ±28	4
E CQ	83,3 ±16,6	4
F CQ+Anfo50	4,11 ±4,8	4

Nota: Controle (A) = Grupo infectado e sem tratamento; Matriz (B) = Grupo infectado e tratado somente com a formulação de filme (via transdérmica); Anfo50 (C) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 (via intraperitoneal); Matriz + Anfo50 (D) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de ,0,63 mg/kg (via intraperitoneal) e com a matriz filme; CQ (E) = Grupo infectado e tratado com cloroquina formulada em filme 0,68 mg/cm² (via transdérmica); CQ + Anfo50 (F) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal) e com cloroquina formulada em filme 0,68 mg/cm² (via transdérmica). Os dados foram representados por médias ± DP (desvio padrão) de 3 a 4 animais por grupo.

Em relação a disseminação parasitária nos linfonodos, demonstrada na Tabela 4, observa-se qualitativamente que todos os grupos, seja nos experimentos com formulação da CQ em hidrogel ou em filme, não apresentaram redução total da disseminação de *Leishmania*. Ressalta-se que no experimento utilizando a formulação do tipo hidrogel, quatro grupos experimentais "Matriz", Anfo50, Matriz+CQ e MatrizCQ + Anfo50 tiveram pelo menos um animal sem disseminação detectada. No experimento com o uso da formulação do tipo Filme, todos os linfonodos coletados permaneceram parasitados, com exceção do grupo tratado com a anfotericina intraperitoneal (Anfo50) onde foram encontrados apenas 2 animais com linfonodos aparentes e que foram coletados, sendo que um deles estava parasitado; mostrando assim uma redução parcial da disseminação (1/2)

Tabela 4: Avaliação da disseminação da parasitemia nos linfonodos de camundongos Balb/c infectados por *L. (L.) amazonensis* e tratados com Anfotericina (via ip) e CQ (via tópica).

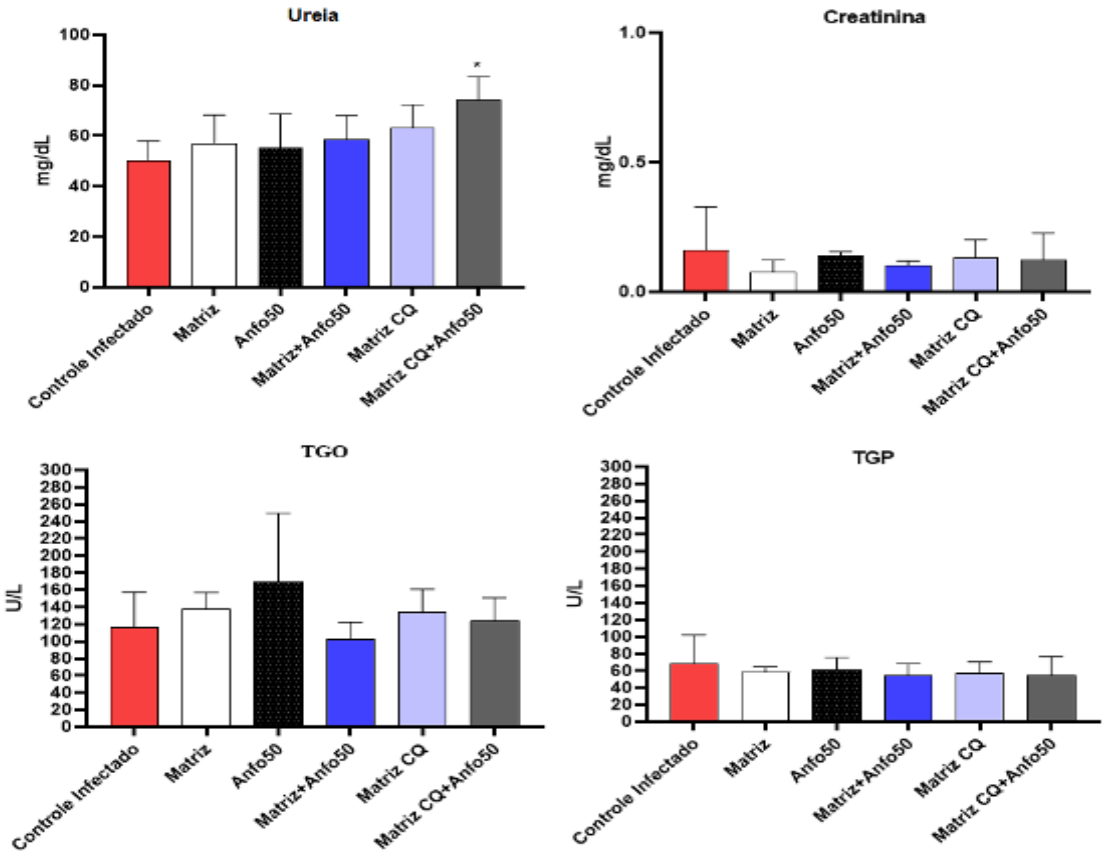
Grupos	Experimento com Formulação Hidrogel Linfonodos		Experimento com Formulação Filme Linfonodos	
	Coletados (n coletados/ n total animais)	**Disseminação** (n disseminado/ n coletados)	**Coletados** (n coletados/ n total animais)	**Disseminação** (n disseminado/ n coletados)
A Controle	5/5	5/5	3/3	3/3
B Matriz	6/6	5/6	3/3	3/3
C Anfo50	3/3	1/3	2/4	1/2
D Matriz+Anfo50	4/4	4/4	4/4	4/4
E Matriz+CQ	6/6	5/6	4/4	4/4
F MatrizCQ+Anfo50	5/5	3/5	4/4	4/4

Nota: Controle (A) = Grupo infectado e sem tratamento; Matriz (B) = Grupo infectado e tratado somente com a formulação de filme (via transdérmica); Anfo50 (C) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal); Matriz + Anfo50 (D) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal) e com a matriz filme; CQ (E) = Grupo infectado e tratado com cloroquina formulada em filme 0,68 mg/cm² (via transdérmica); CQ + Anfo50 (F) = Grupo infectado e tratado com Anfotericina B na concentração de 0,63 mg/kg (via intraperitoneal) e com cloroquina formulada em filme 0,68 mg/cm² (via transdérmica). Os dados foram representados por médias ± DP (desvio padrão) de 3 a 4 animais por grupo.

4.4.3 Análise bioquímica *in vivo*

Em relação à análise bioquímica através do soro dos animais, não se observou diferença estatística entre os grupos quando as enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase -TGO, alanina aminotransferase - TGP) bem como a creatinina foram detectadas. Já quanto a ureia (marcador da função renal), ocorreu diferença estatística do grupo tratado com a matriz Hidrogel + Anfotericina de 50 quando comparada aos demais grupos (Figura 23).

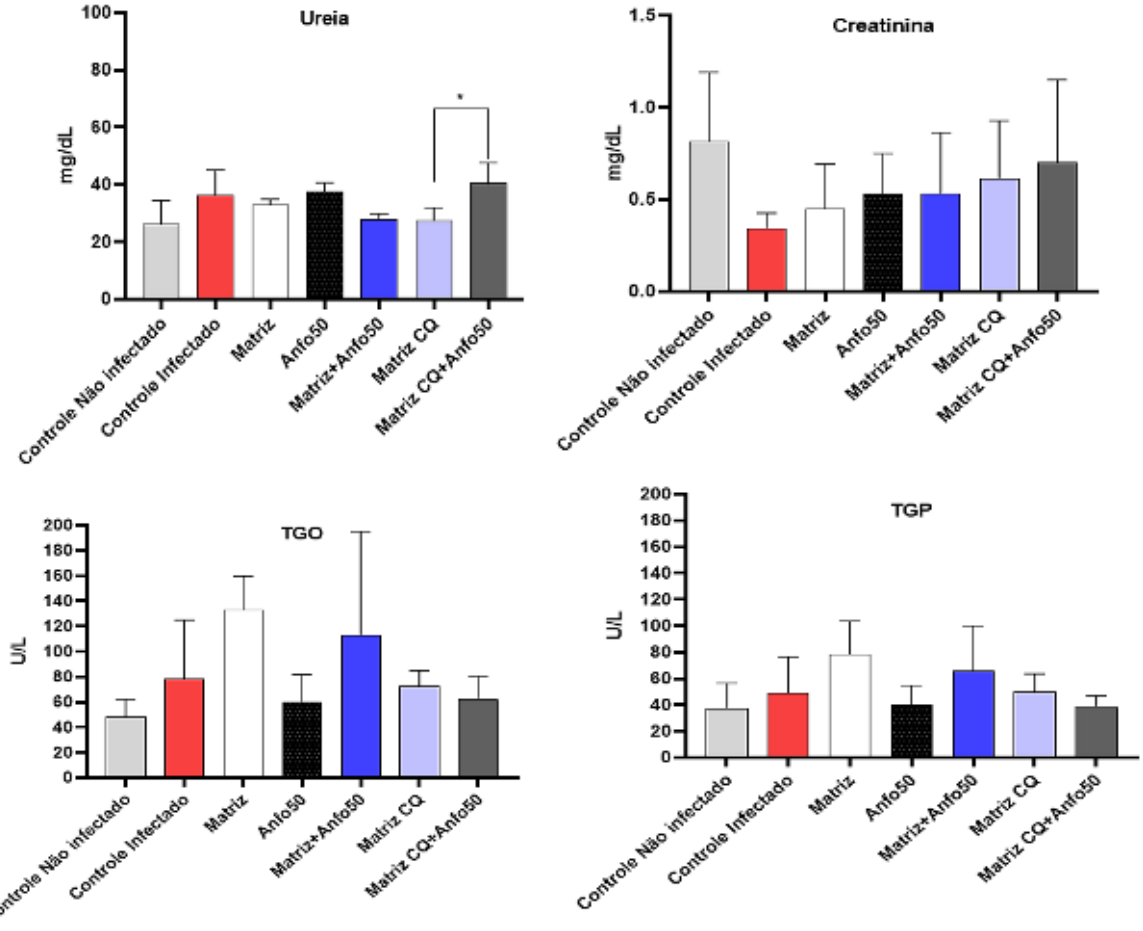
Figura 23: Concentrações séricas da ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) de animais Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados e não tratados com CQ em matriz do tipo hidrogel e Anfotericina.



Legenda: 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 CQ em matriz do tipo hidrogel e AFT. Os níveis séricos foram representados por médias ± DP (desvio padrão) de 3-6 animais por cada grupo. Foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para $p<0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tuckey). Diferenças estatísticas do grupo Controle em relação aos grupos são indicadas pelo símbolo (*).

No ensaio *in vivo* envolvendo o uso de adesivos com matriz do tipo filme, também não foi observada diferença estatística entre os grupos para todos os parâmetros avaliados, com exceção do parâmetro ureia quando comparamos o grupo Matriz filme com CQ e Matriz filme com CQ + Anfo50 (Figura 24).

Figura 24: Concentrações séricas de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (TGO), alanina aminotransferase (TGP) de animais Balb/c infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados e não tratados com CQ em matriz do tipo filme e Anfotericina.



Legenda: Os níveis séricos foram representados por médias ± DP (desvio padrão) de 3-4 animais por cada grupo. Foi realizada análise estatística, ANOVA One-Way, com determinação do nível de significância para $p<0,05$, através de comparações múltiplas (teste de Tuckey). Não se observou diferença estatística.

5. **DISCUSSÃO**

A leishmaniose cutânea localizada corresponde ao surgimento de lesão eritematosa que evolui para úlcera indolor, identificada principalmente em áreas expostas da pele (Gomes *et al*., 2014) e há mais de 60 anos o Antimoniato de meglumina (AM), é o tratamento sistêmico para todas Leishmaniose Tegumentar. O medicamento é altamente tóxico e tem apresentado taxas de cura cada vez menores, provocando a apresentação de efeitos colaterais adversos e podendo causar falha terapêutica, por não atingir a cura clínica (Guerra *et al*., 2015).

Baseado nessa premissa, estudos que envolvam novos fármacos como opção de tratamento para LC é de suma importância para saúde coletiva de locais com alta prevalência, como as cidades do Norte do país. Nesse contexto, o presente trabalho buscou investigar a cloroquina, já dita como uma droga promissora contra leishmaniose (Hanif *et al.*, 2016; Malik *et al*., 2019; Rossi *et al*., 2024); porém o diferencial desse estudo é que a abordagem foi feita por meio de aplicação tópica, sendo as formulações estudadas o hidrogel e o filme.

Importante destacar que a administração de medicamentos através da pele tornou-se uma via importante no tratamento de doenças dermatológicas e de algumas doenças sistêmicas (Bertoline, 2009; Vieira, 2013; Shahzad *et al.*, 2015), além de apresentar inúmeras aplicações biomédicas, tais como materiais odontológicos, oftalmológicos, sistemas de administração de fármacos, implantes e engenharia de tecidos (Benamer *et al*., 2006). Essas aplicações já conhecidas corroborou o foco principal dessa pesquisa, que foi a utilização de uma formulação em Hidrogel e filme para ser utilizada contra LC em tratamento diretamente na lesão.

O uso de hidrogéis na permeação cutânea tem se mostrado uma estratégia eficaz para a liberação controlada de substâncias ativas, permitindo uma absorção gradual e prolongada ao longo do tempo (Ahmed, 2015). Neste estudo, foi observado que o hidrogel utilizado liberou o princípio ativo de forma sustentada por 12 horas, mantendo um perfil de liberação constante até o 35º dia de armazenamento, variando entre 5,2% e 14,38%. Esses achados evidenciam seu potencial como um sistema eficiente de entrega transdérmica. Importante destacar que no 42º dia ocorreu um aumento considerável da permeação quando comparado aos demais dias, podendo este fato ter ocorrido por diminuição da espessura do hidrogel.

Essa tendência também foi observada na análise da retenção da CQ em pele de *Sus scrofa domesticus* ao longo de 42 dias de armazenamento, comparando duas formulações: hidrogel e filme. No primeiro dia, a retenção da CQ no hidrogel foi de 63,02 µg, enquanto na formulação em filme foi de 56,87 µg, apresentando valores iniciais semelhantes. Com o passar

do tempo, no entanto, a retenção da CQ no hidrogel aumentou progressivamente, atingindo seu pico aos 42 dias (245,43 µg), enquanto a formulação em filme apresentou um perfil oscilante e uma retenção final inferior (41,36 µg). Esses dados reforçam que o hidrogel não apenas mantém um perfil de liberação mais sustentado, mas também favorece a retenção prolongada do fármaco na pele, diferindo da formulação em filme, que promove uma liberação mais rápida e com menor acúmulo final. Essa diferença pode estar associada às propriedades físico-químicas dos sistemas de liberação.

A diferença físico-química entre as matrizes de hidrogel e filme está principalmente na sua composição e estrutura, impactando diretamente a liberação do princípio ativo e a permeação cutânea. O hidrogel, por ser altamente hidratado e apresentar uma estrutura mais porosa, favorece uma liberação mais rápida e maior permeação cutânea. Em contraste, os filmes poliméricos, como os formulados com Eudragit, apresentam uma matriz mais compacta, promovendo uma liberação prolongada e controlada do fármaco. O Eudragit é um copolímero amplamente utilizado na formulação de sistemas de liberação controlada de fármacos, sendo empregado em diferentes tipos de formulações, incluindo adesivos transdérmicos (Mutálik; Udupa, 2004; Ofokansi; Kenechukwu; Ogwu, 2015; Akhgari; Tavakol, 2016; Patra *et al*., 2017).

Um exemplo relevante é o estudo de Cunha *et al.* (2016), que avaliou a liberação controlada de diclofenaco de sódio a partir de um dispositivo implantável composto por Eudragit RS 100 e PCL-T. Os autores observaram que a liberação do fármaco seguiu um comportamento bifásico, com uma fase inicial de liberação rápida, seguida por uma fase de liberação sustentada, caracterizada por uma cinética de ordem zero. Esse perfil reforça o papel do Eudragit RS100 na modulação da liberação do fármaco, favorecendo uma difusão prolongada e controlada.

No presente estudo, os dados de retenção da cloroquina (CQ) reforçam essas diferenças entre hidrogel e filme, especialmente em tempos prolongados de armazenamento. Enquanto o hidrogel apresentou uma retenção crescente, atingindo 245,43 µg após 42 dias, a formulação em filme demonstrou um padrão diferente, com uma tendência à estabilização e menor retenção cutânea (41,36 µg após 42 dias). Esse comportamento pode estar relacionado à estrutura menos porosa e mais compacta do filme, que reduz a difusão do fármaco em comparação com a matriz hidrofílica do hidrogel.

Esses resultados reforçam que a escolha entre hidrogel e filme depende da necessidade terapêutica. Para tratamentos que exigem uma liberação rápida e maior permeação cutânea, o hidrogel pode ser mais adequado. No entanto, para fármacos que demandam liberação

sustentada e controle da absorção, como no caso do filme com Eudragit RS100, essa abordagem pode ser mais vantajosa para modular a dose e minimizar efeitos adversos.

Importante salientar que a eficácia da administração transdérmica está diretamente relacionada à seletividade natural da pele, que impõe barreiras à permeação de moléculas. Para que um fármaco consiga atravessar o estrato córneo e atingir a circulação sistêmica, é essencial que apresente características físico-químicas adequadas, como um coeficiente de partição (logP) entre 1,0 e 4,0 (Bhowmik *et al.*, 2013; Soares *et al*., 2015; Rodrigues *et al*., 2021). Nesse contexto, Branco Junior *et al*. (2024) descrevem que a cloroquina possui um coeficiente de partição (logP) de 3,95, o que sugere seu potencial para administração transdérmica. Além disso, os autores ressaltam que seis propriedades físico-químicas devem ser consideradas para a biodisponibilidade de fármacos: lipofilicidade, tamanho molecular, polaridade, solubilidade, flexibilidade estrutural e saturação.

Em uma breve elucidação, os sistemas de entrega transdérmica de fármacos ou 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). Além disso, os adesivos transdérmicos tem uma manutenção do nível constante do fármaco no plasma sanguíneo, menor número de efeitos colaterais, e melhoria da biodisponibilidade pela evasão de metabolismo hepático de primeira passagem e podem aumentar a adesão do paciente ao tratamento (Dhiman; Gurjeet; Rehni, 2011; Bhowmik *et al.,* 2013), podendo vir a ser uma ótima alternativa para tratamentos de doenças de pele.

Nesse contexto, com a estratégia de tratamento local com adesivos transdérmicos atrelada aos resultados de Amidon *et al*. (1995) que descreveram a cloroquina como altamente solúvel e altamente permeável, surgiu a hipótese de que a cloroquina poderia ser uma droga promissora contra LTA (Hanif *et al.*, 2016; Rossi, 2018; Malik *et al*., 2019; Rossi *et al*., 2024) em testes de permeação cutânea com este fármaco.

Essas formulações farmacêuticas que auxiliam e potencializam o autocuidado bem como a participação do paciente no processo cura, como por exemplo de cicatrização de feridas é muito relevante e tem sido incentivada nos últimos anos (Mendes, 2010). Tal fato reforça a importância deste trabalho com formulações para futuros tratamentos da LC e de patologias com acometimento dermatológico.

Quanto à parasitemia *in vivo*, os resultados obtidos indicam que a CQ na formulação hidrogel apresentou uma inibição significativa da parasitemia (76,3%) quando comparada ao grupo controle. Esse achado reforça o papel do hidrogel como um sistema eficiente para a entrega transdérmica do fármaco em animais Balb/c com leishmaniose cutânea, permitindo uma

liberação mais rápida e facilitando a permeação cutânea, o que pode explicar sua eficácia na redução da carga parasitária.

Quando a CQ no hidrogel foi combinada com Anfo50 (Matriz CQ+Anfo50, Figura 22 e Tabela 2), houve uma inibição ainda maior da parasitemia (90,1% ± 5,6), porém não houve diferença estatística entre as taxas de inibição encontradas no grupo "Anfo50" (65,6% ± 37,2) e as combinações "Matriz+Anfo50" (43% ± 32,3) do tratamento. Essa ação leishmanicida observada nesses três grupos experimentais deve estar relacionada à ação da anfotericina. B que demonstrou um efeito expressivo na redução da carga parasitária, atingindo 65,6% ± 37,2 de inibição; um resultado comparável ao da CQ na formulação hidrogel.

Já a formulação do tipo filme contendo cloroquina isolada apresentou um índice de inibição de 83,3% ± 16,6 da parasitemia dos animais com leishmaniose cutânea, um resultado semelhante ao tratamento da Anfotericina isolada via intraperitoneal (72,9% ± 15,5) e à combinação Matriz + Anfo50 (83,7% ± 28). Esse dado reforça a hipótese de que, apesar da liberação mais controlada da CQ na matriz filme, sua ação terapêutica foi equivalente ao fármaco de referência, demonstrando um perfil de liberação sustentada que mantém a eficácia ao longo do tempo. A matriz do tipo filme sem o fármaco CQ não reduziu significativamente a parasitemia, sugerindo ausência de efeito antiparasitário.

No geral, esses achados indicam que a formulação hidrogel proporcionou maior biodisponibilidade inicial do fármaco, enquanto a formulação filme possibilitou um controle mais prolongado da liberação da CQ, mantendo a eficácia no controle da parasitemia. Além disso, os resultados apontam que a associação da CQ em maior quantidade com a Anfotericina B poderá representar uma estratégia terapêutica promissora, aumentando significativamente a eficácia do tratamento contra *Leishmania*.

Tal achado está em concordância com o estudo de Hanif *et al*. (2016), que comparou a administração de cloroquina por via intralesional e oral no tratamento da leishmaniose cutânea, demonstrando que ambas as vias são eficazes na erradicação da infecção. No entanto, o tratamento intralesional apresentou uma duração significativamente menor em comparação com o tratamento oral, com uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0028$). Além disso, a dose total de cloroquina utilizada foi significativamente menor no grupo intralesional em comparação ao grupo oral, com $p < 0,001$. Esses achados sugerem que a administração intralesional de cloroquina pode ser uma alternativa mais eficiente e econômica no tratamento da leishmaniose cutânea.

De forma semelhante, Rossi *et al*. (2024) observaram que a administração intraperitoneal de cloroquina resultou em uma redução significativa, dose-dependente, da

parasitemia, além de modular a resposta imunológica, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ e TNF-α, o que pode contribuir para a eliminação do parasito.

Os achados deste estudo também corroboram com os resultados de Rocha *et al*. (2013), onde utilizaram diferentes esquemas terapêuticos, administrando cloroquina por via oral na dose de 50 mg/kg/dia durante quatro semanas, bem como a combinação dessa via com a administração intralesional a 1%. Esses achados reforçam o potencial da cloroquina como um agente terapêutico contra a *L. (L.) amazonensis*, especialmente quando associada a outras abordagens para otimizar sua eficácia.

Dada a complexidade da LC, a progressão da lesão deve ser considerada no desenvolvimento de novas formulações. A infecção inicia-se com eritema e inchaço, evoluindo para uma pápula e, posteriormente, um nódulo ulcerado, levando à destruição parcial da camada córnea, epiderme e derme ao longo de 2 semanas a 6 meses (Carneiro *et al*., 2012; Karram *et al*., 2012).

Nesse contexto, os parasitos da LC permanecem na derme, onde são internalizados por macrófagos e células de Langerhans, que os transportam aos linfonodos de drenagem. Esse cenário favorece o uso de formulações tópicas, que podem atingir diretamente o local da infecção. Assim, a administração transdérmica surge como uma alternativa menos invasiva ao tratamento convencional, evitando a metabolização hepática, reduzindo a frequência de doses e permitindo a autoadministração indolor, minimizando os traumas associados à terapia parenteral (Teixeira *et al*., 2013; Silva, 2015; Van Bocxlaer *et al*., 2021)

É importante destacar que já foi observada diminuição de carga parasitária em outros trabalhos que utilizaram adesivos transdérmicos e isso fortalece a importância da presente pesquisa. Foi testada a atividade leishmanicida por meio de adesivos transdérmicos de extrato de *Nigella sativa* na 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).

Além isso, os autores Alexandrino-Júnior e colaboradores (2019) desenvolveram hidrogéis de álcool polivinílico (PVA) contendo Anfotericina B incorporada e foi observado que 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 pertencentes a linhagem derivada de rim do macaco verde.

Quanto ao resultado da matriz filme, nos experimentos *in vivo*, observou-se que a aplicação do adesivo tipo filme contendo apenas cloroquina (Matriz CQ) resultou em uma diminuição significativa da carga parasitária em relação ao grupo controle.

Sob esse viés, Coelho e colaboradores (2021) desenvolveram um sistema de liberação controlada de duas chalconas sintéticas, utilizando nanofibras de álcool polivinílico (PVA). E 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.*

É importante salientar que como na maioria dos casos de leishmaniose cutânea localizada, a epiderme não está presente em decorrência da ulceração, sendo assim, provavelmente a penetração de uma substância na derme pode vir a ser aumentada e entrando 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).

Rossi *et al*. (2024) demonstraram que a CQ exerce um efeito imunomodulador na leishmaniose experimental, contribuindo para o controle da parasitemia sem exacerbar a resposta inflamatória. O tratamento com CQ intraperitoneal resultou no aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-6, TNF-α e IFN-γ, promovendo uma resposta imune efetiva contra o parasito. Simultaneamente, houve um aumento da IL-10, uma citocina anti-inflamatória, que contrabalançou essa ativação imunológica, evitando uma inflamação exacerbada. Esse equilíbrio favoreceu a eliminação do parasito sem gerar danos excessivos ao hospedeiro. Além disso, a terapia combinada com anfotericina B intensificou esses efeitos, reduzindo a parasitemia em 86,06%, reforçando o potencial do reposicionamento da CQ no tratamento da leishmaniose.

Nesse contexto, Branco Junior *et al*. (2024) complementaram esses achados ao descrever, por meio de uma avaliação *in silico*, que a CQ interage com a enzima *Tripanotiona Redutase* (TRLb) de *Leishmania braziliensis*, apresentando um potencial efeito inibitório com um Ki teórico de 4,86 μM, inferior ao do inibidor de referência descrito na literatura (Benson *et al.*, 1992). Como a TRLb é fundamental para o equilíbrio redox do parasito, sua inibição pode comprometer a sobrevivência do mesmo, sugerindo um mecanismo adicional pelo qual a CQ pode atuar na leishmaniose. Esses achados reforçam a necessidade de estudos *in vitro* para confirmar essa atividade enzimática e avaliar seu impacto na viabilidade do parasito, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a leishmaniose cutânea.

A cloroquina é um fármaco com diversos efeitos colaterais, onde o seu uso prolongado pode provocar efeitos tóxicos graves e às vezes irreversíveis como insuficiência hepática

fulminante (FIOCRUZ, 2022) e é possível destacar que durante o experimento não houve diferença estatística em nenhum dos grupos quanto aos níveis de enzimas transaminases que representam importantes marcadores de alterações no fígado (TGO e TGP).

Quanto à anfotericina B, esse fármaco tem como efeitos colaterais o aumento de enzimas hepáticas (FIOCRUZ, 2022) fato este que não ocorreu neste trabalho em nenhum dos grupos avaliados. Nenhum animal morreu durante o tratamento, podendo este fato ser um bom resultado quanto ao sistema de liberação estudado, para assim termos um tratamento de leishmaniose menos invasivo e com menor reação adversa durante seu uso.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo revelaram que as formas farmacêuticas aplicadas no modelo *ex vivo* apresentaram propriedade físico-química desejável que garantiu uma penetração eficiente da CQ na pele. Assim, o equilíbrio hidrófilo-lipófilo pode ser observado nessa formulação, uma vez que foi detectada a permeação cutânea da CQ para o compartimento receptor do sistema de célula de Franz e ao mesmo tempo foi observada a retenção do fármaco na pele.

A potencial aplicação tópica da CQ em formulação hidrogel foi confirmada a partir dos resultados *in vivo* no tratamento por 15 dias de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*. De forma que os animais tratados diariamente com adesivos dérmicos contendo a CQ a 0,68 mg/cm² apresentaram uma inibição de 76,3% da carga parasitária em relação ao grupo controle sem tratamento além de ter sido observados efeitos colaterais mínimos quando analisados os parâmetros bioquímicos séricos TGO, TGP, ureia e creatinina.

A formulação tipo filme contendo cloroquina também demonstrou eficácia no tratamento tópico da leishmaniose tegumentar em modelos murinos infectados por *L. (L.) amazonensis*. Embora não tenha havido redução significativa no tamanho das lesões, a formulação apresentou uma redução estatisticamente relevante da carga parasitária nas lesões (83,3% de inibição), indicando atividade leishmanicida *in vivo*. Esses resultados sugerem que a formulação em filme também pode ser uma abordagem promissora para o tratamento tópico, especialmente ao considerar os benefícios potenciais na adesão ao tratamento e redução de toxicidade sistêmica, apesar de não impedir a disseminação para linfonodos. Isso reforça a necessidade de mais investigações para aprimorar a eficácia e explorar combinações terapêuticas.

Assim, o reposicionamento da CQ para o tratamento de leishmaniose tegumentar é promissor e os resultados aqui apresentados apontam para a necessidade de avanços de mais

ensaios pré-clínicos com maior concentração do fármaco, outras formulações e com outras espécies brasileiras de *Leishmania*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNEW, P.; HOLZMULLER, P.; MICHALAKIS, Y.; SERENO, D.; LEMESRE, J. L.; RENAUD, F. *In vitro* Growth of *Leishmania amazonensis* Promastigotes Resistant to Pentamidine Is Dependent on Interactions among Strains. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 45, n. 6, p. 1928-1929, 2001.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123213000969. Acesso em: 06 Abril 2023.

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.

ALTHAUS, J. B.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, J. T. 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.; AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**. V. 35, n. 7, p.699-705, 2010.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E. M. Imunologia da leishmaniose tegumentar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.** 19, n. 3, p. 173-191, 1986.

BARROS, A. R. A. **Desenvolvimento, caracterização e atividade antifúngica de micro emulsões O/a contendo Anfotericina B**. 2013. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraiba, Campina Grande. 2023.

BENAMER, S.; MAHLOUS, M.; BOUKRIF, A.; MANSOURI, B.; YOUCEF, L. S. Synthesis and characterization of hydrogels based on poly (vinyl pyrrolidone). **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, Argélia, v. 248, n. 2, p. 284-290, 2006. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nimb.2006.04.072. Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168583X06005465. Acesso em: 05 abril 2023.

BENSON, Heather A. E. Skin structure, function, and permeation. **Topical and transdermal drug delivery: Principles and practice**, Singapura, n. 1, p. 1-22, 2012.

BHOWMIK, D.; PUSUPOLETI, K. R.; DURAIVEL, S.; KUMAR, K. P. S. Recent approaches in transdermal drug delivery system. The Pharmaceutical Innovation Journal, v. 2, n. 3, p. 99–108, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar. **Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020.** 2020a. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-casos.pdf. Acesso em: 26 abril 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar (LT)**. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/l/leishmaniose-tegumentar-lt. Acesso em: 26 maio 2022.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br. Acesso em: 9 fev. 2025.

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. Brasília: Ministério da Saúde, 21 dez. 2011. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543. Acesso em: 23 julho 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 26 abril 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Informativa nº 13/2020 – CGZV/DEIDT/SVS/MS**. Orientações sobre o uso da miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar no âmbito do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/estudos-e-notas-informativas/2020/nota-informativa-miltefosina.pdf/view. Acesso em: 23 julho 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.

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

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: Biointerfaces,** v. 198, p. 111390, 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. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 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. **Gazeta médica da Bahia**. n. 79, p. 70-83, 2009.

COSTA, J. M. O uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses. **Acta Amazônica**., v. 23, n. 3, p. 163-172, 1993.

DEN BOER, M. Leishmaniosis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**. v.7, n.5, 2012.

DRUG FOR NEGLECTED DISEASE. **Rumo a uma geração de tratamento para as leishmanioses**. 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf. Acesso em: 27 julho 2022.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **LEISHMANIASIS**. Genebra, 2021. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2022/11/DNDi-Factsheet-Leishmaniasis-2021.pdf#page=4. Acesso em: 27 maio 2023.

DUTRA, C.; BIANCHETTI, P.; STÜLP, S. Avaliação da difusão e permeação cutânea *in vitro* de acetato de hidrocortisona tópica comercial. **Scientia Plena**., v. 9, n. 10, p. 107-202, 2013.

EE, G. C. L.; LIM, C. M.; RAHMANI, M.; SHAARI, K.; BONG, C. F. J. 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, n. 4, p. 2398- 2404, 2010.

FLAIH, M. H. Geographical Distribution of Cutaneous Leishmaniasis and Pathogenesis. **Leishmaniasis: General Aspects of a Stigmatized Disease**, v. 99, 2022.

FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anaesthesia. 3 ed., San Diego: **Academic Press**, 2009.

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. **Journal of immunology research**. v. 2019, 2019.

GALATI, E. A. B. Morfologia e Taxonomia: Classificação de Phlebotominae. **Flebotomíneos do Brasil**. v. 1, p. 23–52, 2003.

GARCIA, F. P.; RODRIGUES, J. H. S.; DIN, Z.; RODRIGUES-FILHO, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; AUZÉLY-VELTY, R.; NAKAMURA, C. V. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase-and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. **Apoptosis**., v. 22, n. 1, p. 57-71, 2017.

GODINHO, J. L. P.; SIMAS-RODRIGUES, C.; SILVA, R.; ÜRMENYI, T. P.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **International journal of antimicrobial agents**, v. 39, n. 4, p. 326-331, 2012.

GOIS, P. S. G. **Cepas TgChBrUD2 e ME49 de Toxoplasma gondii induzem polarização de macrófagos humanos para o perfil M1**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

GOMES, A. C.; SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, M. L. *Aspectos Clínicos da Leishmaniose Mucosa*. **Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine**, v. 15, n. 2, p. 123-130, 2019.

GOMES, C. M.; DE PAULA, N. A.; DE MORAIS, O. O.; SOARES, K. A.; ROSELINO, A. M.; SAMPAIO, R. N. R. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, p. 701-709, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GRANATO, J. T. **Efeito Antileishmanial de Derivados Esteroidais em *Leishmania* sp**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Juiz de Fora, 2017.

GUERRA J. A.; MACIEL, M. G.; GUERRA, M. V.; TALHARI, A. C.; PRESTES, S. R.; FERNANDES, M. A.; DA-CRUZ, A. M.; MARTINS, A.; COELHO, L. I.; ROMERO, G. A.; BARBOSA, M. D. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 48, p. 12-19, 2015.

GUIMARÃES, F. H.; SILVA, A. P.; MELO, R. C.; et al. **Leishmaniose Tegumentar Difusa: Revisão e Atualização**. Revista Brasileira de Medicina Tropical, v. 53, n. 4, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-053-2020.

HAMIDIAN, H.; TAVAKOLI, T. Preparation of a new Fe3O4/starch-g-polyester nanocomposite hydrogel and a study on swelling and drug delivery properties. **Carbohydrate polymers**, v. 144, p. 140-148, 2016.

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 leishmaniosis. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 81, p. 533-540, 2015.

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

KARRAM, S.; LOYA, A.; HAMAM, H.; HABIB, R. H.; KHALIFEH, I. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. J**. Journal of Cutaneous 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. **Nature Reviews drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 751-758, 2015.

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 Development Technologies**, v. 19, n. 6, p. 339-349, 2021.

KOTLA, N. G.; CHANDRASEKAR, B.; ROONEY, P.; SIVARAMAN, G.; LARRAÑAGA, A.; KRISHNA, K. V.; PANDIT, A.; ROCHEV, Y. Biomimetic lipid-based nanosystems for enhanced dermal delivery of drugs and bioactive agents. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, n. 7, p. 1262-1272, 2017.

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

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. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 465-468, 2011.

LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 12-21, 2013.

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.

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

MACEDO, S. R. A.; NICOLETE, L. D. F.; FERREIRA, A. S.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R. The pentavalent antimonial therapy against experimental *Leishmania amazonensis* infection is more effective under the inhibition of the NF-κB pathway. **International immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 554–559, 2015.

MADUREIRA, M.; MARTINS, A. P.; GOMES, M.; PAIVA, J.; PROENÇA, C. A.; ROSÁRIO, V. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. **Journal of ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 23-29, 2002.

MASIC, A.; HERNANDEZ, A. M. V.; HAZRA, S.; GLASER, J.; HOLZGRABE, U.; HAZRA, B.; SCHURIGT, U. Cinnamic acid bornyl ester derivatives from valeriana Wallichii exhibit antileishmanial *in vivo* activity in *Leishmania major*-infected BALB/c Mice. **Plos One**, v.10, n. 11, p. 1–20, 2015.

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

MENNA-BARRETO, R. F. S.; GONÇALVES, R. S. L.; COSTA, E. M.; SILVA, R. S. F.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones is mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**,v. 47, n.5, p.644-653, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

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.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 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. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis.** Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 20 dezembro 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. **Epidemiological Report of the Americas.** Organização Mundial da Saúde, Washington D.C., mar. 2019. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50505/Leishreport2019_eng.pdf?sequence=9&isAllowed=y. Acesso em: 27 junho 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas**. Organização Mundial da Saúde, Washington D.C., 2021, n. 10. Disponível em: https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742. Acesso em: 20 dezembro 2021.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n.1, p. 10-18, 2014.

PAL, D.; BHATTACHARYA, S.; BAIDYA, P.; PANDEY, J. N.; BISWA, Y. M. Antileishmanial Activity of *Polyathia longifolia* Leat Extract on the *in vitro* Growth of *Leishmania danovani* Promastigotes**. Global Journal of Pharmacology**, v. 5, n.2, p. 97-100, 2011.

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

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*. R**evista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP** v. 26, n. 26, 2018.

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, p. e80226, 2013.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491-502, 2007.

PINHEIRO, B. M. K.; GRANZOTO, A. C. G. Uma Visão biomédica sobre a leishmaniose tegumentar americana: Revisão de literatura. **Revista Mato-grossense de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 143-157, 2023.

PRADHAN, S.; Schwartz, R.A.; Patil, A.; Grabbe, S.; Goldust, M. Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and experimental dermatology**, v. 47, n. 3, p. 516-521, 2022.

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. **Química nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

REDDY, P. S.; JAMIL, K.; MADHUSUDHAN, P.; ANJANI, G.; DAS, B. Antibacterial Activity of Isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. **Pharmaceutical biology,** v. 39, n. 3, p. 236-238, 2001.

RIVITTI, Evandro A. **Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti**. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas Editora, 2014.

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. **Journal of visualized experiments**., v. 62, n. 62, p. e3533, 2012.

ROCHA, V. P. C.; NONATO, F. R.; GUIMARÃES, E. T.; FREITAS, L. A. R.; SOARES, M. B. P. Activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1001-1010, 2013.

RODRIGUES, G. S. et al. O uso de softwares livres em aula prática sobre filtros moleculares de biodisponibilidade oral de fármacos. **Química Nova**, v. 44, n. 8, p. 1036-1044, 2021.

SANTOS, G. R. A. C.; SANTOS, J. J.; SILVA, B. A. T. S.; SANTOS, A. S.; NOGUEIRA, R. S.; NASCIMENTO, V. A. S. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Enfermagem em Foco**, v. 12, n. 5, 2021.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. Revista **Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 195 – 203, 2007.

SCHMIDT, G.; ROBERTS, L.; JANOVY, L. **Foundations of Parasitology**. 8 ed. New York: McGraw-Hill Education, 2012.

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. **Arte Médica Ampliada**., 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**ournal of Controlled Release**., v. 202, p. 1–13, 2015.

SHAKER, D. S.; ISHAK, H. A. R.; GHONEIM, A.; ELHUONI, A. M. 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, L.; GOYAL, S. Transdermal drug delivery system: a review. **International Journal of Research In Pharmaceutical And Biomedical Sciences**, v. 7, n. 7, p.260-288, 2018.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arbortristis* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 49-58, 2012.

SILVA, B. V. **Avaliação da potencialidade do uso de Hidrogéis poliméricos na terapêutica de Leishmaniose cutânea**. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2015.

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, M. A.; FOKOUE, H. H.; FIALHO, S. N.; DOS SANTOS, A. P. A.; ROSSI, N. 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, n. 6, p. 2199–2218, 2021.

SOARES, M.; VITORINO, C.; SOUSA, J.; PAIS, A. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 36, n. 3, p. 337-348, 2015. ISSN 1808-4532.

STEFANELLO, T. F.; PANICE, M. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; SARRAGIOTTO, M. H.; AUZÉLY-VELTY, R.; NAKAMURA, C. V. N. N-Butyl-[1-(4-Methoxy) Phenyl-9 H-β-Carboline]-3-Carboxamide prevents cytokinesis in *leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112-7120, 2014.

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, p. e1003594, 2013.

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.

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**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Poro, 2015.

WASAN, E. K.; BARLETT, K.; GERSHKOVICH, P.; SIVAK, O.; BANNO, B.; WONG, Z.; GAGNON, J.; GATES, B.; LEON, C. G.; WASAN, K. M. Development and characterization of oral lipid-based Amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. **International journal of pharmaceutics**, v. 372, n. 1-2, p. 76-84, 2009.

WIJNANT, G.; BOCXLAER, K. V.; YARDLEY, V.; HARRIS, A.; ALAVIJEH, M.; SILVA-PEDROSA, R.; ANTUNES, S.; MAURICIO, I.; MURDAN, S.; CROFT, L. S. Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 8, n. 2, p. 223-228, 2018.

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. **Tropical Medicine and International Health**, v. 22, n. 6, p. 679–687, 2017.

ANEXOS

A – Artigos publicados como autor oriundos do trabalho

BRANCO JUNIOR, A. G.; SILVA, I. D. G.; FIALHO, S. N.; ALMEIDA, M. L.; MARTINEZ, L. N.; ROSSI, N. R. D. L. P.; SILVA, M. A.; TELES, C. B. G.. A utilização de Artesunato e Cloroquina como alternativa terapêutica para tratamento de Leishmaniose tegumentar americana: uma revisão. **Research, Society And Development**, v. 11, p. e38811830995, 2022.

Branco Junior, A.G.; ARAÚJO,N.F.O.; FIALHO, S.N.; SILVA, M.A; TELE, C.B.A. Pharmacokinetic Profile of a Drug Repurposing Candidate for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis (*in silico*). **Brazilian Archives Of Biology And Technology** (ONLINE), v. 67, p. 1-7, 2024.

Branco Junior, A.G; FIALHO, S.A.; GOUVEIA, A.J.; FERREIRA, A.S.; MARTINEZ, L.N.; NASCIMENTO, W.S.P.; ROSSI, N.R.D.L.P.; DA SILVA, M.A.; LEMKE, M.F.M; ZEPON, K.M.; KANIS, L.A.; RIBEIRO, L.S.; TELES, C.B.G. Evaluation of a chloroquine hydrogel for topical treatment of leishmaniasis in BALB/c mice infected with *Leishmania (L.) amazonensis*. **3 Biotech**, v. 15, p. 1-13, 2025.

B – Capítulos de Livros oriundos do trabalho

BRANCO JUNIOR, A.G.; VASCONCELOS, M. H.; KISNER, J.G.M; FIALHO, S. N.; ALMEIDA, M.L.; MARTINEZ, L.N.; ROSSI, N.R.D.L.P.; SILVA, M.A.; TELES, C. B. G. Prevalência de Leishmaniose Tegumentar Americana em Rondônia nos anos de 2016-2020. In: Fábio Ferreira de Carvalho Junior. (Org.). **Ciências da Saúde: Desafios, Perspectivas e Possibilidades** - Volume 5. 1 ed. Guarujá: Científica digital, 2022, v. 5, p. 1-186.

C – Trabalhos apresentados em eventos

BRANCO JUNIOR, A. G.; FIALHO, S. N.; ZEPON, K. M.; KANIS, L. A.; SILVA, M. A.; TELES, C. B. G. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da permeação cutânea *in vitro* do fármaco cloroquina em um curativo de hidrogel.** In: 2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, 2022, Belém - PA. Anais do 2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia. Campinas: Galoá, 2022. v. 1. p. 1.

BRANCO JUNIOR, A. G.; FIALHO, S. N.; GOUVEIA, A. J. G.; FERREIRA, A. S.; MARTINEZ, L. N.; ROSSI, N. R. D. L. P.; COSTA, R. C. A.; ZEPON, K. M.; KANIS, L. A.; SILVA, M. A.; TELES, C. B. G.. **Avaliação preliminar de um tratamento em formulação tópica com antimalárico Cloroquina em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis.*** In MedTrop 2022. Belém – PA. Anais do 57 Congresso da SBMT - MedTrop. Campinas: Galoá, 2022. v. 1. p. 1.

D - PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

17º Congresso Brasileiro de Medicina de Família e Comunidade. 2023.

III Encontro de Tuberculose da Região Norte: a formação para o cuidado e prevenção da TB. 2022. - Organizador

2º Congresso Rondoniense de Medicina de Família e Comunidade - 2022 - Palestrante

SUS: Resgate de uma Política de Saúde Pública no Brasil. 2022 - Organizador

Seminário de Biodiversidade e Biotecnologia 2021. - Organizador (Fez parte da disciplina de Seminários de biotecnologia).

2º Congresso Brasileiro de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia. 2022 - Congressista

7º Congresso Iberoamericano de Medicina de Familiar e 16º Congresso Brasileiro. 2021 - Congressista.

E - CEUA

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Fiocruz Rondônia

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Avaliação de um tratamento em formulação tópica de antimaláricos Cloroquina e Artesunato em lesões cutâneas de camundongos BALB/c infectados com L. amazonensis."**, registrada com o Protocolo nº **2020/04**, sob a responsabilidade da **Dra. Carolina Bioni Garcia Teles**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da FIOCRUZ RONDÔNIA**, no dia **27/07/2020.**

Finalidade	**( ) Ensino (x) Pesquisa**
Vigência da autorização	Após data de aprovação até 31/12/2022.
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Isogênico *Balb/c*.
Nº de animais	196 (Cento e noventa e seis).
Peso/Idade	20g - 25g / 6 - 8 semanas.
Sexo	Fêmeas
Origem	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz).
Colaboradores:	- Arlindo Gonzaga Branco Junior. - Saara Neri Fialho. - Norton Rubens Diunior Lucas Pejara Rossi. - Amália dos Santos Ferreira. - Aurileya de Jesus Gouveia. - William Paz Ferreira.
( ) Animais de Vida Livre (Silvestres)	**( ) AnGM/OGM e derivados**
Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO:	**Nº do Certificado CTNBio (CQB)** **( ) SIM ( ) NÃO**
Atividade (s): ( ) Captura ( ) Coleta de espécimes ( ) Marcação ( ) Outras:	**Atividade (s):** ( ) AnGM ( ) OGM e derivados ( ) Outras:
Espécies/Grupos Taxonômicos	
Local (is) de realização das atividades	

André de Abreu Borges Aguirre
Tecnologista em Saúde Pública
Fiocruz Rondônia
SIAPE 2375234

Coordenador(a) da CEUA-Fiocruz Rondônia

Vice- Coordenador(a) da CEUA-Fiocruz Rondônia

Porto Velho, 29 de julho de 2020.

F - CGEN

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A1FE322

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A1FE322
Usuário:	Carolina Telec
CPF/CNPJ:	218.429.088-20
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Leishmania spp.

Título da Atividade:	Reposicionamento de fármacos antimaláricos e estudo de combinações in vitro e in vivo sobre Leishmania spp.

Equipe

Carolina Telec	Fiocruz
Norton Rubens Diunior Lucas Pejara Rossi	FIOCRUZ RO
Ana Paula Azevedo dos Santos	UNIR
Wellington da Silva Paula do Nascimento	UNISL
Amália dos Santos Ferreira	FIOCRUZ RO
Daniel Sol Sol de Medeiros	UNIR
Saara Neri Fialho	FIOCRUZ RO
Celso Vataru Nakamura	Universidade Estadual de Maringá, Maringá
Danielle Lazarin Bidóia	Universidade Estadual de Maringá
Aurileya de Jesus Gouveia	FIOCRUZ RO
Guilherme Matos Passarini	UNIR

Parceiras Nacionais

84.688.170/0001-70 / CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO LUCAS

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	In: 63º Congresso da Sociedade Brasileira de M
Identificação do meio onde foi divulgado:	In: VIII Seminário de Pós-Graduação e Pesquisa