



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**MONIQUE YOKO MARTINS KAWAKAMI**

---

---

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* E *in vivo* DE  
NANOEMULSÃO DO ÓLEO DE SUCUPIRA (*Pterodon emarginatus*  
Vogel) EM MODELO ANIMAL**

---

---

**Macapá  
2020**

**MONIQUE YOKO MARTINS KAWAKAMI**

---

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *in vitro* E *in vivo* DE  
NANOEMULSÃO DO ÓLEO DE SUCUPIRA (*Pterodon emarginatus*  
Vogel) EM MODELO ANIMAL**

---

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora Prof. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar

**Macapá  
2020**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
UNIFAP  
(anexar no verso na folha II)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal do Amapá**

**BANCA EXAMINADORA**

**Aluno(a): Monique Yoko Martins Kawakami**

---

**Orientador(a): Prof. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira**

---

**Co-Orientador(a): Prof. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar**

**Prof. Dra. Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira**  
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

**Prof. Dra. Raquel Silva Araújo**  
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

**Prof. Dra. Brenda Sánchez Ortiz**  
Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

**Data:28/08/2020**

***Dedico este trabalho à toda a minha família.***

## AGRADECIMENTOS

---

Gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos à todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Vou começar meus agradecimentos deixando meu “muito obrigada” à minha orientadora Dra Anna Eliza Maciel que não mediu esforços para que chegássemos a este momento de finalização do trabalho. Sempre motivada e empenhada a me dar todo o suporte que eu precisei. Agradeço-lhe pela orientação, por cada palavra de apoio, pela paciência e pela generosidade de compartilhar essa jornada comigo, assim como, por todos os aprendizados que pude adquirir desta relação.

À toda a minha família, em especial ao meu namorado Paulo que sempre foi o meu maior incentivador e nunca me deixou desistir diante das dificuldades. Obrigada por cuidar de mim, por me motivar e por me ajudar em tudo o que estava ao seu alcance. Você é o meu alicerce.

Aos meus sogros Lu e Nilson que viveram essa caminhada junto comigo, sendo essenciais tanto para que eu tivesse oportunidade de chegar a esta etapa acadêmica, quanto para que eu pudesse concluí-la. Obrigada por todo o apoio e carinho a mim dedicados ao longo desses anos. Amo vocês.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica, em especial ao professor Caio por ceder o espaço físico, os equipamentos e materiais necessários e pelo auxílio durante o desenvolvimento da formulação objeto de estudo deste trabalho.

Ao Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial gostaria de agradecer à professora Marta Gontijo, que co-orientou esta pesquisa proporcionando o embasamento necessário, bem como nos disponibilizou toda a estrutura, como espaço físico, materiais e equipamentos, fundamentais para a execução da pesquisa.

À Universidade Federal do Amapá e à Universidade Federal de Minas Gerais por todo o apoio concedido para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

---

|          |                                                                                           |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                    | <b>1</b>  |
| 1.1      | REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                | 2         |
| 1.1.1    | Leishmania e patogenia.....                                                               | 2         |
| 1.1.2    | Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....                                              | 7         |
| 1.1.3    | Atividades de produtos naturais brasileiros contra <i>Leishmania</i><br><i>spp.</i> ..... | 9         |
| 1.1.4    | <i>Pterodon</i> Vogel.....                                                                | 16        |
| 1.1.5    | <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel.....                                                    | 17        |
| 1.1.6    | Óleo de <i>P. emarginatus</i> .....                                                       | 19        |
| 1.1.7    | Nanoemulsões.....                                                                         | 22        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                     | <b>25</b> |
| 2.1      | GERAL.....                                                                                | 25        |
| 2.2      | ESPECÍFICOS.....                                                                          | 25        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                            | <b>26</b> |
| 3.1      | PRODUTOS QUÍMICOS.....                                                                    | 26        |
| 3.2      | MATERIAL VEGETAL.....                                                                     | 26        |
| 3.3      | OLEORESINA DE <i>P. emarginatus</i> (OS).....                                             | 26        |
| 3.4      | CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ANÁLISE POE<br>ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS).....       | 26        |
| 3.5      | ESTUDOS <i>in vitro</i> .....                                                             | 27        |
| 3.5.1    | Método de emulsificação.....                                                              | 27        |
| 3.5.2    | Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido(EHLr).....                        | 27        |
| 3.5.3    | Caracterização das nanoemulsões.....                                                      | 28        |
| 3.5.4    | Efeito da NEOS5 na viabilidade de promastigota <i>in vitro</i> .....                      | 28        |
| 3.6      | ESTUDOS <i>in vivo</i> .....                                                              | 29        |
| 3.6.1    | Animais.....                                                                              | 29        |
| 3.6.2    | Medicamento de referência.....                                                            | 30        |

|        |                                                                                                    |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.3  | Obtenção do parasita.....                                                                          | 30 |
| 3.6.4  | Inoculação nos animais.....                                                                        | 30 |
| 3.6.5  | Estudo da Dose-Resposta.....                                                                       | 31 |
| 3.6.6  | Método de emulsificação.....                                                                       | 31 |
| 3.6.7  | Caracterização da NEOS20.....                                                                      | 32 |
| 3.6.8  | Estudo da avaliação das feridas após o uso tópico da<br>NEOS20.....                                | 32 |
| 3.6.9  | Medidas do tamanho da lesão e do peso dos animais.....                                             | 33 |
| 3.6.10 | Avaliação da eficiência dos tratamentos através da avaliação da<br>carga parasitária na lesão..... | 33 |
| 3.6.11 | ELISA para quantificação de citocinas na lesão cutânea.....                                        | 34 |
| 3.6.12 | Análise histológica.....                                                                           | 35 |
| 3.7    | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....                                                                          | 35 |
| 3.8    | ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                                                         | 36 |
| 4      | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                        | 37 |
| 5      | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....                                                           | 59 |
|        | REFERÊNCIAS.....                                                                                   | 60 |
|        | ANEXOS.....                                                                                        | 73 |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b>  | Ciclo de vida da Leishmaniose.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 8  |
| <b>Figura 2</b>  | <i>Leishmania</i> – Forma flagelada ou promastigota.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 8  |
| <b>Figura 3</b>  | <i>Leishmania</i> – Forma aflagelada ou amastigota.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 8  |
| <b>Figura 4</b>  | Árvore de <i>P. emarginatus</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 18 |
| <b>Figura 5</b>  | Frutos de Sucupira-branca.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 18 |
| <b>Figura 6</b>  | Óleo dos frutos de <i>P. emarginatus</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 20 |
| <b>Figura 7</b>  | Nanoemulsão de EHL 11.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 42 |
| <b>Figura 8</b>  | Distribuição do tamanho de gotícula das nanoemulsões de EHL 11 de <i>P. emarginatus</i> armazenadas a temperatura ambiente (25°C). Média do tamanho de gotículas das formulações A dia 0; B dia 1; C dia 7; D dia 14; E dia 21; F dia 28 e G dia 30.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 44 |
| <b>Figura 9</b>  | Acompanhamento do tamanho médio da lesão em resposta a diferentes tratamentos tópicos com OS nas concentrações 5%, 10% e 20% p/p e grupo controle tratado com MHC durante 21 dias duas vezes por dia. O tamanho da lesão é mostrado como média $\pm$ DP.....                                                                                                                                                                                                                                             | 47 |
| <b>Figura 10</b> | Distribuição do tamanho das gotículas da NEOS20 preparadas com monooleato de sorbitano e polissorbato 80.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 49 |
| <b>Figura 11</b> | Eficácia da terapia combinada de antimoniato de meglumina injetável e NEOS20. As fêmeas de ratos BALB/c foram infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> amastigotas na base da cauda (n=7). Os animais foram tratados topicamente com SO-NE, antimônio de meglumina administrado por via intraperitoneal via (Glucantime® 100 mgSb+5/Kg/dia), combinação de antimônio de SO-NE meglumina, e grupo de controle não tratado durante 30 dias. O tamanho da lesão é mostrado como média e desvio padrão..... | 50 |

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 12</b> | Porcentagem de variação na dimensão média da lesão determinada pela diferença entre a dimensão média da lesão no início e no fim do tratamento.....                                                                                                                                                                   | 51 |
| <b>Figura 13</b> | Acompanhamento do tamanho da lesão dos grupos tratado com a combinação NEOS20+Antimoniato dias 1, 7 e 28 respectivamente (A-C); tratado com Antimoniato dias 1, 7 e 28 respectivamente (D-F); tratado com a NE dias 1, 7 e 28 respectivamente (G-I); e grupo sem tratamento dias 1, 7 e 28 respectivamente (J-M)..... | 52 |
| <b>Figura 14</b> | Análise histopatológica das lesões – Grupo sem tratamento.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 53 |
| <b>Figura 15</b> | Análise histológica da lesão do grupo tratado topicamente com NEOS20.....                                                                                                                                                                                                                                             | 54 |
| <b>Figura 16</b> | Análise histológica da lesão do grupo tratado com antimoniato de meglumina.....                                                                                                                                                                                                                                       | 55 |
| <b>Figura 17</b> | Análise histológica da lesão do grupo tratado com antimoniato de meglumina e NEOS20.....                                                                                                                                                                                                                              | 55 |
| <b>Figura 18</b> | Quantificação da Carga parasitária na lesão.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 56 |
| <b>Figura 19</b> | Níveis de citocina nas lesões de camundongos tratados com a combinação de NEOS20 por via tópica, antimoniato de meglumina administrado por via intraperitoneal (Glucantime® 100 mgSb + 5 / Kg / dia), combinação antimoniato de meglumina e NEOS20 e grupo controle não tratado por 30 dias.....                      | 57 |

## LISTA DE QUADROS

---

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Quadro 1.</b> Estudos de plantas brasileiras frente ao protozoário <i>Leishmania</i> spp. Avaliação da eficácia de acordo com os valores de IC <sub>50</sub> ..... | 11 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

---

|                  |                                                                                                                                                                                                 |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Tamanho de gotícula, Índice de Polidispersão (IPd) e Potencial Zeta das nanoemulsões de EHL 10, 11 e 12.....                                                                                    | 41 |
| <b>Tabela 2.</b> | Tamanho de gotícula, Índice de Polidispersão (Pdl) e Potencial Zeta das nanoemulsões EHL 11 armazenadas em temperatura ambiente (25°C) nos dias 0, 1, 7, 15, 21, 28 e 30 após a preparação..... | 43 |
| <b>Tabela 3.</b> | Caracterização da NEOS20.....                                                                                                                                                                   | 48 |

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

|                                |                                                   |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|
| ANOVA                          | Análise de variância                              |
| A/O                            | Água em óleo                                      |
| CG-MS                          | Cromatografia gasosa com espectrômetro de massas  |
| CO <sub>2</sub>                | Dióxido de carbono                                |
| DLS                            | Espalhamento dinâmico da luz                      |
| DNA                            | Ácido desoxirribonucleico                         |
| EHL                            | Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo                     |
| EHLr                           | Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo requerido           |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Ácido sulfúrico                                   |
| IC <sub>50</sub>               | Concentração Inibitória                           |
| IFN- $\gamma$                  | Interferon-gama                                   |
| IL-2                           | Interleucina 2                                    |
| IL-10                          | Interleucina 10                                   |
| kDNA                           | DNA do cinetoplasto                               |
| L. a.                          | <i>Leishmania amazonensis</i>                     |
| LC <sub>50</sub>               | Concentração Letal                                |
| LCL                            | Leishmaniose cutânea localizada                   |
| LTA                            | Leishmaniose Tegumentar Americana                 |
| NADPH                          | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina |

|               |                                                                                      |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| NEOS          | Nanoemulsão da oleoresina dos frutos de <i>P. emarginatus</i>                        |
| NEOS5         | Nanoemulsão da oleoresina dos frutos de <i>P. emarginatus</i> na concentração de 5%  |
| NEOS20        | Nanoemulsão da oleoresina dos frutos de <i>P. emarginatus</i> na concentração de 20% |
| NO            | Óxido Nítrico                                                                        |
| O/A           | Óleo em água                                                                         |
| O. e.         | Óleo essencial                                                                       |
| OMS           | Organização Mundial da Saúde                                                         |
| OPAS/OMS      | Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde                      |
| OS            | Oleoresina dos frutos de <i>P. emarginatus</i>                                       |
| PCR           | Reação em Cadeia de Polimerase                                                       |
| PdI           | Índice de Polidispersão                                                              |
| RMN           | Ressonância magnética nuclear                                                        |
| RNA           | Ácido ribonucleico                                                                   |
| SFB           | Soro bovino fetal                                                                    |
| TCM           | Triglicerídeo de cadeia média                                                        |
| TNF- $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral- Alfa                                                       |

### **AValiação da Atividade Leishmanicida Tópica de Nanoemulsão do Óleo de Sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel) em Modelo Animal.**

**Introdução:** A leishmaniose é uma das doenças infecciosas mais importantes do mundo, segundo a OMS. Distribuída em vários países das Américas, temos a forma Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) causada pela *Leishmania* (*L*) *amazonensis*, que possui uma grande capacidade de causar deformidades, além disso, o tratamento é bastante incômodo ao paciente, o que tem levado à busca por novos fármacos. **Objetivo:** Diante disso o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencial atividade leishmanicida, frente ao protozoário da LTA, de uma nanoformulação para uso tópico obtida a partir do oleoresina dos frutos de *P. emarginatus*. **Material e métodos:** O teste utilizado para o estudo *in vitro* foi o ensaio colorimétrico de resazurina que avaliou a IC<sub>50</sub> de uma nanoemulsão composta por dois tipos de tensoativos (monooleato de sorbitano e o polissorbato 80), OS e água (NEOS5), contra promastigotas de *L. amazonensis*. O ensaio *in vivo* avaliou a eficácia da formulação polissorbato 80 (6,26%) monooleato de sorbitano (3,73%), etanol 96% (2%), OS (20%) e água (68%) (NEOS20) no tratamento de lesões causadas por *L. (L)* *amazonensis* em 4 grupos de animais. **Resultados e discussão:** Após 48h de incubação a NEOS5 apresentou melhor resultado na inibição parasitária com IC<sub>50</sub> de 21,83 ± 1,09 ppm, enquanto o OS não encapsulado apresentou IC<sub>50</sub> de 32,38 ± 3,87ppm. Diante deste resultado seguiu-se para o estudo *in vivo*, onde observou-se que a lesão com maior redução de tamanho foi a do grupo tratado com a combinação de Glucantime® e NEOS20, com redução de 41%. A lesão passou de 7,4 ± 0,62mm para 4,3 ± 0,88mm durante o período de tratamento. **Conclusão:** A utilização tópica de NEOS20 combinada com Glucantime® apresentou os melhores resultados, melhorando o aspecto geral das lesões e diminuindo significativamente as interleucinas IL10 e IFN-γ, indicando uma possível atividade antiinflamatória e cicatrizante da formulação proposta.

**Palavras-Chave:** Leishmaniose; doenças tropicais negligenciadas; *P. emarginatus*; nanoemulsão.

**Agradecimentos:** UNIFAP e UFMG.

## ABSTRACT

---

### LEISHMANICIDAL ACTIVITY EVALUATION OF TOPICAL SUCUPIRA OIL NANOEMULSION (*Pterodon emarginatus* Vogel) in ANIMAL MODEL.

**Introduction:** Leishmaniasis is one of the most important infectious diseases in the world, according to the WHO. Distributed in several countries in Americas, we have the American cutaneous leishmaniasis (ACL) form, caused by *Leishmania* (*L*) *amazonensis*, which has a great capacity to cause abnormalities, in addition, the treatment is very uncomfortable for the patient, which has led to the search for new drugs. **Objective:** Thus, the aim of this work was evaluate the potential leishmanicidal activity, against the protozoan of ATL, of a nanoformulation for topical use obtained from the oleoresin of *P. emarginatus* fruits. **Material and methods:** The test used from *in vitro* study was the colorimetric assay of resazurin that evaluated the IC<sub>50</sub> of a nanoemulsion composed of two types of surfactants (sorbitan monooleate and polysorbate 80), OS and water (NEOS5), against promastigotes *L. amazonensis*. The *in vivo* test evaluated the efficacy of the formulation polysorbate 80 (6.26%) sorbitan monooleate (3.73%), ethanol 96% (2%), OS (20%) and water (68%) (NEOS20) in treatment of lesions caused by *L. (L) amazonensis* in 4 groups of animals. **Results and discussion:** After 48 hours of incubation, NEOS5 showed better results in parasitic inhibition with an IC<sub>50</sub> of 21.83 ± 1.09 ppm, while the non-encapsulated OS presented an IC<sub>50</sub> of 32.38 ± 3.87ppm. In from of this results, we proceeded to the *in vivo* study, where it was observed that the lesion with the greatest reduction in size was that of the treated group with the combination of Glucantime® and NEOS20, with a reduction of 41%. The lesion went from 7.4 ± 0.62 mm to 4.3 ± 0.88 mm during the treatment period. **Conclusion:** The topical use of NEOS20 combined with Glucantime® showed the best results, improving the general appearance of the lesions and significantly reducing the interleukins IL10 and IFN-γ, indicating a possible anti-inflammatory and healing activity of the proposed formulation.

**Keywords:** Leishmaniasis; neglected tropical diseases; *P. emarginatus*. nanoemulsion.

**Acknowledgments:** UNIFAP and UFMG.

# 1 INTRODUÇÃO

---

As leishmanioses são um problema de saúde pública mundial, estando entre as endemias consideradas prioritárias no mundo. A leishmaniose cutâneo mucosa é altamente endêmica nas Américas. Segundo a organização mundial da saúde, os dados epidemiológicos do período de 2001 a 2016 mostram que a OPAS/OMS recebeu um total de 892.846 notificações de novos casos em 17 dos 18 países endêmicos.

A doença se manifesta de diferentes formas clínicas, dependendo da espécie e da resposta imunológica do hospedeiro, podendo ser classificada como leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar americana (LTA). A LTA está distribuída em quatro continentes (América, Europa, África e Ásia). É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades, sendo este último, o principal motivo da LTA levar a problemas psicológicos, sociais e econômicos graves.

Diante deste cenário, muitas pesquisas têm se voltado para a busca de medicamentos para leishmaniose os quais possam ser menos agressivos que os tratamentos de referência atuais. Por isso, os produtos naturais nas formas de óleos, extratos e frações de compostos específicos, têm sido a matéria-prima de primeira escolha. Dentre as diversas formas de produção de fármacos, a nanotecnologia tem se destacado devido as diversas vantagens que oferece que vão desde a melhora na farmacocinética e na solubilidade de substâncias lipofílicas (como os óleos vegetais) e a proteção das substâncias terapêuticas contra agentes externos. Nanoestruturas como nanopartículas e nanoemulsões (sendo esta última objeto de estudo neste trabalho) são as estruturas mais utilizadas para incorporação de óleos vegetais.

Neste estudo foi utilizado o oleoresina de sucupira (*P. emarginatus*), o qual tem apresentado um alto potencial terapêutico, devido, principalmente, a presença de compostos terpenóides que lhe confere diversas atividades biológicas importantes como: inseticida, testado contra o vetor da elefantíase (*Culex quinquefasciatus*) e o vetor da dengue (*Aedes aegypti*), se mostrando bastante promissor. Essas

formulações desenvolvidas a partir da nanotecnologia contribuíram para que o óleo estudado adquirisse uma característica química mais compatível com a água, visto que os vetores estudados são combatidos principalmente na fase larvária e a larva se desenvolve na água. Outras atividades descritas também foram antiinflamatória, antimicrobiana e leishmanicida, onde os testes *in vivo*, *in vitro* e *in silico* comprovaram a eficácia. A possibilidade de *P. emarginatus* ter atividade leishmanicida é de extrema importância, visto que as leishmanioses (visceral e tegumentar) são hoje um problema de saúde pública mundial. Considerando que os medicamentos para tratar a leishmaniose apresentam altos níveis de toxicidade e muitos efeitos adversos, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma nanoemulsão de oleoresina de sucupira que seja eficaz para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana e não apresente toxicidade considerável ao paciente.

Neste sentido, nanoemulsões a base de oleoresina de *P. emarginatus* tem a proposta de melhorar o sugerido efeito e a aplicabilidade do óleo para tratamento da leishmaniose, inclusive como uma alternativa viável no lugar dos tratamentos convencionais que comprometem a qualidade de vida do paciente.

## 1.1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1 Leishmanioses e patogenia

*Leishmania spp* é um gênero de protozoários da ordem Kinetoplastida, pertencente à família Trypanosomatidae, responsável pela transmissão da leishmaniose (HERWALDT, 1999). Com um ciclo de vida heterogênico, o vetor invertebrado abriga em seu trato digestivo a forma flagelada contaminante, promastigota metacíclica. Nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, várias espécies de mamíferos são a forma amastigota do parasita, que é intracelular obrigatória (PETERS et al., 2008). O ciclo da doença começa com a picada da fêmea hematófaga infectada do vetor, um momento em que o hospedeiro vertebrado forma as promastigotas metacíclicas do protozoário do gênero *Leishmania* que habitam o intestino do flebotomíneo. Após a inoculação, elas são englobadas por células do sistema de retículo endotelial, como macrófagos, neutrófilos e monócitos (JAIN; JAIN, 2013; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016), perdem o flagelo e tornam-se formas

amastigotas, iniciando um processo de multiplicação intracelular por divisão binária no fagolisossomo (SACKS; KAMHAWI, 2001). As células, quando preenchidas com o protozoário, se rompem, liberando inúmeros parasitas que infectam novas células do hospedeiro vertebrado (FORESTIER et al., 2011). Ao realizar o hematofagismo no homem ou animal com a doença, o mosquito ingere células infectadas com as formas amastigotas do parasita. Após a ruptura do morfonuclear e a liberação do protozoário no organismo do vetor, eles se tornam promastigotas metacíclicos novamente flagelados, iniciam um processo de proliferação extracelular e, portanto, capaz de infectar novos reservatórios (FORESTIER et al., 2011; MAGILL, 2017).

Os parasitas têm como hospedeiros naturais os animais silvestres e só afetam o homem e os animais domésticos quando estes invadem seu ambiente. A multiplicidade de espécies e tipos nosogeográficos de leishmaniose, bem como sua ampla distribuição, causam considerável morbidade e mortalidade que dependem da relação entre as espécies transmitidas e a resposta imunológica do hospedeiro, podendo então desencadear uma ampla variedade de sintomas, manifestações clínicas multifacetadas e diversidade epidemiológica (ASHFORD, 2000; PACE, 2014) (PACE, 2014; CHANDRA; MAHESH, 2017). Entre as formas clínicas da doença, temos no homem a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar americana que se manifesta como cutânea, mucocutânea e difusa (DESJEUX, 2001).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é considerada uma doença endêmica zoonótica urbana e antroponótica causada principalmente pelos protozoários do complexo *L. donovani*, *L. infantum* (MARZOCHI, 2005; JAIN; JAIN, 2013) em ambientes urbanos, afeta principalmente o cão doméstico (de FREITAS et al., 2018). É a leishmaniose mais grave, afeta órgãos viscerais, como baço, fígado e, ocasionalmente, medula óssea (COSTA et al., 2009; KUMAR, 2012). Predominante nos continentes africanos, nas Américas e no sudeste asiático, pode ser assintomático, causando sintomas clínicos como surtos irregulares de febre, esplenomegalia acompanhada ou não de hepatomegalia e perda de peso, podendo gerar um quadro grave de caquexia progressiva, sendo fatal em até 2 anos quando não tratado (SHARMA; SINGH, 2008; GRIENSVEN, 2013; OMS, 2018; MAGILL, 2017).

A LTA abrange três formas específicas da doença. São elas: leishmaniose cutânea (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*), formas que produzem

exclusivamente lesões cutâneas ulcerosas ou não, porém limitadas. Na forma mucocutânea ou espúria, o protozoário com tropismo pelas membranas mucosas causa lesões destrutivas, desfigurantes e hediondas que provavelmente começam no local da mordida e com lesões metastáticas subsequentes próximas às cartilagens, afetando as regiões naso-oral e faringe, além de mutilação do rosto. Geralmente é causada por *L. brasiliensis* (MARZOCHI, 2005). E, por último, a forma cutânea difusa, causada por espécies como *L. aethiopica* ou *L. amazonensis*. Essa é a forma mais rara, caracterizada por comprometimento dérmico maciço, onde existem múltiplos nódulos com muitos parasitas, não ulcerados, restritos a uma região ou espalhados por todo o corpo (SHARMA; SINGH, 2008). De natureza crônica, com recorrências frequentes, apresenta aspecto clínico, imunológico, parasitológico, anatomopatológico e terapêutico diferente das outras duas formas descritas acima. Geralmente são indolores, embora irritantes e resultem em uma doença duradoura, principalmente devido a uma resposta imune específica deficiente ou ausente, afetando indivíduos anérgicos ou, posteriormente, pacientes tratados com calazar (DESJEUX, 2004; MARZOCHI, 2005). Essa complicação tardia da forma visceral causada por *Leishmania donovani* e denominada leishmaniose cutânea pós-calazar ocorre eventualmente, de 6 meses a 1 ano após o tratamento, resultando em lesões de tamanhos variados e não ulceradas (PACE, 2014). É observado em algumas regiões da África e da Ásia e, apesar de silencioso, é de grande importância epidemiológica (URANW, 2011). As feridas mais lisas e geralmente indolores não causam desconforto ao paciente, que na maioria das vezes prefere optar pelo não tratamento, pois é desconfortável e doloroso. No entanto, muitos parasitas podem ser alojados no local, resultando em uma fonte potencialmente ativa de nova contaminação (AKHOUNDI, 2017).

A ampla patologia das Leishmanioses, devido às diferentes formas da doença e a multiplicidade de espécies envolvidas no processo patológico, nos fornece resoluções diferenciadas. Assim, uma espécie como a *L. braziliensis* pode desenvolver em um hospedeiro desde feridas abertas localizadas que se autorreparam até lesões crônicas e invasivas capaz de causar destruição das mucosas (DE OLIVEIRA; BRODSKY, 2012). Essa variabilidade de sintomas está relacionada tanto à cepa e espécie do parasito quanto ao sistema imunológico do hospedeiro. Os macrófagos representam as principais células infectadas por

*Leishmania* e desempenham um papel relevante no controle imunológico do parasitismo intracelular (BALARAMAN et al., 2004). A capacidade da *Leishmania* de resistir às células relacionadas a resposta inata ou adaptativa, como os macrófagos, ajuda o parasita a permanecer multiplicando e infectando novas células. Sabe-se entretanto que uma resposta Th1 eficaz, com liberação de mediadores químicos tais como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, óxido nítrico (NO), dentre outros, auxilia na resolução da doença por destruição do patógeno pelas células fagocíticas (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

A visualização do protozoário na amostra biológica e a identificação de espécies de *Leishmania* são de suma importância para o diagnóstico preciso da leishmaniose. A precisão e a sensibilidade do método impactarão diretamente um controle e tratamento eficazes, prevenindo a morte por leishmaniose visceral e morbidade por leishmaniose cutânea e mucosa (GONTIJO; MELO, 2004). O diagnóstico clínico da doença é complicado, devido às várias manifestações e diferentes formas das feridas (PETERS et al., 2008). A análise laboratorial geralmente se deve à demonstração, através de microscopia, de formas amastigotas do parasita no tecido infectado (em geral, biópsias na forma tegumentar e aspiradas do baço em Visceral) (DESJEUX, 2001). Embora seja um método relativamente simples e barato, é semiquantitativo e não é capaz de identificar as espécies infectantes. Outros métodos, como isolamento de *Leishmania* em modelos de cultura ou animais, testes intradérmicos de hipersensibilidade e xenodiagnóstico são relatados. Os métodos de amplificação bioquímica, molecular, de DNA ou RNA tornaram-se cada vez mais essenciais no diagnóstico da doença (AKHAVAN, 2010; MONDAL et al., 2010). A PCR, por exemplo, permite que a identificação e quantificação do parasita sejam mais precisas do que os métodos parasitológicos mencionados anteriormente (NAGILL; KAUR, 2011; DA GRAÇA et al., 2012).

A leishmaniose é um problema de saúde pública com alta incidência e ampla distribuição geográfica em vários países e continentes. As ações de vigilância, prevenção e controle requerem um grande esforço técnico, operatório e político, dadas as altas taxas de morbimortalidade relacionadas à doença. As medidas de controle são basicamente restritas ao manejo de casos novos e recorrentes, vigilância entomológica em focos zoonóticos e quimioterapia (DUTHIE, 2012). Assim, os avanços na pesquisa para obtenção de novas terapias medicamentosas e vacinas

são de fundamental importância para o manejo e implementação de medidas de controle (PETERS et al., 2008).

A vacinação em humanos e cães pode ser uma estratégia eficaz e importante para proteção a longo prazo (COLER; REED, 2005;). Ao limitar a gravidade e a incidência e interromper a transmissão, essa medida profilática reduziria os casos da doença (NOAZIN et al., 2008). No entanto, mesmo com pesquisas intensas e vários candidatos a vacinas, não há evidências que comprovem a proteção duradoura e eficaz delas (de AGUIAR et al., 2010).

Para o tratamento, a administração parenteral de antimoniais pentavalente é, durante anos, usada contra as várias formas clínicas da doença (DESJEUX, 2001; SINGH, KUMAR, SINGH, 2012). Entretanto, vários fatores limitam seu uso, como resistência a medicamentos, alto custo, toxicidade associada à quimioterapia, efeitos adversos e o inconveniente da via de administração (como infusão intravenosa) dificultando a adesão (PAVLI; MALTEZOU, 2010; JAIN; JAIN, 2013; JAIN; JAIN, 2018). O uso da anfotericina B também mostrou altas taxas de cura, no entanto, seus frequentes efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e hipocalcemia, além da necessidade de hospitalização prolongada para administração, limitam seu uso (ORYAN; AKBARI, 2016). A cura efetiva e completa é de suma importância, uma vez que a doença, principalmente em sua forma crônica, é debilitante, tornando o paciente estigmatizado, incapacitado, gerando e agravando a pobreza, a desnutrição e outras doenças relacionadas. A urgência de medicamentos mais seletivos e menos tóxicos levou a várias pesquisas voltadas ao estudo de novos medicamentos, aprimoramento dos medicamentos existentes e novas vias de administração relacionadas ao tratamento da leishmaniose (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008). Outro fator que facilitaria a adesão ao tratamento seria a descoberta de medicamentos eficazes por outras vias de administração, como oral ou tópica (nos casos de LTA) (RICHARD; WERBOVETZ, 2010). Mesmo conhecendo a complexidade da doença, as várias manifestações clínicas, as várias espécies existentes e as áreas geográficas de obtenção da infecção e as limitações do tratamento, a obtenção de um novo medicamento com as características acima, trariam, possivelmente, novos caminhos para a terapia (ORYAN; AKBARI, 2016).

### 1.1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA

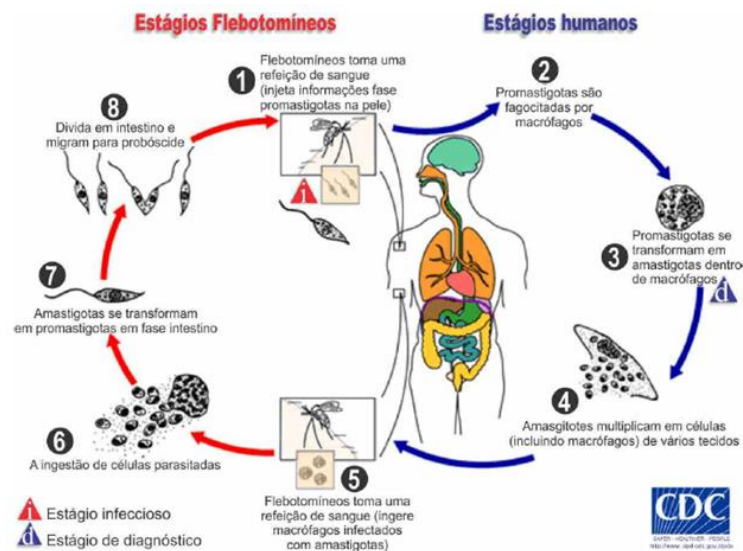
A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antroponose infecciosa e não contagiosa causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, que parasita as células do sistema fagocítico mononuclear da pele e membranas mucosas (PACE, 2014). O vetor principal é o flebotomíneo, inseto pertencente à ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, conhecido como palha de mosquito, Tatuquira, Birigui, entre outros, dependendo da região geográfica. Entre as várias espécies envolvidas na transmissão do LTA, temos: *Lutzomyia Flaviscutellata*, *Lu. Umbralis*, *Lu. Intermedia*, *Lu. Wellcomei* e *Lu. Migonei*, *Lu. Hartmanni* (PEARSON et al., 1983). E os reservatórios são animais selvagens, especialmente roedores. Apesar do grande número de infecções em humanos e animais domésticos, essas não são consideradas reservatórios, apenas hospedeiros acidentais (ASHFORD, 2000). A doença é endêmica em vários países e possui uma epidemiologia muito complexa, com várias espécies de *Leishmania* circulando na mesma região geográfica e nos ciclos de transmissão, além de diferentes reservatórios, hospedeiros e vetores de flebotomíneos. Isso resulta em diferentes manifestações clínicas e resposta à terapia (CARNEIRO et al., 2012; OMS, 2018).

A forma clínica da LTA é caracterizada por feridas de tamanhos variados, ulcerosos ou não, com bordas elevadas e fundo granular, geralmente indolores, persistentes e isolados, mas auto-reparadoras, causadas por várias espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, por exemplo *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* (PACE, 2014). A espécie infectante e a proporção parasita-hospedeiro influenciarão o aspecto clínico, o tamanho e o tempo de resolução da lesão (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008). Em alguns casos, é possível que a cicatrização da lesão ocorra, mesmo sem assistência médica. Em outros, pode ocorrer que a lesão permaneça por meses em processo de atividade e cicatrização lenta (MONDAL et al., 2010).

O ciclo da doença começa com a picada da fêmea hematófaga infectada do vetor, momento em que as formas promastigotas metacíclicas do protozoário, que habitam o intestino do flebotomíneo, são inoculadas no mamífero (**Figura 1**). Após a inoculação, elas são englobadas por células do sistema retículo endotelial, como macrófagos, neutrófilos e monócitos (PETERS et al., 2008; JAIN; JAIN, 2013) perdem

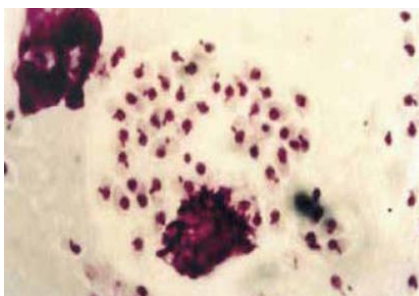
o flagelo e tornam-se formas amastigotas, iniciando um processo de multiplicação intracelular por divisão binária no fagolisossomo (SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). As células, quando preenchidas com o protozoário, se rompem, liberando inúmeros parasitas que infectam novas células do hospedeiro vertebrado. Ao realizar o hematofagismo no homem ou animal com a doença, o mosquito ingere células infectadas com as formas amastigotas do parasita. Após a ruptura do morfonuclear e a liberação do protozoário no organismo do vetor, eles se tornam promastigotas metacíclicos novamente flagelados, iniciam um processo de proliferação extracelular e, portanto, capaz de infectar novos reservatórios (FORESTIER et al., 2011).

**Figura 1 – Ciclo de vida da Leishmaniose.**



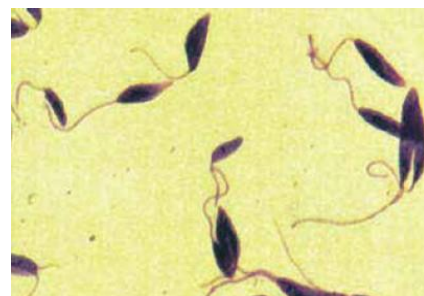
Fonte: Martins; Lima, 2013 (Adaptado de CDC).

**Figura 2 - *Leishmania* – Forma flagelada ou promastigota.**



Fonte:Brasil, 2016.

**Figura 3 - *Leishmania* –Forma aflagelada ou amastigota.**



Fonte:Brasil, 2016.

A LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras e ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, na média do País, predominam os maiores de 10 anos (92,5% do total de casos) e o sexo masculino (74% no ano de 2014) (BRASIL, 2017).

Os principais medicamentos utilizados no tratamento são: Antimoniato de meglumina (droga de primeira escolha), Anfotericina B, Pentamidina e Pentoxifilina. Estes medicamentos são financiados, adquiridos e distribuídos aos Estados pelo Ministério da Saúde. E apesar de serem de acesso facilitado, universal e gratuito, apresentam elevados níveis de toxicidade e muitos efeitos adversos que incapacitam o paciente. Muitas pesquisas recentes têm se voltado para o estudo de novos fármacos, melhoramento de fármacos já existentes e novas vias de administração relacionados ao tratamento da LTA (BRASIL, 2017; SANTOS et al., 2017).

### **1.1.3 Atividades de produtos naturais brasileiros contra *Leishmania spp***

As altas taxas de morbimortalidade das leishmanioses aliada ao fato das limitações de uso e toxicidade dos medicamentos disponíveis, encoraja a busca de novas terapêuticas mais seguras, eficientes e menos dispendiosas. Os recursos naturais de origem vegetal são fontes potenciais de novas moléculas despertando assim o interesse dos pesquisadores (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; CLARK, 1996). O rastreamento e obtenção de novos princípios ativos chama a atenção para eles, visto que, possuem composição química complexa, bem como menores toxicidade e risco de resistência a microrganismo sendo, portanto, alvo para produção de novos fármacos, inclusive agentes antileishmaniose (CLARK, 1996).

O Brasil é reconhecido por possuir uma biodiversidade particularmente rica e inexplorada, que inclui mais de 40.000 espécies de plantas já reconhecidas (FLORA DO BRASIL, 2020) Os vários domínios fitogeográficos, incluindo a Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado, fazem do país um dos biomas mais ricos do planeta. Entretanto, apesar da grande variedade, uma porcentagem ínfima das espécies foram avaliadas do ponto de vista farmacológico ou fitoquímico (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018). Uma diversidade de espécies vegetais da flora brasileira é amplamente usada na medicina tradicional e sistematicamente pesquisadas para novas atividades biológicas contra organismos vivos inclusive a anti-*Leishmania*.

Estudos recentes *in vitro* sobre a eficácia de plantas medicinais e compostos derivados de plantas, como os extratos brutos e óleos essenciais contra LTA e LV causados por diferentes espécies de *Leishmania* foram resumidos no **Quadro 1**. Foi considerado a IC<sub>50</sub> que é a concentração de fármaco que causa 50% de inibição do crescimento de formas amastigotas ou promastigotas de *Leishmania* (Monzote et al., 2014).

**Quadro 1.** Estudos de plantas brasileiras frente ao protozoário *Leishmania* spp. Avaliação da eficácia de acordo com os valores de IC<sub>50</sub>.

| Espécie                                | Família Botânica | Região da coleta (UF) | Ocorrência            | Parte da planta | Preparação              | Espécie de <i>Leishmania</i>   | Forma do protozoário | IC <sub>50</sub> (µg/mL) | Referência               |
|----------------------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Gustavia elliptica</i>              | Lecythideae      | AM                    | Amazônia              | Casca           | Extrato clorofórmico    | <i>L.(V) braz</i> <sup>2</sup> | Prom. <sup>6</sup>   | 6,4 - 24h                | (ALMEIDA et al., 2011)   |
|                                        |                  |                       |                       |                 |                         | <i>L.(V) guy</i> <sup>3</sup>  | Prom. <sup>6</sup>   | 7,7 - 24h                |                          |
| <i>Annona foetida</i> Martius          | Annonaceae       | AM                    | Amazonia              | Casca           | Extrato diclorometânico | <i>L. braz.</i> <sup>2</sup>   | Prom. <sup>6</sup>   | 23,0 ± 0,6               | (COSTA et al., 2006)     |
|                                        |                  |                       |                       |                 |                         | <i>L. guy</i> <sup>3</sup>     |                      | 2,7 ± 0,4                |                          |
|                                        |                  |                       |                       |                 | Extrato metanólico      | <i>L. braz.</i> <sup>2</sup>   |                      | 40,4 ± 3,2               |                          |
|                                        |                  |                       |                       |                 |                         | <i>L. guy</i> <sup>3</sup>     |                      | 23,6 ± 3,1               |                          |
| <i>Unonopsis duckei</i> R.E. Pe.       | Annonaceae       | AM                    | Amazonia              | Casca           | Fração alcaloídica      | <i>L. a.</i> <sup>4</sup>      | Prom. <sup>6</sup>   | 32,16 24h                | (da SILVA et al., 2012)  |
|                                        |                  |                       |                       | Folhas          |                         |                                |                      | 4,00 24h                 |                          |
| <i>Unonopsis guatteroides</i> R.E. Fr. | Annonaceae       | AM                    | Amazonia              | Casca           | Fração alcaloídica      | <i>L. a.</i> <sup>4</sup>      | Prom. <sup>6</sup>   | 2,79 24h                 | (da SILVA et al., 2012)  |
|                                        |                  |                       |                       | Galho           |                         |                                |                      | 1,07 24h                 |                          |
|                                        |                  |                       |                       | Folhas          |                         |                                |                      | 1,90 24h                 |                          |
| <i>Eugenia uniflora</i> L.             | Myrtaceae        | GO                    | Cerrado               | Folhas          | O.e. <sup>1</sup>       | <i>L. a.</i> <sup>4</sup>      | Prom. <sup>6</sup>   | 0,99 24hs                | (da SILVA et al., 2018b) |
| <i>Plinia cauliflora</i> (Mart.)       | Myrtaceae        | GO                    | Cerrado               | Folhas          | O.e. <sup>1</sup>       | <i>L. a.</i> <sup>4</sup>      | Prom. <sup>6</sup>   | 0,46 24hs                | (da SILVA et al., 2018b) |
| <i>Syzygium cumini</i> (L.)            | Myrtaceae        | GO                    | Cerrado               | Folhas          | O.e. <sup>1</sup>       | <i>L. a.</i> <sup>4</sup>      | Prom. <sup>6</sup>   | 8,78 24hs                | (da SILVA et al., 2018b) |
| <i>Eugenia pitanga</i> (O.Berg) Nied   | Myrtaceae        | RS                    | Pampa; Mata Atlântica | Folhas          | O.e. <sup>1</sup>       | <i>L. a.</i> <sup>4</sup>      | Prom. <sup>6</sup>   | 6.10                     | (KAUFFMANN et al., 2017) |

**Quadro 1.** (continuação)

| Espécie                               | Família Botânica | Região da coleta (UF) | Ocorrência                                  | Parte da planta | Preparação                                          | Espécie de <i>Leishmania</i> | Forma do protozoário | IC <sub>50</sub> (µg/mL) | Ref.                            |
|---------------------------------------|------------------|-----------------------|---------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------|
| <i>Ocimum canum</i> Sims.             | Lamiaceae        | MA                    | Amazônia                                    | Folhas          | O.e.*                                               | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Prom. <sup>6</sup>   | 17.4 ± 1.18              | (da SILVA et al., 2018a)        |
|                                       |                  |                       |                                             |                 |                                                     |                              | Amast. <sup>7</sup>  | 13.1 ± 0.93              |                                 |
| <i>Ocimum gratissimum</i> L.          | Lamiaceae        | PR                    | Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica | Folhas          | O.e.*                                               | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Amast. <sup>7</sup>  | 100 24h                  | (UEDA-NAKAMURA et al., 2006)    |
| <i>Sapindus saponaria</i> L.          | Sapindaceae      | PR                    | Norte; Nordeste; Centro-Oeste               | Frutos          | Oligoglicosídeos isolados do Extrato hidroetanólico | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Amast. <sup>7</sup>  | 52.11 ± 7.63             | (MOREIRA et al., 2017)          |
|                                       |                  |                       |                                             |                 |                                                     |                              | Prom. <sup>6</sup>   | 100.92 ± 1.56            |                                 |
| <i>Connarus suberosus</i> Planch.     | Connaraceae      | Distrito Federal      | Cerrado                                     | Casca da raiz   | Extrato EtOAc                                       | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Prom. <sup>6</sup>   | 27.57 48h                | (CORREIA DA COSTA et al., 2014) |
| <i>Copaifera reticulata</i> Ducke     | Fabaceae         | PA                    | Amazônia                                    | Caule           | Oleo-resina                                         | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Prom. <sup>6</sup>   | 5 72h                    | (SANTOS et al., 2008)           |
|                                       |                  |                       |                                             |                 |                                                     |                              | Amast. <sup>7</sup>  | 20 72h                   |                                 |
| <i>Copaifera</i> spp                  | Fabaceae         | Acre                  | Amazônia                                    | -               | Oleo-resina                                         | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Prom. <sup>6</sup>   | 30 ± 0.7                 | (MORAES et al., 2018)           |
|                                       |                  |                       |                                             |                 |                                                     | <i>L. i</i> <sup>5</sup>     |                      | 18 ± 0.2                 |                                 |
| <i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez. | Lauraceae        | MG                    | -                                           | Folhas          | O.e.*                                               | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Prom. <sup>6</sup>   | 4,46                     | (de ANDRADE et al., 2018)       |
| <i>Croton cajucara</i> Benth.         | Euphorbiaceae    | Pará                  | Amazônia                                    | Casca           | Diterp. isolado do Ext. hex.                        | <i>L. a</i> <sup>4</sup>     | Prom. <sup>6</sup>   | 12.07 ± 0.06 24h         | (LIMA et al., 2015)             |
|                                       |                  |                       |                                             |                 |                                                     |                              | Amast. <sup>7</sup>  | 0.47 ± 0.03 24h          |                                 |

1= Óleo essencial; 2= *Leishmania braziliensis*; 3= *Leishmania guyanensis*; 4= *Leishmania amazonensis*; 5= *Leishmania infantum*; 6= Promastigota; 7= Amastigota.

Muitas plantas têm sido estudadas para que se possa conhecer o mecanismo pelo qual agem no combate a esta doença. Suas formulações incluem diversas apresentações, porém, como é possível observar no **Quadro 1**, as mais comumente estudadas são os extratos e óleos. A avaliação da atividade de uma espécie vegetal é complexa e deve levar em consideração vários fatores, como a preparação de extratos usando solventes de diferentes polaridades e a parte da planta empregada na formulação (IZUMI et al., 2011). Sendo assim, estudos de caracterização e padronização dos compostos vegetais usados são muito importantes para entendermos a ação de grupos específicos presentes. A atividade leishmanicida de compostos isolados de plantas e seus análogos também se mostra bastante promissora (VARELA et al., 2017).

Além de informações relacionadas ao produto vegetal, numa avaliação de atividade leishmanicida é importante levar a consideração a espécie do parasito ou até mesmo a cepa. Muitos estudos realizados ultimamente avaliam apenas a atividade *in vitro*. Existem poucos estudos *in vivo* relacionados a leishmaniose e seu ciclo usando espécies vegetais brasileiras. Eles seriam importantes pois avaliaram vários fatores além da suscetibilidade do parasito, tais como, a capacidade da droga anti-*leishmania* de ser internalizada pelas células fagocíticas, a capacidade da molécula de resistir à degradação intracelular e possibilidade de citotoxicidade do hospedeiro (SEN; CHATTERJEE, 2011). Mesmo em estudos *in vitro* é de suma importância avaliar a atividade relacionada a doença, seus mecanismos de ação e morte levando em consideração a forma do parasito testada e também investigar uma possível toxicidade frente a células do hospedeiro vertebrado (DA SILVA B.J.M., HAGE A. A. P., SILVA, E. O., 2018).

Considerando o ciclo de vida dimórfico da *Leishmania*, sabe-se que cada forma necessita de condições ambientais e fisiológicas distintas e, conseqüentemente, reagem de maneira específica a cada agente leishmanicida, podendo ter uma resposta diferente frente a cada composto ou espécie vegetal avaliada (ESTEVEZ et al., 2007).

Estudos usando formas amastigotas refletem a situação da doença no organismo do mamífero e isso deve ser levado em consideração, visto que é o estágio parasitário mais relevante (CALLAHAN et al., 1997). Já a atividade frente a forma promastigota, fornece informações importantes sobre a especificidade do agente

testado servindo como uma triagem preliminar para identificar novos compostos, apesar desta não ser uma forma que se manifesta em mamíferos, do ponto de vista clínico da doença (ORYAN, 2015).

A atividade antiparasitária das espécies vegetais foi atribuída ao modo de obtenção dos derivados vegetais e às diversas classes de metabólitos secundários. Óleos essenciais de espécies da Família Myrtaceae (*Eugenia uniflora*, L., *Plinia cauliflora* (Mart.) and *Syzygium cumini* (L.)) presentes no cerrado brasileiro, apresentaram considerável atividade anti-*leishmania* dose dependente, que pode estar relacionada a presença de compostos terpenóides como os mono e sesquiterpenos. Sugere-se que a hidrofobicidade desses compostos pode favorecer a penetração na bicamada lipídica da membrana celular das células eucariotas. Isso resultaria numa alteração na permeabilidade e consequentemente na integridade celular, ao promover uma despolarização da membrana mitocondrial ou atuar em canais iônicos gerando alteração do pH e interferência na geração de energia na célula (BAKKALI et al., 2008; da SILVA et al., 2018b). Outros estudos com terpenos desta mesma família demonstraram que estes poderiam modificar o índice redox e inibição da biossíntese de isoprenóides celulares (KAUFFMANN et al., 2017).

O óleo essencial extraído das folhas de *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como Sacaca, foi testado em formas promastigotas de *L. chagasi*, causador da leishmaniose visceral, observando-se dano celular progressivo e dependente do tempo do tratamento, com a desorganização das organelas citoplasmáticas, alteração na estrutura mitocondrial, além de fragmentação do kDNA e condensação da cromatina nuclear (VERMELHO et al., 2013). Um diterpeno isolado do extrato hexânico da casca da mesma espécie, foi capaz de interferir no sistema tripanotona/ tripanotona redutase do protozoário, uma enzima envolvida na proteção contra o estresse oxidativo. Sugerindo-se que a enzima poderia ser um alvo para novos medicamentos, visto que é exclusiva de protozoários da família Kinetoplastida (LIMA et al., 2015).

Dentro da família Lamiaceae, a avaliação do óleo essencial das folhas de *Ocimum canum* mostrou atividade *in vitro* contra ambas as formas de *L. amazonensis*. A atividade contra as formas promastigotas foi apoiada por alterações ultraestruturais observadas no parasita tratado com o óleo, que induziu a formação de estruturas membranosas, vesiculares e tubulares, além de uma vesícula autofagossômica,

sugerindo uma desorganização das organelas citoplasmáticas, acúmulo de lipídios e o processo de autofagia (da SILVA et al., 2018a). Já o tratamento com o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* mostrou alterações mitocondriais como desorganização da matriz interna, edema e aumento das criptas. A mitocôndria parece ser um alvo comum para vários produtos naturais, como foi relatado em vários outros estudos (RODRIGUES et al., 2014). Mudanças no núcleo celular das formas de vida também foram observadas sugerindo uma alteração na divisão celular. Foi mostrado também que na presença do tratamento com o óleo essencial as promastigotas tinham menos interação com o macrófago, além de aumento do óxido nítrico. A atividade leishmanicida do óleo foi relacionada ao composto majoritário, eugenol. (UEDA-NAKAMURA et al., 2006).

Moreira et al. (2017) estudou a espécie *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae), onde identificou a atividade anti-*leishmania*, atribuída aos glicosídeos presentes no extrato hidroetanólico dos frutos. Estes compostos provocaram a morte celular por induzir processos apoptóticos, seguido de necrose devido a alterações morfológicas e estruturais na célula do parasito.

Na família Fabaceae, uma das mais representativas das angiospermas, temos gêneros que se destacam como potencialmente anti-*leishmania*. O *Copaifera spp* é um dos mais estudados. Popularmente conhecido como copaíba, é usado no Brasil há séculos na medicina popular, especialmente na região Amazônica. Seu oleoresina rico em diterpenos e sesquiterpenos atribui a espécie diversas propriedades biológicas como a atividade anti-inflamatória (CARVALHO et al., 2005) e antiprotozoária (VALENTIM et al., 2018). Estudos etnofarmacológicos também apontam o potencial dos seus óleos e derivados como potentes agentes leishmanicidas (KVIST et al. 2006; ALBUQUERQUE et al., 2017). Diversas espécies fazem parte desse gênero e apesar da composição químicas dos seus derivados variar de acordo com a área de ocorrência, época de coleta, dentre outros fatores o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno se destaca como composto majoritário, podendo então, estar relacionado a atividade antiprotozoária (SANTOS et al., 2008; SOARES et al., 2013). Diterpenos isolados do gênero como o ácido hridróxicopalico e metil-copalato também se mostraram potencialmente ativos contra as formas amastigotas e promastigotas (SANTOS et al., 2013). Entretanto apesar da atividade demonstrada pelos compostos isolados a natureza complexa de fitoconstituintes do seu oleoresina

mostra melhores resultados sugerindo que compostos terpenóides presentes no óleo de copaíba possam trabalhar sinergicamente para promover uma melhor inibição parasitária (IZUMI et al., 2012). A microscopia eletrônica de formas tratadas com a copaíba mostraram alterações estruturais diversas, tais como mudanças na morfologia típica, ruptura da membrana plasmática e desnaturação proteica sugerindo uma destruição do parasita ou afetando a interação parasita-hospedeiro. Além da despolarização do potencial da membrana mitocondrial observado por citometria de fluxo. Alterações significativas nas mitocôndrias podem levar à perda de viabilidade celular e confirmando a importância dessa organela para a viabilidade do parasita (OLIVEIRA; PRADO; FILHO, 2012). Em um estudo *in vivo* com mamíferos infectados por *L. amazonensis*, os animais tratados com o oleoresina de *C. marti* por via oral e tópica associadas apresentaram uma diminuição do tamanho da lesão que não mostrou diferença significativa quando comparado com o controle glucantime (SANTOS et al., 2011). A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* contra promastigotas infectadas por *L. amazonensis* e *L. infantum* de nanoemulsões obtidas a partir do óleo essencial da Copaíba (*Copaifera spp.* Linnaeu) mostrou um IC<sub>50</sub> de 30 ± 0.7 µg / mL e IC<sub>50</sub> de 18 ± 0.2 µg / mL respectivamente após 48 horas de tratamento. Já os macrófagos infectados, quando tratados pela nanoemulsão demonstraram uma diminuição do índice de infecção das células para ambas as espécies do protozoário. O estudo *in vivo* usando camundongos Balb/c infectados foi feito para determinar se as nanoemulsões podem alterar o curso da infecção nos modelos de leishmaniose visceral e cutânea. Observou-se redução da carga parasitária e melhora no aspecto das lesões dos animais que receberam a nanoemulsão por via oral (MORAES et al., 2018).

#### **1.1.4 *Pterodon* Vogel**

O gênero *Pterodon* Vogel, uma angiosperma da família Fabaceae Lindl, contempla quatro espécies. São elas, *Pterodon abruptus* (Moric.) Benth., *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon emarginatus* Vogel, *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. Este gênero é nativo do Brasil e ocorre nas regiões Norte (nos Estados de Rondônia e Tocantins), Nordeste (na Bahia, no Ceará, no Maranhão e em Piauí),

Centro-oeste (no Distrito Federal e nos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (em Minas Gerais e em São Paulo) (FLORA DO BRASIL, 2020).

As plantas, por meio de reações bioquímicas, produzem diversos compostos orgânicos necessários à sua sobrevivência. Porém, estes compostos também produzem efeitos em outros organismos, com isso, o interesse científico por estes compostos é cada vez maior (BAVARESCO et al., 2016). Diversas pesquisas envolvendo o gênero *Pterodon* Vogel tem sido realizadas em função deste grupo apresentar importantes constituintes químicos como Isoflavonas e alcalóides nas cascas do caule e diterpenos no óleo das sementes (MIRANDA, et al., 2014).

Santos e colaboradores (2010) avaliaram a composição química do extrato etanólico bruto e do óleo essencial das folhas de *P. emarginatus* Vogel e a atividade antimicrobiana do óleo essencial. O extrato foi analisado em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e em comparação com dados da literatura onde foi possível identificar uma mistura de fitoesteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Enquanto no óleo essencial foram identificados compostos classificados como hidrocarbonetos sesquiterpênicos, com reconhecidas atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante, o que justifica a atividade antibacteriana moderada frente a bactérias Gram-positivas. Neste trabalho as células foram expostas ao extrato nas concentrações de 150, 300, 450 e 600 $\mu$ g/ml, ocorrendo uma diminuição significativa das células infectadas para 73,2, 68,2, 60 e 30,1%, respectivamente, demonstrando uma atividade dose-dependente. Observou-se ainda que a dose 600 $\mu$ g/ml foi capaz de diminuir a concentração de amastigotas intracelulares em relação ao grupo controle. Além disso, os autores realizaram uma triagem fitoquímica no extrato, onde identificaram a presença de taninos, flavonóides, esteróides, triterpenóides e xantinas. De acordo com a literatura xantina e flavonóides já apresentaram atividades antibacteriana, antitumoral, antitripanossômica e antimalárica. É importante ressaltar que a utilização do extrato não afetou a viabilidade ou morfologia celular.

#### **1.1.5 *Pterodon emarginatus* Vogel**

A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel, popularmente conhecida como “Fava-de-sucupira”, “faveiro”, “sucupira” e “sucupira-branca”, pertence à família Fabaceae (Leguminosae) e à subfamília Faboideae. Pode atingir de 5 a 10m de altura, seus

troncos possuem diâmetros de até 70cm e casca que descama em árvores velhas, ocasionalmente com rachaduras ou fissuras. Suas folhas são compostas, alternadas, com 14 a 20 folíolos, de 2 a 6cm de comprimento e 1 a 4cm de largura e suas flores possuem até 1cm de diâmetro, com cinco pétalas de cor violácea a azul (SANTOS et al., 2010; RAPOSO; DUTRA; FERREIRA, 2011; BRASIL, 2016). Seu fruto é criptossâmara de até 5cm de comprimento, achatado, elíptico, seco, de cor bege a marrom com uma ala membranácea por toda a sua extensão e com uma semente de até 0,8cm de comprimento, que quando madura apresenta grande dureza, baixa permeabilidade à água e alta resistência ao ataque de patógenos, características atribuídas a presença de compostos fenólicos (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010; BRASIL, 2016).

**Figura 4** - Árvore de *P. emarginatus*



Fonte: Brasil, 2016.

**Figura 5** – Frutos de Sucupira-branca



Fonte: Próprio autor.

Esta é uma espécie arbórea aromática, não endêmica, nativa do cerrado brasileiro. Ocorre nas regiões Norte (Rondônia e Tocantins), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), em terrenos secos e arenosos, solos bem drenados e com teores mais elevados de cálcio. (LIMA; LIMA, 2015). *P. emarginatus* tem demonstrado uma importância medicinal e florestal muito grande, visto as propriedades químicas comprovadas do seu óleo, bem como a utilização desta árvore para recuperar áreas degradadas, pois é muito tolerante a luz solar direta e a baixa fertilidade do solo (OLIVEIRA; PAIVA, 2005). Sua madeira é considerada pesada (densidade 0,94g/cm<sup>3</sup>), compacta e duradoura mesmo quando em contato com o solo e a umidade, sendo usada normalmente na construção civil, construção

naval, em pontes, ferrovias, pisos de vagões, carvão e lenha (RAPOSO; DUTRA; FERREIRA, 2011).

#### **1.1.6 Óleo de *P. emarginatus***

O gênero *Pterodon* começou a ser estudado após descobrir-se que o óleo da semente de *P. pubescens* inibiu a penetração de cercárias de esquistossoma na pele, fato atribuído às substâncias 14,15-epóxi- geranilgeraniol e posteriormente ao 14,15-dihidroxi-14,15-dihidrogeranilgeraniol, presentes no óleo (RAPOSO; DUTRA; FERREIRA, 2011). Odor característico desses diterpenos e atividade farmacológica similar são encontrados em outras espécies do gênero, como em *P. emarginatus*, o que indica a presença deste grupamento na composição química dessa espécie (DUTRA et al., 2009a).

Estudos fitoquímicos no gênero *Pterodon* mostraram a presença de compostos alcalóides, triterpenóides (DUTRA et al., 2012), flavonóides e heterosídeos saponínicos na casca, que conforme Bustamante et al. (2010) demonstrou, apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e o fungo *Cândida albicans*. Na madeira foram encontrados isoflavonas e triterpenos. Nas folhas,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol e nas sementes, diterpenos e isoflavonas (SANTOS et al., 2010; DUTRA et al., 2012).

Devido a sua constituição química, a semente de *P. emarginatus* é a parte de maior interesse nas pesquisas farmacêuticas. Dela é possível obter um óleo viscoso de cor âmbar que tem sido considerado uma importante matéria-prima, principalmente por conter uma grande quantidade de compostos diferentes capazes de produzir diversas atividades farmacológicas no organismo. Foram identificadas presença de trans-cariofileno (35,9%),  $\beta$ -elemeno (15,3%), germacreno D-(9,8%),  $\alpha$ -humuleno (6,8%), espatulenol (5,9%), biciclo germacreno (5,5%) (DUTRA et al., 2012) e diterpenos como 6 $\alpha$ -7 $\beta$  diacetoxivouacapan-17 $\beta$ -oato de metila (OLIVEIRA; PAIVA, 2006; HANSEN et al., 2010; DUTRA et al., 2012).

**Figura 6** – Óleo dos frutos de *P. emarginatus*.



Fonte: Próprio autor.

O seu elevado uso na medicina tradicional popular tem atraído interesse de pesquisadores que buscam comprovar os efeitos relatados. Faria et al. (2017) testou a oleoresina de *P. emarginatus* contra fêmeas adultas de *Sarcoptes scabiei in vitro*, onde apresentou o melhor resultado, com 100% da mortalidade dos ácaros. Assunção et al. (2015) avaliou o potencial citotóxico, genotóxico e antigenotóxico do óleo de sucupira em camundongos utilizando o teste de micronúcleo da medula óssea, o óleo foi testado na concentração 100mg/Kg e ao final do estudo concluiu que, nessa concentração, o óleo de sucupira não apresenta atividade citotóxica, mutagênica ou antimutagênica. Santos et al. (2018) realizou um estudo *in vivo* e *in silico* da atividade antiinflamatória do óleo de sucupira, os resultados obtidos indicam que o óleo tem essa atividade, como já é de conhecimento da população que o utiliza tradicionalmente, e esse efeito foi comprovado no estudo *in vivo* utilizando um modelo animal e no estudo *in silico* utilizando um software, onde através das ligações químicas do composto majoritário presente no óleo com as proteínas envolvidas no processo inflamatório teve-se o resultado condizente com o estudo etnobotânico.

Alguns estudos atualmente estão trazendo novas tecnologias agregadas aos potenciais farmacológicos dos derivados vegetais, Oliveira et al. (2016) desenvolveu uma nanoformulação contendo óleo dos frutos de *P. emarginatus* e avaliou sua atividade contra o vetor da dengue, *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram que o produto nanobioteecnológico a base de oleoresina de sucupira teve forte atividade larvicida contra o vetor da dengue, demonstrando que ele pode vir a ser um importante inseticida no combate a essa endemia devido à característica da nanoemulsão, óleo em água. Isto proporciona uma melhor solubilidade do produto em meio aquoso que é comumente um local onde se aplicam os inseticidas de combate à dengue na fase larval. Outra nanoformulação desenvolvida por Oliveira et al. (2017a) teve como base o oleoresina de sucupira. Este trabalho investigou o efeito contra *Culex*

*quinquefasciatus*, responsável pela elefantíase. O desenvolvimento da nanoemulsão utilizou um método de baixo aporte de energia, livre de calor e de solventes. E teve como resultado um produto diferenciado do que se encontra em outros estudos com *P. emarginatus*, de baixo custo e que não causará prejuízos ecológicos. O produto mencionado se mostrou promissor no controle deste vetor, apresentando resultados bastante satisfatórios e indicando um potencial inseticida no combate a esta doença negligenciada.

Alguns estudos também avaliaram potenciais atividades do óleo essencial. Dutra et al. (2009b) avaliou a atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* e atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (isoladas de paciente com leishmaniose cutânea difusa) e de *Leishmania chagasi* (isoladas de pacientes com leishmaniose visceral). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em Ágar, onde os microorganismos foram expostos a diferentes concentrações do óleo essencial da semente de *P. emarginatus*. O óleo essencial causou inibição no crescimento de *S. aureus*, fato este que pode ter sido decorrente da presença dos constituintes trans-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno, uma vez que já foi relatada tal atividade para estes constituintes. Para a atividade leishmanicida os protozoários foram expostos ao óleo essencial e às frações hexânicas, butanólicas e metanólicas das sementes. Os resultados obtidos mostraram que as frações hexânicas e butanólicas indicaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Oliveira et al. (2017b) também testou o óleo essencial de *P. emarginatus*, porém, em uma formulação nanotecnológica contra o *Aedes aegypti*. Tal estudo demonstrou que a nanoemulsão apresentou um grande potencial larvicida.

Outro estudo antileishmaniose utilizando o gênero *Pterodon* foi realizado por Arrais et al. (2014), onde amastigotas de *L. amazonensis* foram isoladas de lesões cutâneas ativas de camundongos BALB/c e expostas ao extrato etanólico de *Pterodon pubescens*, sendo possível constatar a diminuição da carga parasitária. O extrato de *P. pubescens* induziu a resistência de macrófagos a *L. amazonensis* sem efeitos colaterais para as células hospedeiras.

### 1.1.7 Nanoemulsões

O estudo de novas tecnologias dentro das ciências da saúde propicia o surgimento de diversas ferramentas para as pesquisas, como por exemplo, estratégias terapêuticas que melhorem a administração dos fármacos e consequentemente sua efetividade. Drogas nanoestruturadas (principalmente as nanodispersões como nanopartículas e nanoemulsões) têm se mostrado uma ótima alternativa para melhorar a biodisponibilidade e a solubilidade dos fármacos (SILVA et al., 2011; BALDISSERA et al., 2013).

As formulações denominadas nanoemulsões são sistemas dispersos constituídos de dois líquidos imiscíveis, onde um deles está disperso no outro na forma de pequenas gotículas com tamanho que varia entre 20 a 200nm. Porém, a imiscibilidade cria uma tensão na interface entre os dois líquidos levando a instabilidade termodinâmica do sistema, para tanto, pode-se obter nanoemulsões estáveis utilizando-se tensoativos, que mesmo em baixas concentrações são capazes de garantir estabilidade, inclusive pelo período de armazenamento, evitando a agregação de partículas (OLIVEIRA et al., 2016). Este efeito deve-se ao Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL), representação numérica da característica química dos surfactantes, substâncias constituídas de grupos hidrofílicos (polares) e lipofílicos (apolares) na mesma molécula (GRIFFIN, 1949).

Nanoemulsões podem ser obtidas por dois tipos de método, os de alto aporte de energia e os de baixo aporte de energia. Nos métodos de alto aporte de energia são aplicadas tensão de cisalhamento mecânica para romper as fases de óleo e água e assim, obter gotículas nanométricas. São eles, homogeneizadores de alta pressão, na qual uma dispersão grosseira passa por um orifício sob turbulência intensa; microfluidizadores, quando se utiliza uma bomba que força passagem da emulsão por microcanais ou ultrassom, quando a emulsão é submetida à ondas ultrassônicas rompendo as gotículas primárias deixando -as em tamanho nanométrico. Já os de baixo aporte usam a energia química dos constituintes. Eles podem ocorrer por emulsificação espontânea, quando a fase interna é solubilizada em um solvente orgânico e vertidos na fase aquosa com posterior retirada do solvente, ou por inversão de fases por temperatura, onde os constituintes da emulsão são submetidos à variação de temperatura durante o processo de emulsificação. Os métodos de alta

energia são mais utilizados pela facilidade de se obter emulsões nanométricas em um curto tempo, porém, eles não são propícios à produção em larga escala por serem métodos dispendiosos e necessitarem de equipamentos específicos para o desenvolvimento. Enquanto os de baixa energia, após o processo de padronização de método de obtenção de nanoemulsão, podem ser muito interessantes para as indústrias, visto a menor dificuldade de uma possível produção em larga escala (ALMEIDA; TEIXEIRA E KOESTER, et al., 2008; ASSIS et al., 2012; BRUXEL et. al., 2012; BAJERSKI, et al., 2016)

Além do método de desenvolvimento, a escolha dos componentes também requer uma seleção adequada. Em função da sua constituição a emulsão pode ser classificada como água em óleo (A/O), quando uma fase contínua oleosa guarda um núcleo aquoso e óleo em água (O/A), quando uma fase contínua aquosa, guarda um núcleo oleoso. Esta última é a mais utilizada, devido a facilidade de solubilizar-se no organismo. A combinação de óleos e tensoativos tem se mostrado impactante para a qualidade de uma nanoemulsão. Os óleos vegetais têm sido muito utilizados como núcleo oleoso em função de apresentar alta biocompatibilidade, menos toxicidade e muitas propriedades terapêuticas (FRANZOL; REZENDE, 2015; BAJERSKI, et al., 2016)

As nanoemulsões vêm sendo uma alternativa para viabilizar a utilização de substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água. Além disso, o tamanho reduzido das nanoemulsões confere diversas vantagens às formulações farmacêuticas, entre elas estão a melhora na farmacocinética e na biodistribuição de agentes terapêuticos, na solubilidade de substâncias lipofílicas (como os óleos vegetais) e proteger as substâncias contra agentes externos (FERREIRA et al., 2010; PAINES et al., 2015).

Uma nanoemulsão contendo associação de clotrimazol e óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca), foi incorporada em hidrogéis de carbopol e foi avaliada quanto a sua propriedade antifúngica e físico-química. Durante avaliação macroscópica das nanoemulsões foi possível perceber que apresentavam uma cor levemente branca leitosa e reflexo azulado, bem como gotículas na escala nanométricas e baixo valor de polidispersão, indicando homogeneidade e boa incorporação no gel, devido a característica hidrofílica da nanoestrutura. O processo também não acarretou uma degradação significativa do fármaco, pois a concentração se apresentou bem próxima à teórica. Quanto a atividade antifúngica do fármaco em

nanoemulsão e em solução frente à *Cândida albicans*, não houve diferença significativa entre os halos de inibição, além disso, em oito horas,  $22,95 \pm 5,49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (4.59%) de clotrimazol foi liberado a partir de um hidrogel contendo o fármaco não nanoemulsionado e uma quantidade de  $11,80 \pm 1,89 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (2.36%) foi liberada a partir do hidrogel contendo o fármaco nanoemulsionado, demonstrando a capacidade da nanoemulsão em controlar a liberação *in vitro* do fármaco. Esta característica de liberação controlada é interessante para reduzir o número de doses (PAINES et al., 2015).

Uma formulação nanotecnológica de Oliveira et al. (2017a) foi desenvolvida utilizando um método de baixa energia. Uma nanoemulsão contendo oleoresina de *Pterodon emarginatus* foi desenvolvida e testada sobre o *Culex quinquefasciatus*, responsável pela elefantíase. O resultado foi promissor no controle deste vetor indicando um potencial inseticida com a obtenção de um produto livre de solventes, o que representa um ganho ecológico.

Com base nisso, este estudo trouxe uma proposta de um produto elaborado a partir de uma nanotecnologia, sendo esta uma nanoemulsão contendo oleoresina de sucupira, para tratar uma doença de grave importância pública, a leishmaniose. Diversos são os métodos pelos quais obtém-se, uma nanoemulsão, mas a escolha deste trabalho é por um método de baixo aporte de energia e menor utilização possível de tensoativos e outros produtos químicos.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 GERAL

Avaliar a potencial atividade leishmanicida de uma nova nanoformulação desenvolvida a partir do oleoresina dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel *in vitro* e *in vivo* frente ao protozoário da leishmaniose tegumentar americana.

### 2.4 ESPECÍFICOS

#### *in vitro*

- a) Desenvolver uma nanoemulsão por um método de baixo aporte de energia a partir do oleoresina de *Pterodon emarginatus*;
- b) Avaliar a atividade leishmanicida da nanoemulsão obtida frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

#### *in vivo*

- a) Construir uma curva dose-resposta para avaliar a eficácia do oleoresina obtido dos frutos de *P. emarginatus* no tratamento tópico de camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. (L.) Amazonensis*, através da determinação da carga parasitária (lesão e baço);
- b) Desenvolver uma nanoemulsão otimizada contendo a concentração de oleoresina de *P. emarginatus* com melhor resultado no estudo dose-resposta;
- c) Fazer a caracterização da nanoemulsão obtida quanto ao tamanho de partícula e o índice de polidispersão;
- d) Analisar a evolução da lesão cutânea em camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) amazonensis* quando tratados com a nanoemulsão de oleoresina de sucupira.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1 PRODUTOS QUÍMICOS

O Monooleato de sorbitano (span 80), o Polissorbato 80 (tween 80) foram adquiridos da Praid Produtos Químicos Ltda. (SP, Brasil). Triglicerideo de cadeia média (TCM) foi adquirido da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) O antimoniato de meglumina (Glucantime® 300 mg/mL, 81mg/mL Sb+5) utilizado para os testes *in vivo* de avaliação da ferida foi adquirido da Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil. Para a quantificação de citocinas por Elisa, foi utilizado o kit BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA). Demais reagentes utilizados foram adquiridos em grau analítico.

#### 3.2 MATERIAL VEGETAL

Os frutos de *P. emarginatus* (Fabaceae) foram obtidos no Mercado Central de Goiânia – GO (Brasil). A identificação do material vegetal foi realizada pelo Dr. José Realino de Paula e a exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás (GO, Brasil) sob o número de registro 41714.

#### 3.3 OLEORESINA DE *P. emarginatus* (OS)

A oleoresina dos frutos de *P. emarginatus* foi obtida por prensagem a frio, utilizando-se uma mini-prensa mecânica (MPE-40 ECIRTEC). Foi então pesada e hermeticamente armazenada em frasco de vidro âmbar e mantido a 20°C. Todo procedimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Bioprodutos da Universidade Federal de Goiás e gentilmente cedido pelo Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.

#### 3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-MS)

A OS foi esterificado de acordo com Bannon et al. (1982) antes da injeção de GC, a fim de remover ácidos gordos livres. A análise foi realizada utilizando uma

cromatograma GC-MS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida (Rxi-5ms™ 30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno, 0,25µm de espessura de fase); programa de temperatura (100 - 260°C a 4°C/5 min, depois 5°C/min a 260°C, terminando com uma isoterma de 20 min a 280°C); gás portador (hélio); taxa de fluxo (0,96mL min<sup>-1</sup>); razão de divisão (1:40); porta de injeção (250°C); temperatura da fonte de íons (200°C); temperatura da interface (250°C); ionização por impacto de electrons (70eV); gama de massas de varrimento (35-400m/z) e taxa de amostragem (1,0varrimentos/s).

### 3.5 ESTUDOS *in vitro*

#### 3.5.1 Método de emulsificação

Para a realização dos estudos *in vitro* foi desenvolvida uma nanoemulsão contendo a oleoresina dos frutos de Sucupira (NEOS5) por um método de baixo aporte de energia conforme (OLIVEIRA et al., 2017a). As emulsões avaliadas foram constituídas de 90% (p/p) de água, 5% (p/p) de OS e 5% (p/p) dos agentes tensoativos monooleato de sorbitano e o polissorbato 80 em diferentes proporções. A fase oleosa composta pelos tensoativos e OS foi submetida a agitação de 2400rpm em vórtex (VELP Scientifica) por 1 minuto sob temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa (água destilada) foi adicionada sob gotejamento contínuo. Após a total incorporação da água a mistura foi agitada por mais 3 minutos. A massa final obtida foi de 10g.

#### 3.5.2 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr)

A determinação do EHLr de *P. emarginatus* foi realizada pela mistura do monoleato de sorbitano (EHL – 4,3) e polissorbato 80 (EHL - 15) em diferentes proporções conforme equação abaixo a fim de obter várias emulsões em uma ampla faixa de EHLr (9 -15).

$$EHL_m = \frac{[(EHL_{sm} \times m_{sm}) + (EHL_{p80} \times m_{p80})]}{(m_{sm} + m_{p80})}$$

Onde: EHL<sub>m</sub> – EHL da mistura

EHL<sub>sm</sub> - EHL do monoleato de sorbitano (4,3);

EHL<sub>p80</sub> - EHL do polissorbato 80 (15);

m<sub>sm</sub> e m<sub>p80</sub> - massa de cada tensoativo.

A composição e preparação das nanoemulsões foi realizada de acordo com o método de emulsificação 3.5.1.

### 3.5.3 Caracterização das nanoemulsões

Ao todo foram preparadas sete NEOS5 dentro da faixa de EHL de 9-15. Primeiramente, estas foram colocadas em ambiente plano, sem incidência de luz e em repouso por 24 horas. Foram observados os aspectos físicos como cor, fluidez e a ocorrência de processos de separação de fases ou cremagem com o objetivo de identificar algum sinal de instabilidade (OLIVEIRA et al., 2016). Nanoemulsões que não apresentaram sinais de separação de fases ou cremagem foram então avaliadas quanto ao tamanho de partícula, polidispersão e potencial zeta no equipamento de espectroscopia de correlação de fótons, Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, United Kingdom), diluídas em água purificada (1:40). As medições do tamanho de gotícula foram feitas em triplicata e o tamanho médio de partícula foi expresso como a média do diâmetro  $\pm$  desvio padrão.

### 3.5.4 Efeito da NEOS5 na viabilidade de promastigota *in vitro*

A concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) da NEOS5 contra os promastigotas de *L.(L). amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foi determinada usando o ensaio colorimétrico à base de alamar blue (resazurina) (CORRAL et al., 2013). Promastigotas em fase logarítmica ( $2,5 \times 10^5$  parasitas/ poço) foram adicionadas a placas de cultura de células de 96 poços, fundo plano, com meio Schneider completo e incubadas a 26°C. As NEOS5 e o OS não encapsulado foram diluídos nas concentrações de 200ppm, 100ppm, 50ppm, 25ppm, 12.5ppm e 6.125ppm. Um controle de tensoativos e um

controle positivo de anfotericina (0,2µg/ml) também foi avaliado. Parasitas não tratados foram utilizados como comparação. As células foram incubadas com as substâncias por 48h. Após o período de incubação foi adicionada solução de resazurina (10%v/v) aos poços e as placas foram novamente incubadas por 4h. A fluorescência foi medida com excitação de 550nm e comprimento de onda de emissão de 590nm.

### 3.6 ESTUDOS *in vivo*

#### 3.6.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, e Hamsters Golden foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil). Os animais foram mantidos no biotério em área com ciclo luz/escuro padronizado e receberam água e comida *ad libitum*. A estante em que foram alojados era ventilada com sistemas de insuflamento, exaustão e filtração de ar em condições que atendam às exigências éticas e de bem estar, bem como proporciona o isolamento adequado dos animais infectados, evitando contaminação de outros animais e dos pesquisadores. O gabinete, por sua vez foi localizado numa sala provida de janela telada, ciclo de luz e controle da temperatura, dificultando assim um possível acesso de flebotomíneos aos animais infectados. Além disso, o acesso a esta sala foi restrito àqueles que fazem experimentação animal, aumentando o nível de segurança. Os procedimentos envolvendo animais estavam de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Experimentação e Controle de Animais (Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasil).

Para o estudo dose-resposta e para o teste de avaliação da ferida foram utilizados 28 camundongos fêmeas BALB/c em cada. Nos dois estudos os animais tinham um peso corporal de aproximadamente 20-22g. Todos os ensaios usando animais foram realizados no Biotério de Experimentação Animal do Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal de Minas Gerais (LTF-UFMG).

Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA / UFMG) (191/2018 e 392/2018).

### 3.6.2 Medicamento de referência

O antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) foi utilizado para os testes *in vivo* de avaliação da ferida.

### 3.6.3 Obtenção do parasita

As cepas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foram cultivadas em meio Schneider's, acrescido de 20% soro fetal bovino inativado (SFB) e 100UI/mL de penicilina+ estreptomicina. A cultura foi mantida em estufa BOD com controle de temperatura a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  na sala de cultura do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (LTF- Fafar - UFMG).

### 3.6.4 Inoculação nos animais

O procedimento foi realizado conforme proposto por Aguiar et al. (2010). Para propagação *in vitro* de promastigotas da *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) foi utilizado o meio Schneider, completo, enriquecido com 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado. As promastigotas foram mantidas em cultivo até atingirem a fase estacionária de crescimento. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

Hamsters Golden (idade: cerca de 5 semanas) foram tricotomizados e inoculados com um volume 0,1mL, via subcutânea, na base da cauda com  $1 \times 10^9$  promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Os animais foram eutanasiados, quando apresentaram nódulos bem definidos sem úlcera, em câmara de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o nódulo foi removido e os fragmentos de tecido triturados em Ultra-Turrax (IKA, Alemanha) em meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino e 10µL/mL de solução contendo 100UI penicilina potássica e 10µg/mL de sulfato de estreptomicina. Em seguida, o tecido foi centrifugado (centrifuga Thermo Scientific Heraeus) a 50g por 2 minutos para sedimentação. O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado (Thermo Scientific Heraeus) a 1700g por 15 minutos. O pellet formado foi ressuspensionado em meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino e 10µL/mL de solução contendo 100UI de

penicilina potássica e 10µg/mL de sulfato de estreptomicina de forma a obter uma suspensão com  $5,0 \times 10^7$  amastigotas/mL, contadas em câmara de Neubauer.

Uma quantidade de 28 animais, camundongos fêmeas BALB/c (idade: cerca de 5 semanas) foram tricotomizados e inoculados com um volume 0,02mL, via subcutânea, na base da cauda, com  $5 \times 10^6$  amastigotas/mL de *L. (L.) amazonensis* recém isoladas dos nódulos dos Hamsters. O desenvolvimento das lesões foi monitorado por meio de medidas do diâmetro médio.

### **3.6.5 Estudo da Dose-Resposta**

Inicialmente para determinação da melhor dose de OS efetiva por via tópica nas feridas foi conduzido um estudo dose-resposta (CALDEIRA et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017). Para preparar a solução de OS, o óleo foi solubilizado (sob agitação em vortex) em óleo inerte (triglicerídeo de cadeia média – TCM) a 5, 10, ou 20%p/p.

Após o desenvolvimento de lesões ulceradas (diâmetro médio, 7 a 9 mm), os camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos (n = 7) de acordo com o diâmetro da lesão para assegurar tamanhos médios semelhantes entre todos os grupos.

- G 1 (controle; tratado apenas com óleo inerte);
- G 2 (OS diluído em óleo inerte (TCM) 20% (p/p)
- G 3 (OS de sucupira diluído em óleo inerte (TCM) 10%;
- G 4 (OS diluído em óleo inerte (TCM) 5%

As lesões foram cobertas com 20µL de OS -solução (5; 10 ou 20%p/p) duas vezes por dia, durante 21 dias consecutivos. Para este estudo a eficácia do tratamento foi avaliada através da medição das dimensões das lesões.

### **3.6.6 Método de emulsificação da Nanoemulsão de Oleoresina de Sucupira 20% (NEOS20)**

Após a obtenção da melhor resposta de OS, uma nanoemulsão foi produzida para o estudo *in vivo*. A nanoemulsão foi obtida de acordo com o método utilizado por Oliveira et al. (2017), com algumas modificações. A fase oleosa foi constituída pelos

tensoativos não-iônicos (polissorbato 80 / monooleato de sorbitano) e o OS, enquanto a fase aquosa foi composta por água deionizada. Antes da nano-emulsificação, os componentes da fase oleosa foram agrupados, suavemente misturados durante 1 minuto e após foi adicionada uma solução aquosa de etanol a 96%(v/v). Na sequência a fase aquosa foi inserida lentamente na fase oleosa sob vigorosa agitação em vórtex e a geração das nanoemulsões foi evidenciada pelo aparecimento de reflexos azulados. A nanoemulsão teve a seguinte composição final: polissorbato 80 (6,26%) monooleato de sorbitano (3,73%), etanol 96% (v/v) solução aquosa (2%), OS (20%), água (68%).

### **3.6.7 Caracterização da NEOS20**

A NEOS20 foi caracterizada pela distribuição do tamanho das gotas e índice de polidispersidade (Pdl) utilizando um Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). As amostras foram medidas a 25°C, a um ângulo de 173° e os resultados expressos como a média do diâmetro  $\pm$  desvio padrão. Estes parâmetros foram avaliados em momentos diferentes (0 - dia inicial, 1, 7, e 14 dias após a preparação e armazenados à temperatura ambiente). Todas as medições foram realizadas em triplicata. Também foram observados os aspectos físicos como cor, fluidez e a ocorrência de processos de separação de fases ou cremagem com o objetivo de identificar algum sinal de instabilidade.

### **3.6.8 Estudo da avaliação das feridas após o uso tópico da NEOS20**

Num segundo estudo avaliou-se a eficácia da combinação de NEOS20 tópico e do antimoníato de meglumina (Glucantime®) no tratamento de lesões causadas por *L. (L.) amazonensis*. Para o desenvolvimento das lesões os subitens 3.6.3 e 3.6.4 foram repetidos. Após receber as injeções subcutâneas (na região próxima a cauda) de  $5 \times 10^6$  amastigotas/mL de *L. amazonensis* em fase estacionária e o desenvolvimento de lesões ulceradas, os ratos BALB/c foram divididos em quatro grupos (n = 7):

- Para o grupo NEOS20, as lesões foram cobertas com 20 $\mu$ l de NEOS 20% p/p duas vezes ao dia por 30 dias consecutivos.

- Para o grupo antimoniato de meglumina, os animais foram tratados com Glucantime® a 100 mg/Kg/dia, administrado por via intraperitoneal, uma vez ao dia por 30 dias.
- Para o grupo tratado em associação de NEOS20 e antimoniato de meglumina, as lesões receberam um tratamento tópico (NEOS 20% p/p), conforme descrito anteriormente para o grupo NEOS. Além disso, os animais foram tratados com Glucantime®, que era intraperitoneal da mesma maneira que no grupo antimoniato de meglumina.
- Para o grupo controle, os animais não foram tratados.

A eficácia do tratamento foi avaliada medindo-se, semanalmente, com ajuda de um paquímetro digital o tamanho das lesões, bem como pela análise histopatológica, Elisa para dosagens de citocinas (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) e quantificação da carga parasitária nas lesões após a eutanásia.

### **3.6.9 Medidas do tamanho da lesão e do peso dos animais**

Durante o tratamento, as dimensões das lesões foram medidas semanalmente utilizando um paquímetro digital (Mitutoyo, Brasil). O tamanho da lesão foi determinado através da obtenção do valor médio entre a linha mais longa que podia ser traçada de uma borda da lesão para outra e a linha que bissectou esta distância a um ângulo de 90° (AGUIAR et al., 2010). A observação cuidadosa das patas e caudas avaliou o aparecimento de metástases noutros locais na pele dos animais. A determinação do peso dos animais foi avaliada até 30 dias de tratamento com NEOS20. Outros sinais como a piloereção foram utilizados como indicadores da toxicidade do tratamento.

### **3.6.10 Avaliação da eficácia dos tratamentos através da avaliação da carga parasitária na lesão**

Para avaliação da eficácia do tratamento os animais foram eutanasiados no terceiro dia após o fim do tratamento em câmara de CO<sub>2</sub> e foi determinada a carga parasitária no sítio de infecção (lesão). A lesão foi pesada, triturada (Ultra-turrax, IKA) em meio Schneider contendo 20% de soro fetal bovino e 10 $\mu$ L/mL de solução

contendo 100UI de penicilina potássica e 10µg/mL de sulfato de estreptomicina. Em seguida, foi centrifugada (Thermo Scientific Heraeus) a 50g por 2 minutos para sedimentação. O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado a 1700g por 15 minutos. O pellet foi ressuspenso em 1mL de meio de Schneider contendo 20% de soro fetal bovino e 10µL/mL de solução contendo 100UI de penicilina potássica e 10µg/mL de sulfato de estreptomicina. Em triplicata, foram realizadas diluições sucessivas em placa de cultivo de 96 orifícios estéreis e estas foram incubadas a 23°C por 7 dias. Após o período, a presença de parasitas em cada poço foi examinada num microscópio invertido. A carga parasitária foi determinada a partir da mais alta diluição na qual foi observado crescimento (AGUIAR et al., 2010). Os resultados foram expressos como a média obtida a partir da triplicata.

#### **3.6.11 ELISA para quantificação de citocinas na lesão cutânea**

A quantificação de citocinas em sobrenadantes da cultura foi realizada por ELISA conforme proposto por (OLIVEIRA et al., 2017c). Após a eutanásia dos animais a lesão foi retirada e homogeneizada com solução de extração em ultra-turrax (IKA, Alemanha). Logo após a solução foi centrifugada em centrífuga (Thermo Scientific Heraeus) por 10 min a 4°C e 10.000rpm. A quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura foi feita por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Para tanto, foram utilizados kits da linha BD OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) para dosagem das citocinas IFN-γ e IL-10 de acordo com orientações do fabricante. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com os anticorpos de captura overnight, a 4°C. Em seguida, foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e secas em papel toalha. Foram adicionados, então, o padrão e as amostras, e seguiu-se a incubação à temperatura ambiente, por duas horas. As placas foram lavadas e os poços receberam o reagente de detecção, contendo o anticorpo de detecção e o reagente enzimático. Após incubação por uma hora à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas, para adição do substrato enzimático H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do reagente de cor, orto-fenilenodiamina (OPD – Sigma Aldrich Inc.). Após trinta minutos de incubação à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3mol/L. Procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 492nm,

utilizando o leitor Emax Molecular Devices e o software SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

### **3.6.12 Análise Histológica**

Após o procedimento de eutanásia, as amostras de pele das lesões foram colhidas e fixadas em tampão formalina neutro 10% (pH 7,2), durante um período mínimo de 48 h. Após o processamento, os fragmentos das lesões foram embebidos em parafina, submetidos a microtomia com 5 µm, e corados com H&E. As imagens foram obtidas utilizando uma microcâmara (Q-Color5, Olympus) acoplada ao microscópio BX53 (Olympus) com o software Q-Capture Pro 7.0. A reação inflamatória foi avaliada utilizando um procedimento semiquantitativo que avaliava a presença de leucócitos na derme e hipoderme (ALVES et al., 2013). O sistema de pontuação do infiltrado inflamatório foi adaptado da seguinte forma: 0, ausente; 1, ligeiro; 2, moderado (infiltrado inflamatório difuso ou focal moderado, incluindo áreas na derme profunda ou hipoderme); 3, intenso (infiltrado inflamatório difuso ou focal grave à volta dos vasos, glândulas, folículos capilares na derme profunda e/ou hipoderme); 4, muito intenso (infiltrado inflamatório generalizado através da derme). A extensão das áreas necróticas foi graduada de 0 (ausente) a 3 (grave) (VIANA et al., 2013). A avaliação morfológica da epiderme incluiu os seguintes parâmetros: acantose, disqueratose, papilomatose, exocitose, e hiperqueratose, que foram classificados como ausentes (0) ou presentes (1). A pontuação total variou de 0 a 12. A análise histopatológica foi realizada utilizando um modelo simples cego.

## **3.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais - CEUA/UFMG e aprovado sob os números 191/2018 e 392/2018.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram analisados os dados sobre a progressão da lesão e a carga parasitária submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

O uso de plantas como alternativa para o tratamento de doenças parasitárias tem sido bastante explorado. Novos grupos oriundos de produtos naturais já revelaram propriedades antiparasitárias de surpreendente eficácia e seletividade (O. KAYSER; A. F. KIDERLEN; S. L. CROFT, 2003). O tratamento da leishmaniose, incluindo a tegumentar, tem sido um obstáculo. Opções limitadas de terapia e a possibilidade de resistência aos medicamentos limitam o sucesso do prognóstico em países endêmicos da doença (SINGH et al., 2014). Terapias alternativas vem sendo amplamente estudadas para entender o mecanismo pelo qual atuam no combate a essa doença (BAHMANI et al., 2015). A triagem de produtos naturais parece ser uma abordagem atraente, que pode resultar na elucidação eficiente de novos compostos ou drogas (CHEUKA et al., 2017; ORYAN, 2015). No entanto, a maioria dos estudos geralmente é realizada apenas *in vitro*. Existem poucos estudos *in vivo* relacionados à leishmaniose e seus mecanismos de resistência ou morte (VENDRAMETTO et al., 2010). Muitos metabólitos secundários de produtos naturais, como alcalóides (CALLA-MAGARIÑOS et al., 2013), aldeídos (MACHADO; ET, 2012) chalconas (HERMOSO et al., 2003), flavonoides, (MARÍN et al., 2009), compostos terpenóides (BHATTACHARYA; BISWAS; HALDAR, 2013; DE OLIVEIRA et al., 2017) entre outros, já demonstraram considerável atividade antiparasitária contra as espécies de *Leishmania*. Embora não seja proposto pelos órgãos de saúde nenhum tratamento para Leishmaniose cutânea à base de produtos naturais, neste estudo obtivemos resultados promissores a partir de um derivado vegetal.

O gênero *Pterodon* é bastante reconhecido pela diversidade de compostos bioativos. Dos seus frutos extrai-se uma oleoresina com alto rendimento (aproximadamente 30%) com aspecto viscoso e coloração marrom clara. Diversos estudos descrevem a riqueza de substâncias bioativas deste derivado vegetal principalmente terpenos do tipo furanoditerpeno, sesquiterpenos e diterpenos do esqueleto vouacapano (FASCIO et al., 1976; ARRIAGA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2017a). Acredita-se que estes compostos terpenóides são os responsáveis pela versatilidade das atividades biológicas atribuídas às espécies, como antiinflamatória e analgésica (CARVALHO et al., 1999; GÁLGERAN et al., 2011).

A OS utilizada no estudo proposto foi previamente analisada por GC-MS. O perfil demonstrou a presença de compostos terpenóides voláteis tais como os sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno, e  $\alpha$ -humuleno. Dentre esses compostos, o  $\beta$ -cariofileno merece destaque por ser um sesquiterpeno bastante estudado por suas atividades anti-inflamatória (CARVALHO et al., 2005) e antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi* (IZUMI et al., 2012) e *L. amazonensis* (SILVA et al., 2017). A abundância deste composto já tinha sido observada em derivados vegetais dos frutos de Sucupira (ALVES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016, 2017b). Em um estudo *in vitro* (DELGADO-ALTAMIRANO et al., 2019) com óleo de espécies de Copaíba (*Copaifera spp*), que assim como a Sucupira, pertence a Família Fabaceae, comprovou-se que quanto maior a quantidade de  $\beta$ -cariofileno, maior atividade leishmanicida era observada (SOARES et al., 2013). O sesquiterpeno isolado do extrato diclorometano da parte aérea de *Lantana camara* var. *aculeata* (L.) também se mostrou ativo frente a *L. mexicana* (DELGADO-ALTAMIRANO et al., 2019). Atualmente, o mecanismo de ação leishmanicida do  $\beta$ -cariofileno ainda precisa ser elucidado, bem como seu efeito em modelos *in vivo*.

Os derivados de produtos naturais são imiscíveis e apresentam baixa solubilidade em água, por isso os seus compostos bioativos apresentam, muitas vezes, uma baixa dispersibilidade em meio aquoso, como é o caso da sucupira, que tem seu uso restrito em função de ser pouco hidrossolúvel (BALASUBRAMANI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017b). Dessa forma, formulações desenvolvidas a partir de nanoestruturas como nanoemulsões, possibilitaria a administração de fármacos pouco solúveis em meio aquoso, aumentando sua biodisponibilidade. Nanoemulsões são misturas de dois líquidos imiscíveis que, em geral, são estabilizadas por agentes químicos (tensoativos) capazes de proporcionar a dispersão, ainda que grosseira, de um líquido em outro. Essa dispersão é uma emulsão que pode ter seu aspecto e sua atividade melhorada quando submetida a agitação mecânica que seja capaz de mexer com sua estrutura diminuindo o tamanho das gotículas do líquido que se encontra disperso, podendo chegar à escala nanométrica (TADROS et al., 2004). A agitação mecânica pode ser aquela que utiliza forças disruptivas para reduzir o tamanho das gotículas (métodos de alto aporte de energia), onde os principais equipamentos usados são agitadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom. Como também pode-se agitar uma emulsão utilizando a própria energia interna do sistema (métodos de baixo aporte de energia) que

frequentemente envolvem inversão de fases ou emulsificação espontânea. Os métodos de emulsificação de baixo aporte são, em geral, mais simples, menos onerosos e de fácil aplicação. Dessa forma, neste estudo essa metodologia foi a escolhida, pois não necessita de grande aparato estrutural ou grandes equipamentos (SOLANS et al., 2012; SINGH et al., 2017). Alguns estudos mostram que quando nanoemulsões preparadas a partir de derivados vegetais são obtidas por metodologias de baixo aporte de energia, elas conseguem ser estabilizadas, como observado no trabalho de Rodrigues et al. (2015) que teve como matéria-prima o óleo de babaçu. Em outro estudo, Duarte e colaboradores (2015), produziram por meio de uma metodologia, que também empregou baixo aporte de energia, uma nanoemulsão contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) que permaneceu estável por 30 dias com tamanho reduzido de partículas, menor que 200nm.

Uma nanoemulsão possui componentes que podem afetar a sua estabilidade como o tipo de óleo e o tensoativo utilizado na sua fabricação (CHEN et al., 2017). Tensoativos não iônicos tem sido amplamente utilizados nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Suas principais características são: alta capacidade emulsificante, melhor estabilidade às emulsões em uma longa faixa de pH por um período maior e baixa toxicidade e biodegradabilidade (CHEN et al., 2017). Além disso, é relatado que o uso de tensoativo não iônico em uma emulsão proporciona gotas tão pequenas capazes de elevá-la ao nível de uma nanoemulsão, até mesmo sob um método de baixo aporte de energia. Índices de polidispersão também são melhorados ficando dentro da faixa esperada para uma nanoformulação (CHOUPANIAN, et al., 2017; ABDELMONEM et al., 2019).

Diversos estudos especialmente na área de nanotecnologia, abordam entre outras coisas o papel dos tensoativos na composição das formulações farmacêuticas. Os tensoativos não só ajudam no processo de emulsificação quanto também agregam outras características que proporcionam o melhoramento dos efeitos dos produtos (CHOUPANIAN et al., 2017; CHEN et al., 2017; ABDELMONEM et al., 2019), como no trabalho de Abdelmonem et al. (2019), que desenvolveu nanoemulsões de clorexidina, utilizando como tensoativos tween 20, tween 80 e co-tensoativo propilenoglicol para limpeza e ação antibacteriana dos canais radiculares. A nanoemulsão com tween 80 foi capaz melhorar a penetração nos túbulos dentinários e a capacidade de limpeza, além disso, o estudo antibacteriano da nanoemulsão de clorexidina mostrou a eliminação bacteriana completa. O autor concluiu que o tween

80 contribuiu de forma significativa para a otimização da formulação, pois ela apresentou baixo tamanho de gotícula e índice de polidispersão, o que possibilitou com que a clorexidina inserida na nanoemulsão pudesse penetrar em todo o canal. Em outro estudo Pires e de Moura (2017) prepararam filmes poliméricos contendo nanoemulsões de óleos essenciais com sugestivas atividade antibacteriana para serem utilizados como curativos. Os filmes seriam compostos por alginato de sódio, um produto que já é utilizado como curativo para feridas devido ser uma barreira seletiva que permite a manutenção do controle da umidade do local e trocas gasosas com o ambiente. O interesse seria então unir essa característica do alginato com a atividade dos óleos, para isso os autores produziram uma nanoemulsão com os óleos essenciais, água e tween 80 como tensoativo não iônico que neste caso seria essencial para proporcionar a interação da nanoemulsão com as cadeias de alginato, onde a parte polar das moléculas de tensoativos se ligaria ao alginato através das ligações de hidrogênio. Os resultados do trabalho foram promissores, segundo os autores, a nanoemulsão foi um grande diferencial no filme de alginato dado o seu tamanho de partícula diminuto proporcionando melhor permeabilidade aos vapores de água.

Durante o desenvolvimento das nanoemulsões outro fator fundamental e que pode ser explorado com a finalidade de prolongar a estabilidade do sistema é a determinação do EHL requerido. É sabido que, nanoemulsões mais estáveis e com menor tamanho de gotícula são obtidas quando o EHL do óleo se assemelha ao EHL dos tensoativos (FERNANDES et al., 2013). Neste estudo, foi proposto a investigação do EHL requerido do OS por um método simples, rápido, de baixo aporte de energia e com o uso dos tensoativos não-iônicos monooleato de sorbitano (tween 80) e o polissorbato 80 (spam 80).

As NEOS5 preparadas para o estudo in vitro estavam dentro da faixa de EHL de 9-15. Todas elas foram analisadas macroscopicamente no dia 0 de desenvolvimento. Características como homogeneidade, cor, fluidez, opacidade e/ou separação de fases foram utilizadas como parâmetros para identificar estabilidade nas formulações. Após 24 horas observou-se que as de EHL 9, 13,14 e 15 apresentaram alguns sinais de instabilidade como presença de sedimentação ou cremagem, além de, viscosidade e turvação, sendo descartadas. Como nas de EHL 10, 11 e 12 esses sinais não se mostraram visíveis, essas preparações foram avaliadas, por

espectroscopia de correlação de fótons, quanto ao diâmetro médio da gotícula, índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Tamanho de gotícula, Índice de Polidispersão (IPd) e Potencial Zeta das nanoemulsões de EHL 10, 11 e 12

| Amostras |             | D0          |            |           | D1          |           |  |
|----------|-------------|-------------|------------|-----------|-------------|-----------|--|
| EHL      | Size        | Pdl         | Zeta       | Size      | Pdl         | Zeta      |  |
| 10       | 432.9±151.1 | 0.529±0.095 | -34.1 ±1.5 | 404.7±2.3 | 0.518±0.223 | -32.9±0.9 |  |
| 11       | 215.7±1.1   | 0.166±0.003 | -35.0±0,7  | 206.9±2.3 | 0.211±0.009 | -30.9±0.9 |  |
| 12       | 232.4±0.4   | 0,345±0.008 | -29.6±1.5  | 254.7±3.6 | 0,338±0.023 | -34.7±0.5 |  |

<sup>a</sup> Dados expressos como média ± desvio padrão (SD). As medições foram realizadas em triplicata.

O tamanho diminuto das gotículas das nanoemulsões (entre 20-300nm) é um parâmetro de suma importância para garantir a estabilidade do sistema (GUÉ et al., 2016; SADURNÍ et al., 2005). O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma das técnicas mais utilizadas para determinar esse diâmetro das gotículas, oferecendo também algumas vantagens, como análise rápida e fácil. Entretanto, técnicas complementares podem ser usadas para corroborar dados obtidos pelo DLS, como a microscopia eletrônica de transmissão, que mede o diâmetro médio das gotículas individuais e fornece informações importantes sobre a superfície e morfologia das gotículas (GRAPENTIN; BARNERT; SCHUBERT, 2015). Observando os valores da **Tabela 1** percebe-se que as NEOS5 de EHL 11 e 12 possuem tamanho de gotícula dentro da faixa aconselhável, diferentemente da de EHL10. Outro parâmetro a ser avaliado é o índice de polidispersão (Pdl) que diz respeito sobre a uniformidade da distribuição do tamanho das gotículas e geralmente mostra valores iguais ou inferior a 0,3 para sistemas monodispersos (TAN et al., 2016). A NEOS5 de EHL 10 mostrou valores muito acima do desejado para garantir a característica de nanoemulsão. Já a de EHL 12, apesar de apresentar um tamanho desejável, obteve valor de Pdl também alto, enquanto a de EHL 11 ficou dentro dos padrões para estes índices mesmo após as 24 horas. O potencial zeta é outro fator para avaliar a estabilidade da formulação e está relacionado à carga de superfície das gotículas que

compõem o sistema disperso. Como regra geral, possuem maior estabilidade a longo prazo, gotículas com potencial zeta com valor maior que 30mV em módulo. Nanoemulsões com menor potencial zeta estão mais susceptíveis a sofrer agregação ou separação de fases (BRUXEL et al., 2012). Levando em consideração esse parâmetro todas as nanoemulsões preparadas forneceram um valor de potencial zeta aceitável. Observando todos estes parâmetros em conjunto a nanoemulsão com maiores indícios de estabilidade foi a de EHL 11, sendo, portanto, a escolhida para a utilização nos ensaios *in vitro* (**Figura 7**).

**Figura 7** – Nanoemulsão de EHL 11



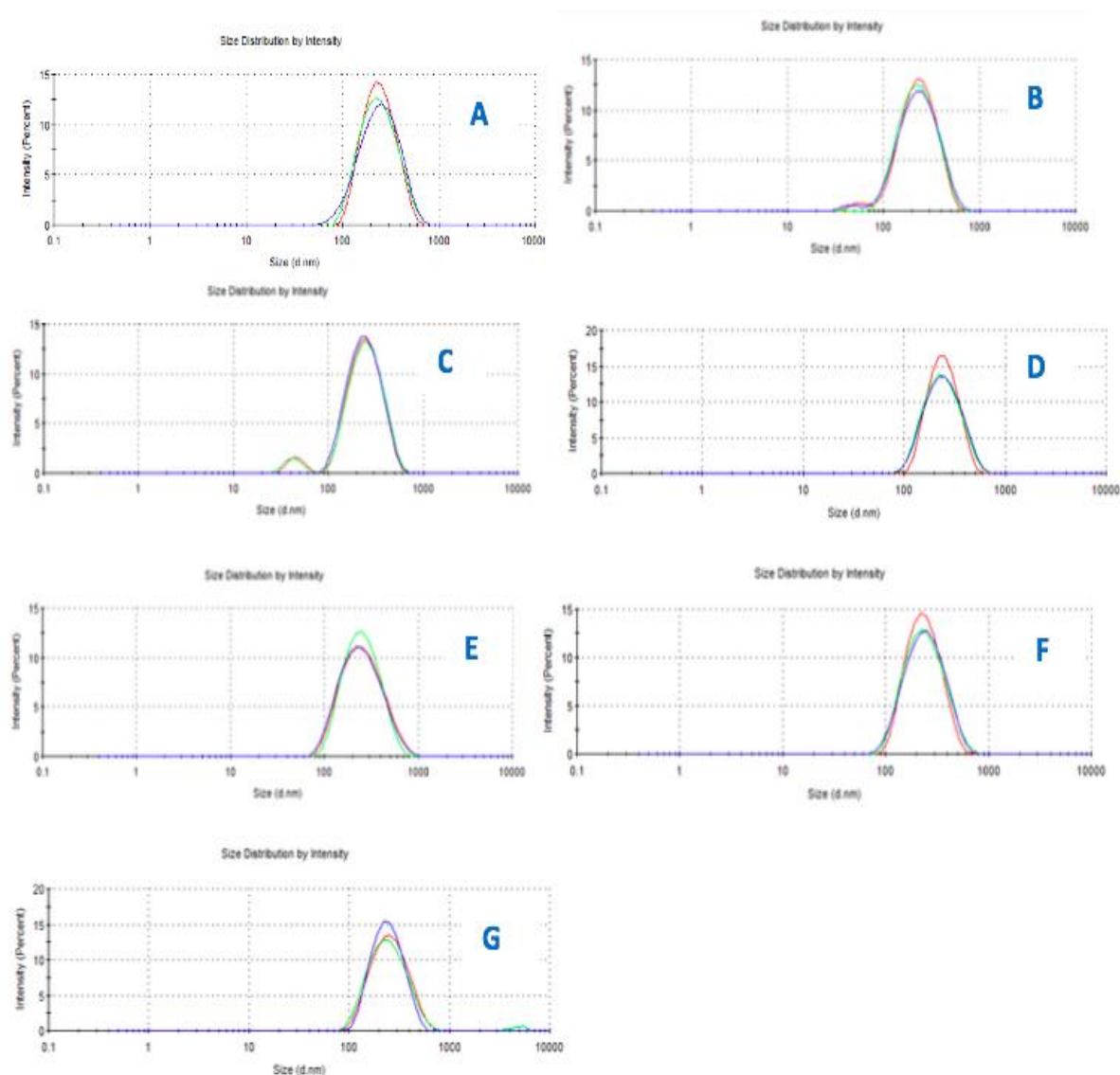
Fonte: Próprio autor.

A NEOS5 de EHL11, apresentou aspecto fino e translúcido. De acordo com o EHL encontrado caracteriza-se como O/A podendo ser dispersa em meio aquoso. Em geral, valores baixos de EHL são atribuídos a agentes mais lipofílicos e altos valores de EHL a agentes mais hidrofílicos (GRIFFIN, 1949). Na **Tabela 2** mostramos o acompanhamento dos parâmetros de estabilidade dessa nanoemulsão durante 30 dias. Quase nenhuma variação foi observada para o tamanho das gotículas, índice de polidispersão e potencial zeta durante o armazenamento, sugerindo que o sistema tem uma grande tendência para alcançar a estabilidade cinética. A observação da distribuição dos tamanhos de gotícula e Pdl mostra uma distribuição monomodal durante todo o intervalo do estudo (**Figura 8**).

**Tabela 2.** Tamanho de gotícula, Índice de Polidispersão (Pdl) e Potencial Zeta das nanoemulsões EHL 11 armazenadas em temperatura ambiente (25°C) nos dias 0, 1, 7, 15, 21, 28 e 30 após a preparação.

| Dia | Size      | Pdl         | Zeta      |
|-----|-----------|-------------|-----------|
| 0   | 215.7±1.1 | 0.166±0.003 | -45.0±0.7 |
| 1   | 206.9±2.3 | 0.211±0.009 | -44.7±0.5 |
| 7   | 196.7±2.1 | 0.230±0.008 | -46.6±1.5 |
| 14  | 204.8±1.5 | 0.173±0.035 | -45.0±0,7 |
| 21  | 214.4±4.9 | 0.203±0.006 | -42.9±1.8 |
| 28  | 215.3±1.9 | 0.166±0.030 | -44.4±3.6 |
| 30  | 213.1±2.8 | 0.254±0.012 | -42.4±2.8 |

**Figura 8.** Distribuição do tamanho de gotícula das nanoemulsões de EHL 11 de *P. emarginatus* armazenadas a temperatura ambiente (25° C). Média do tamanho de gotículas das formulações A dia 0; B dia 1; C dia 7; D dia 14; E dia 21; F dia 28 e G dia 30.



Em estudo anterior Oliveira et al. (2016), determinou o EHL do OS usando este mesmo par de tensoativos. O grupo propôs uma metodologia de baixo aporte de energia de desenvolvimento onde o OS e os tensoativos eram submetidos a aquecimento a 80°C e agitação constante por um período prolongado de tempo e posteriormente a fase aquosa era lentamente adicionada. Sabe-se que a manutenção da temperatura do sistema é um fator importantíssimo durante o uso de derivados vegetais. Variações de temperatura podem causar evaporação de voláteis e perda de compostos bioativos e por esta razão, a utilização de métodos eficazes de nanoemulsificação que não envolvem a etapa de aquecimento deve ser considerados uma vantagem, uma vez que protegeriam a liberação indesejada de voláteis, incluindo terpenóides. A metodologia agora proposta, apresentou vantagens como ausência de solvente e aquecimento, o que pode ser útil, para prevenir a perda de voláteis. Neste estudo, além da ausência do aquecimento a não utilização de solventes nos traz ao conceito de um produto ecológico com vantagens como redução de custo menor prejuízo ao meio ambiente e toxicidade (OLIVEIRA et al., 2017a).

Quando testada a ação leishmanicida da NEOS5, a mesma apresentou efeito inibitório significativo frente a formas promastigotas de *L. (L) amazonensis* após 48h de incubação, com concentrações que inibiram 50% das promastigotas (IC<sub>50</sub>) de 21,83 ± 1,09ppm para a NEOS5. A OS não encapsulada apresentou IC<sub>50</sub> de 32,38 ± 3,87ppm. Os controles dos ensaios com anfotericina B 0,2µg/ml e tensoativos apresentaram inibição do parasita >90% e <4%, respectivamente, comprovando a validade dos testes. Em estudo anterior, Dutra et al. (2009) avaliou a atividade leishmanicida de *P. emarginatus* Vogel contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (isoladas de paciente com leishmaniose cutânea difusa) e de *L. chagasi* (isoladas de pacientes com leishmaniose visceral). Os protozoários foram expostos ao óleo essencial e às frações hexânicas, butanólicas e metanólicas das sementes. Os resultados obtidos mostraram que as frações hexânicas e butanólicas indicaram atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* com valores de IC<sub>50</sub> de 50,06 ± 1,16ppm e 46,65 ± 3,04ppm, respectivamente (DUTRA et al., 2009)

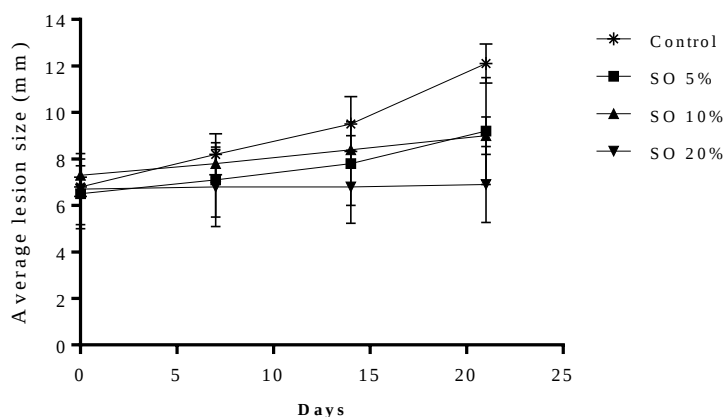
Sabemos que o ciclo de vida da *Leishmania* é dimórfico. Tem-se a forma promastigota flagelada extracelular que se multiplica e sobrevive exclusivamente no inseto. Já a forma amastigota é intracelular obrigatória de células polimorfonucleares dos mamíferos. Duas formas do mesmo agente que necessitam de condições

ambientais e fisiológicas distintas e consequentemente, reagem de maneira específica contra cada agente leishmanicida podendo ter uma resposta diferente frente a cada composto ou espécie vegetal avaliada (ESTEVEZ et al., 2007). Estudos usando formas amastigotas refletem a situação da doença no organismo do mamífero e isso deve ser levado em consideração, visto que é o estágio parasitário mais relevante (CALLAHAN et al., 1997). Já a atividade frente a forma promastigota, fornece informações importantes sobre a especificidade do agente testado servindo como uma triagem preliminar para identificar novos compostos, apesar desta não ser uma forma que se manifesta em mamíferos do ponto de vista clínico da doença (ORYAN, 2015)

Após a comprovação da atividade leishmanicida *in vitro* foi feita a parte *in vivo* do trabalho. Primeiramente foi proposto um estudo dose-resposta para avaliar qual a melhor concentração de OS no tratamento de feridas de leishmaniose tegumentar. A avaliação do tamanho da lesão foi utilizada para selecionar a concentração de OS utilizada na preparação da nanoemulsão. O desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foi avaliado quanto a progressão, tamanho e forma. O tratamento foi iniciado 6 semanas após a inoculação dos animais. A **Figura 9** mostra a evolução do tamanho da lesão, após o início do tratamento, em função do tempo. Inicialmente, os animais tratados com controle tópico (TCM), solução OS 5, 10 e 20% apresentaram lesões com diâmetro médio e desvio padrão de  $6,8 \pm 0,41$ ,  $6,5 \pm 1,46$ ,  $7,3 \pm 0,35$  e  $6,7 \pm 1,53$ mm, respectivamente, sem diferenças significativas entre todos os grupos ( $p > 0,05$ ). O tamanho da lesão dos animais tratados com soluções tópicas de OS mostrou estabilização no intervalo de tempo avaliado. Por outro lado, o grupo controle mostrou um aumento gradual no tamanho médio da lesão. O tratamento tópico com solução de OS 20% p/p resultou em uma redução significativa do tamanho da lesão em comparação com o grupo controle, 14 dias após o início do tratamento ( $p < 0,05$ ), enquanto as soluções OS 5% e 10% p/p mostraram em 21 dias (**Figura 9**). No final do tratamento, os animais não apresentaram perda significativa de peso corporal ( $p > 0,05$ ) para todos os grupos. Outros indicadores de toxicidade também estavam ausentes. Portanto, as soluções com OS apresentaram atividade, com redução significativa no tamanho médio das lesões, no tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. A solução de OS 20% levou a uma redução mais rápida, mostrando uma diferença significativa a partir do 14º dia ( $p < 0,05$ ). Com base nesses resultados, essa

concentração foi selecionada para a preparação da nanoemulsão com o oleoresina de Sucupira para estudos posteriores (NEOS20).

**Figure 9.** Acompanhamento do tamanho médio da lesão em resposta a diferentes tratamentos tópicos com OS nas concentrações 5%, 10% e 20% p/p e grupo controle tratado com MHC durante 21 dias duas vezes por dia. O tamanho da lesão é mostrado como média  $\pm$  DP.



O estudo dose-resposta pode mostrar que o OS a 20% quando aplicado topicamente, reduziu significativamente a ferida cutânea causada nos animais, em duas semanas de tratamento, quando comparado ao controle.

Essa redução no tamanho das feridas pode estar relacionada tanto a ação antiinflamatória e cicatrizante quanto a ação leishmanicida dos compostos terpenóides presentes em abundância neste derivado vegetal. Sabe-se que o tratamento de escolha para todas as formas de leishmaniose, incluindo a LTA ainda é a administração parenteral de antimoniais pentavalentes, mesmo com suas limitações (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). O tratamento tópico, apesar de bastante desafiador, é uma alternativa atraente, oferecendo vantagens significativas em relação à terapia sistêmica como redução dos efeitos adversos, maximizar a ação do fármaco no tecido alvo, contornar o metabolismo de primeira passagem, facilidade de administração e custos mais baixos (SANTOS et al., 2012). Porém, neste caso, a alta hidrofobicidade intrínseca dos fitocomplexos e a variedade de compostos com diferentes pesos moleculares na sua composição, dificulta a permeação do óleo através da barreira hidrofílica da pele, podendo haver prejuízos na absorção de compostos bioativos antileishmanióticos e consequentemente impedindo a ação no local (CARNEIRO et al., 2012). Uma maneira de melhorar essa absorção dos agentes lipofílicos presentes no OS foi desenvolver uma nanoemulsão O/A que, adicionalmente, contribuiria

também para o maior fornecimento de agentes terapêuticos, penetrabilidade de produtos oleosos na ferida e conseqüentemente na melhora da atividade farmacológica (SHAKER et al., 2019)

Levando em consideração o resultado do estudo dose-resposta, que mostrou que o OS na concentração de 20% seria mais eficaz na redução das feridas dos animais do que os tratados com 10%, 5% e grupo controle, foram desenvolvidas NEOS a 20% para a realização dos estudos *in vivo*.

A nanoemulsões à base do oleoresina de *P. emarginatus* preparadas com Polysorbato 80, monooleato de sorbitano 80 apresentaram um aspecto fino e reflexo azulado. O diâmetro da nanoemulsão foi medido pela técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS) e mostrou gotas de 158,1 nm e 147,6 nm no dia da preparação e após 14 dias, respectivamente. O Pdl obtido foi de cerca de 0,1 durante toda a análise (**Tabela 3**). O tamanho e o Pdl permaneceram sem grandes alterações durante o armazenamento à temperatura ambiente durante 14 dias.

**Tabela 3.** Caracterização da NEOS20

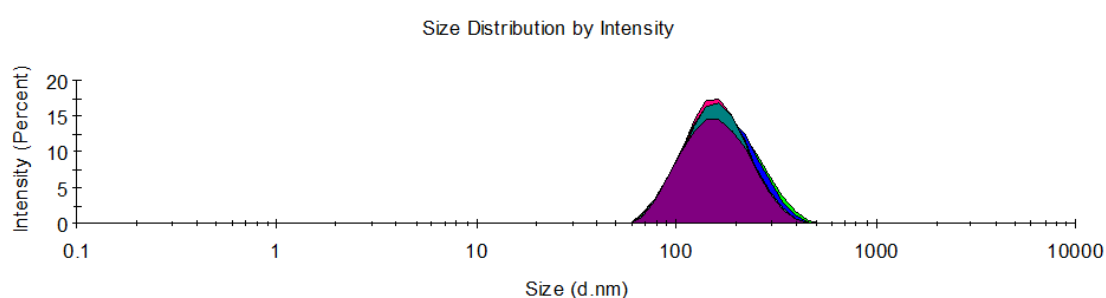
| Dia | Parâmetros avaliados |                                  |
|-----|----------------------|----------------------------------|
|     | Diâmetro $\pm$ DP    | Índice de Polidispersão $\pm$ DP |
| 0   | 158.10 $\pm$ 0.26    | 0.136 $\pm$ 0.004                |
| 1   | 145.60 $\pm$ 0.60    | 0.102 $\pm$ 0.014                |
| 7   | 147.63 $\pm$ 1.85    | 0.098 $\pm$ 0.013                |
| 14  | 147.56 $\pm$ 0.83    | 0.108 $\pm$ 0.013                |

<sup>a</sup>Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Measurements were performed in triplicate.

Os gráficos sobrepostos da distribuição do tamanho das gotículas da NEOS20 durante os diferentes dias são mostrados na **Figura 10** e confirmam a homogeneidade da distribuição do tamanho das mesmas durante todo o período avaliado. Os resultados também demonstram a estabilidade da NEOS20 em termos de tamanho e Pdl, indicando características adequadas para a administração tópica. Devido à elevada complexidade dos óleos naturais ricos em metabolitos secundários, com uma

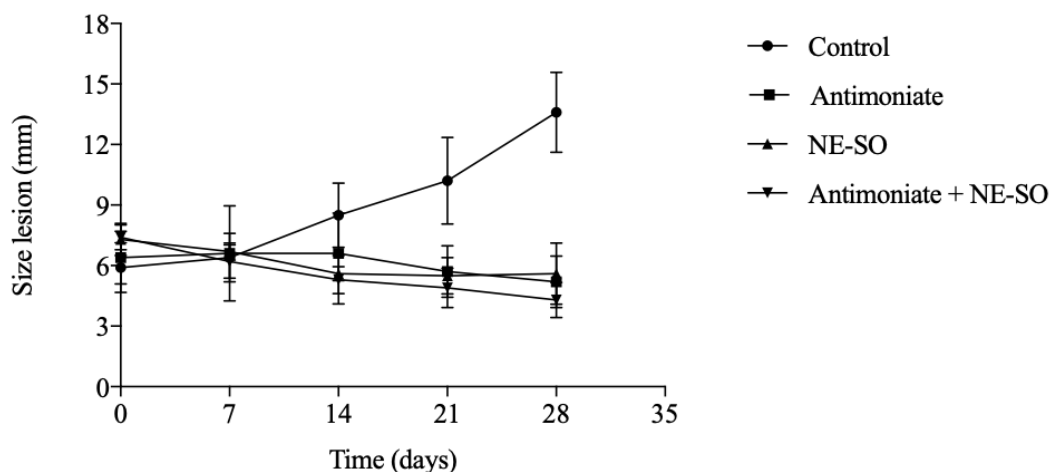
vasta gama de propriedades físico-químicas distintas (por exemplo, logP, solubilidade em água, polarizabilidade), seria de esperar dificuldades na produção de nano-gotas finas e estáveis utilizando estes produtos naturais. Apesar da grande quantidade de OS necessário no desenvolvimento desse sistema (20%), foi possível obter por um método de baixo aporte de energia, usando a inversão de fases, nanoemulsões com características desejáveis e sinal de estabilidade (KUMAR et al., 2019).

**Figura 10.** Distribuição do tamanho das gotículas da NEOS20 preparadas com monooleato de sorbitano e polissorbato 80



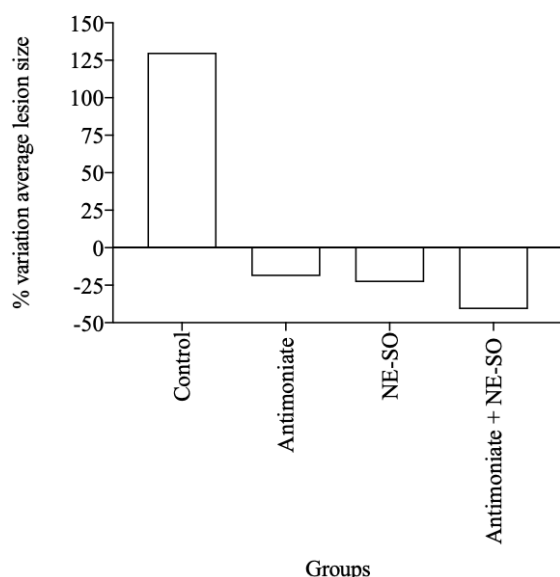
O segundo estudo foi realizado para avaliar se a combinação de NEOS20 aplicada topicamente e um medicamento de referência, o antimoníato de meglumina intraperitoneal, mostrariam resultados atraentes no tratamento da LTA. A **Figura 11** mostra a evolução do tamanho da lesão, após o início do tratamento em função do tempo. No início do tratamento os animais tratados com a combinação de antimoníato de meglumina e NEOS20, NEOS20, antimoníato de meglumina injetável e animais não tratados (grupo controle) apresentaram lesões com diâmetro médio de  $7,3 \pm 0,80$ ,  $7,4 \pm 0,62$ ,  $6,4 \pm 1,31$  e  $5,9 \pm 1,23$  mm, respectivamente. O tamanho da lesão dos animais tratados mostrou redução significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) durante o período de avaliação, sendo observado 14 dias após o início da terapia combinada de antimoníato de meglumina injetável e NEOS20 e apenas NEOS20. Para o grupo que recebeu apenas antimoníato de meglumina injetável foi observada uma diferença significativa no 21º dia após o início do tratamento em comparação com o grupo de controle ( $p < 0,05$ ).

**Figura 11.** Eficácia da terapia combinada de antimoniato de meglumina injetável e NEOS20. As fêmeas de ratos BALB/c foram infectadas com *L. (L.) amazonensis* amastigotes na base da cauda (n=7). Os animais foram tratados topicamente com SO-NE, antimônio de meglumina administrado por via intraperitoneal via (Glucantime® 100 mgSb+5/Kg/dia), combinação de antimônio de SO-NE meglumina, e grupo de controle não tratado durante 30 dias. O tamanho da lesão é mostrado como média e desvio padrão.



Ao comparar o tamanho das lesões dos animais no início e no final do tratamento, houve um aumento no tamanho médio da lesão de 130% no grupo controle durante o período acompanhado ( $5,9 \pm 1,23$  e  $13,6 \pm 1,98$  mm, tempo inicial e final do avaliado, respectivamente), enquanto todos os grupos tratados apresentaram redução, com a maior redução de (41%) no grupo tratado com a combinação de antimônio e NEOS20 ( $7,4 \pm 0,62$  e  $4,3 \pm 0,88$  tempo inicial e final avaliados respectivamente) (**Figura 12**). Também é interessante notar que a NEOS20 ( $6,7 \pm 7,3 \pm 0,80$  e  $4,3 \pm 0,88$  mm, início e fim do tratamento, respectivamente) (**Figura 11**) levou a uma redução maior no tamanho das lesões quando comparadas à solução OS 20% ( $6,7 \pm 1,53$  e  $6,8 \pm 1,63$  mm, início e fim do tratamento, respectivamente) (**Figura 9**).

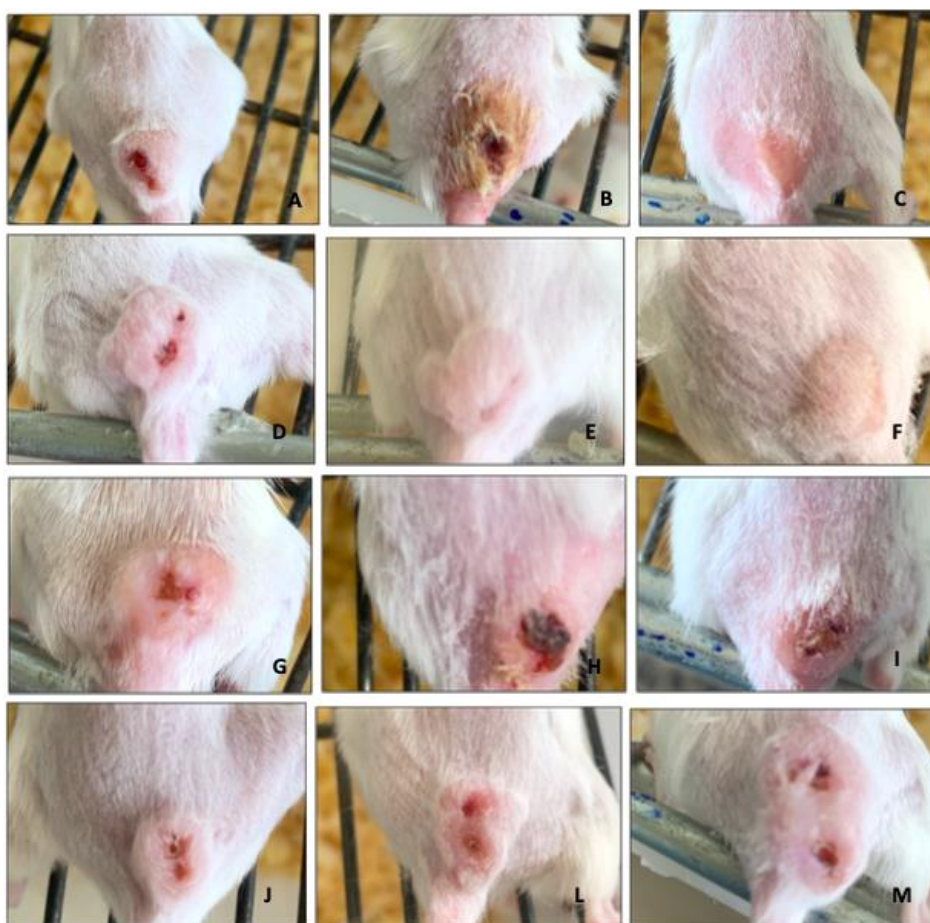
**Figura 12.** Porcentagem de variação na dimensão média da lesão determinada pela diferença entre a dimensão média da lesão no início e no fim do tratamento.



Neste estudo, NEOS20 foi testada quanto à sua atividade leishmanicida em lesões de leishmaniose cutânea (LCL) usando camundongos BALB/c infectados com *L. (L) amazonensis* na região da cauda. Este modelo animal têm sido amplamente utilizados para estudar feridas cutâneas causadas por esta cepa, devido a sua rigorosidade em selecionar a eficácia apenas dos fármacos mais ativos (DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019). No entanto, ao analisar a eficácia terapêutica para o tratamento da LCL de uma forma mais abrangente, deve-se não apenas levar em consideração a eliminação do parasita, mas também avaliar integralmente as questões relacionadas com os aspectos que envolvem as reações anti-inflamatórias e a capacidade de cura, promovendo assim a reparação, reepitelização dos tecidos e evitando reações secundárias. Além disso, observou-se que o tratamento com a NEOS20 apresentou maior redução da ferida do que quando tratado com o OS na forma não encapsulada sugerindo que a penetrabilidade e sua taxa de difusão dos compostos ativos foram potencializados com o uso do produto nanoestruturado. Esse é um achado importante para o tratamento, porque as formas amastigotas do protozoário se multiplicam intracelularmente em macrófagos, portanto, é fundamental que o fármaco consiga atingir as células nos tecidos mais profundos da pele e assim causar a destruição do parasita (ARAGÃO HOROIWA et al., 2020; GARNIER; CROFT, 2002).

A medida do tamanho da lesão é um excelente indicador da progressão da doença (**Figura 13**). Nas primeiras duas semanas de tratamento a administração tópica de NEOS20 de 12/12 horas por 4 semanas foi capaz de inibir o crescimento da lesão de forma significativa quando comparado ao grupo controle (**Figura 11**). Evolução semelhante foi vista no grupo que recebeu tratamento em combinação. De acordo com as avaliações clínicas, a presença do derivado vegetal no tratamento destes animais parece ter prevenido a formação de úlceras nas lesões. Apesar dos estudos realizados, ainda não é do nosso conhecimento um estudo *in vivo* que demonstra a atividade da espécie frente a feridas causadas por *L. amazonensis*. Ademais, a atividade antiinflamatória e cicatrizante dos seus compostos já foi comprovada em modelos animais (CARVALHO et al., 1999; GALCERAN et al., 2011; HOSCHIED; CARDOSO, 2015).

**Figura 13.** Acompanhamento do tamanho da lesão dos grupos tratado com a combinação NEOS20+Antimoniato dias 1, 7 e 28 respectivamente (A-C); tratado com Antimoniato dias 1, 7 e 28 respectivamente (D-F); tratado com a NE dias 1, 7 e 28 respectivamente (G-I); e grupo sem tratamento dias 1, 7 e 28 respectivamente (J-M).

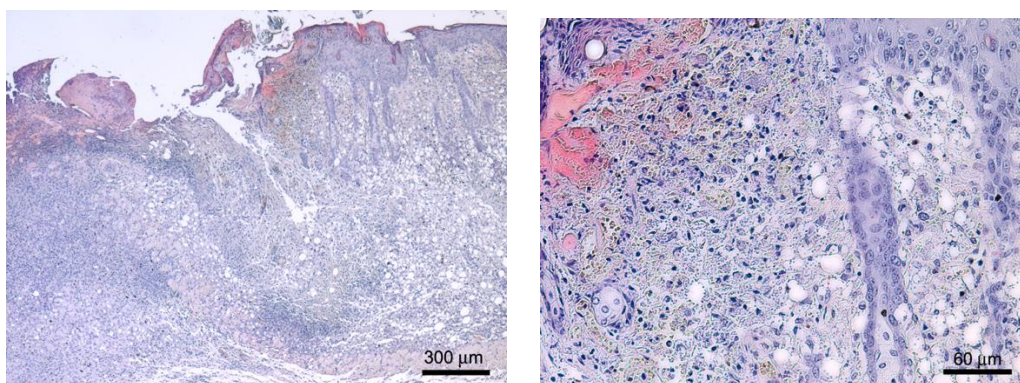


Fonte: Próprio autor.

Santos et al. (2008) testou a ação da oleoresina de copaíba (*Copaifera martii*) em camundongos infectados por *L. amazonensis*. A ferida na pata dos animais que receberam o tratamento com a copaíba por via oral e tópica associadas mostraram uma diminuição do tamanho da lesão sem diferença significativa quando comparado com o controle (SANTOS et al., 2008). Em um estudo onde avaliou-se a atividade de hidrogeis contendo extrato de *Libidibia ferrea*, espécie também pertencente à família Fabaceae e rica em compostos terpenóides, observou-se que a aplicação tópica do produto foi capaz de conter o desenvolvimento das lesões causadas em Hamster Golden por *L. amazonensis* quando comparada ao grupo controle (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI et al., 2017).

Outro estudo realizado para avaliar a progressão das lesões foi a histologia. A análise histopatológica das biópsias de pele de camundongos revelou alterações inflamatórias significativas, principalmente no grupo controle. Nesse grupo a lesão tegumentar causada por *L. amazonensis* evoluiu bastante e, durante todo o período do experimento, os animais não receberam tratamento. Observou-se intensa agressão ao tecido, com ulceração, descontinuidade do epitélio, presença de lesão infiltrante com ausência de células epiteliais e disceratose. A exposição do tecido conjuntivo e a existência de um infiltrado inflamatório intenso e misto com predominância de polimorfos do tipo neutrófilo, principalmente, e células mononucleares, mostram um processo inflamatório agudo. Além disso, há uma área de sangramento, numerosos macrófagos vacuolizados, ricamente parasitados e áreas de necrose com células anucleadas e a presença de material amorfo (**Figura 14**).

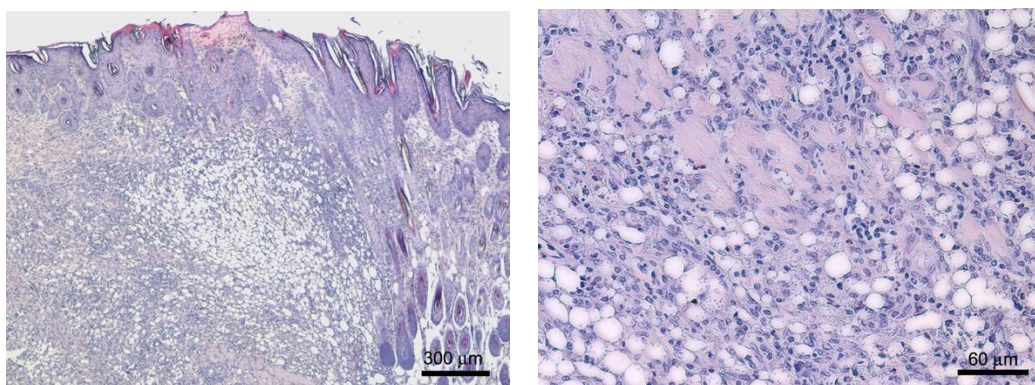
**Figura 14.** Análise histopatológica das lesões – Grupo sem tratamento.



Fonte: Próprio autor.

No grupo que recebeu o NEOS20 topicamente sobre as feridas (Figura 13), também foi observado um processo inflamatório ativo com a presença de infiltração intensa e um número significativo de macrófagos vacuolizados, mas em quantidades menores e com menos parasitas do que o grupo não tratado. Apesar da descontinuidade da epiderme observada, já não se observam áreas de ulceração e exposição do tecido conjuntivo, mostrando áreas com fibras mais densas, o que pode sugerir uma regeneração do epitélio tecidual. Possivelmente o tratamento aplicado no período avaliado causou um estímulo proliferativo nas células da camada basal.

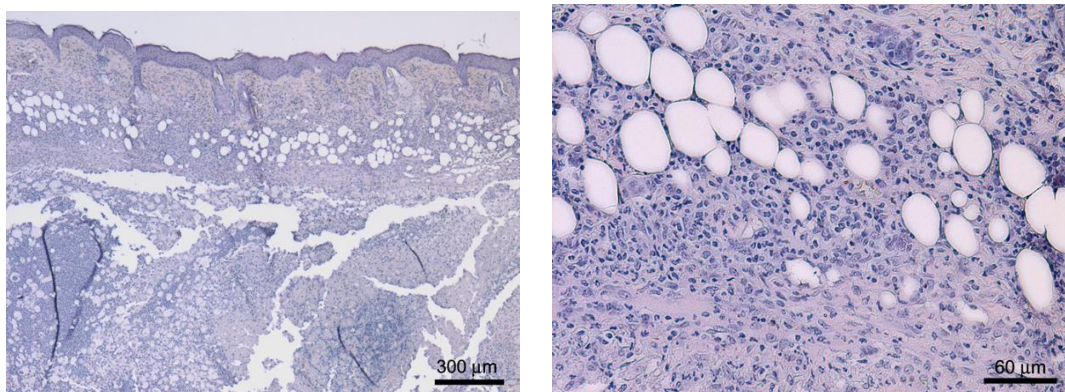
**Figura 15.** Análise histológica da lesão do grupo tratado topicamente com NEOS20.



Fonte: Próprio autor.

No grupo que recebeu o antimoníato de meglumina por via intraperitoneal as áreas de lesão e ulceração do epitélio não são aparentes. Ainda existe presença de infiltrado inflamatório em todo o campo, com presença de neutrófilos mononucleares, mas menos do que o observado no controle e com menor frequência de observação do parasita no interior, podendo estar relacionado à eliminação do protozoário e ao início da conclusão do infeccioso processo. O epitélio é observado com tecido conjuntivo pouco celularizado, fibroblastos no local da lesão, com o processo de conclusão mais avançado do que no grupo que não recebeu tratamento (Figura 14).

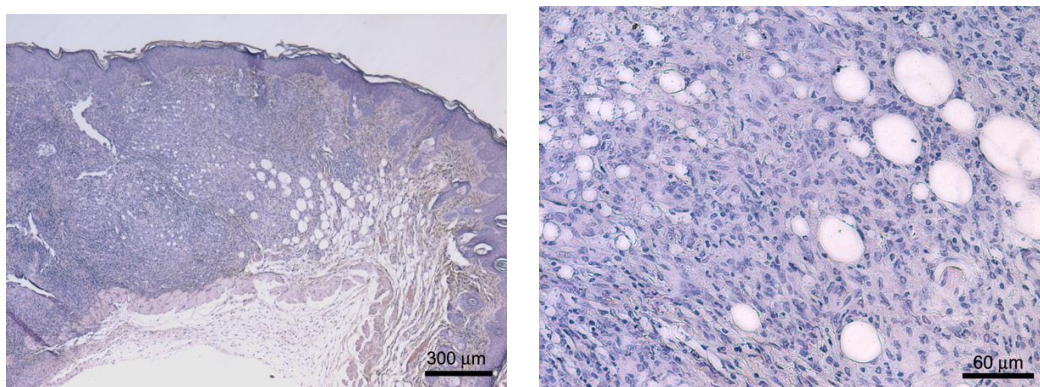
**Figura 16.** Análise histológica da lesão do grupo tratado com antimoniato de meglumina.



Fonte: Próprio autor.

Sem ulceração e alteração epitelial observadas, no grupo tratado com a combinação antimoniato de meglumina e NEOS20 foi visualizado um processo inflamatório, que tende a terminar. Parte do tecido é completamente saudável, o tecido conjuntivo é integrado às fibras de colágeno, com presença de infiltrado inflamatório já localizado na porção lateral inferior, porém em menor quantidade do que em outros grupos, sugerindo que os macrófagos já estão abandonando o local da inflamação. A presença de parasitas muito raros no interior de macrófagos, indicam que o processo ainda não terminou, mas tende a uma solução. Maior presença de tecido conjuntivo com fibroblastos e menos infiltrado, sem áreas amorfas e necrose (Figura 15).

**Figura 17.** Análise histológica da lesão do grupo tratado com antimoniato de meglumina e NEOS20.



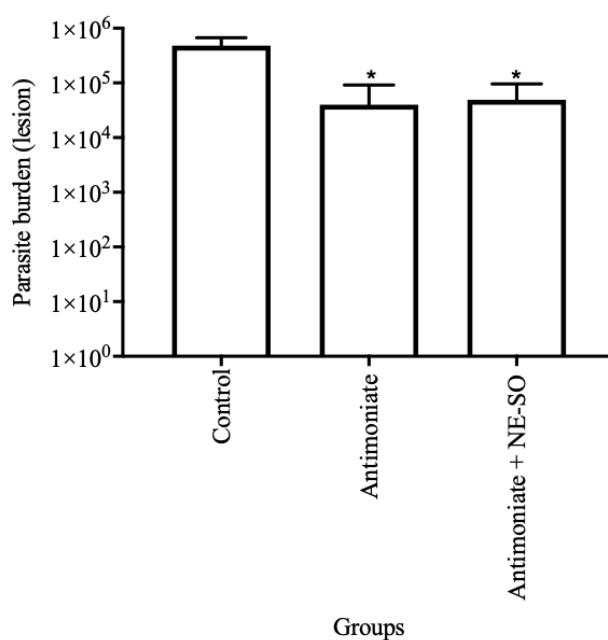
Fonte: Próprio autor.

A análise histopatológica dos grupos avaliados mostrou as diferenças observadas nos tratamentos propostos. No grupo que recebeu NEOS20 topicamente, apesar de ainda observar-se macrófagos e formas amastigotas estes eram menos

numerosos e notava-se regeneração da derme com recuperação das áreas ulceradas o que era bastante evidenciado no grupo não tratado. Além disso, as áreas com tecido conjuntivo exposto eram menos extensas do que as do controle. Possivelmente o tratamento aplicado no período avaliado causou um estímulo proliferativo nas células da camada basal epitelial. A regeneração da derme com recuperação das áreas ulceradas foi notada. No grupo tratado com a combinação foi possível observar que os macrófagos estavam a abandonando processo. Foram encontrados parasitas raros, sugerindo uma tendência para finalizar o processo infeccioso.

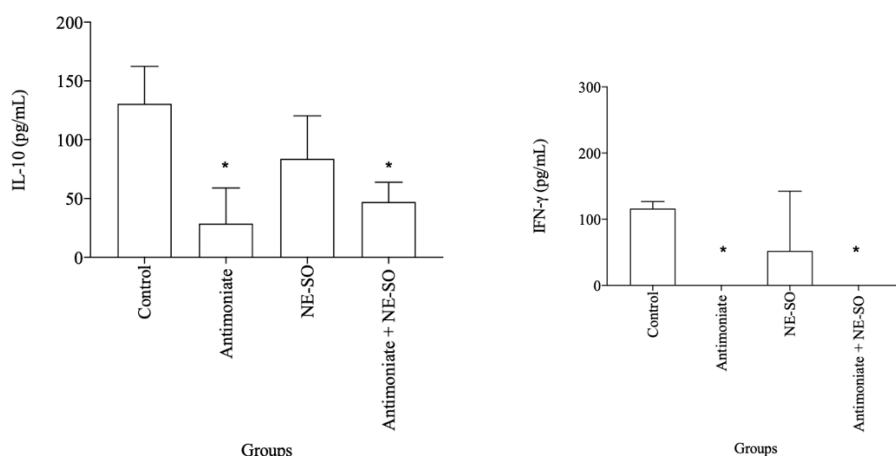
O tratamento de animais infectados experimentalmente com a combinação também levou a uma redução estatisticamente significativa da carga parasitária da lesão quando comparada com o grupo não tratado, sugerindo que o tratamento tópico colaborou tanto no processo inflamatório como na eliminação de amastigotas do protozoário conforme figura 16. De Moares et al. (2018) avaliaram a ação de nanoemulsões do óleo essencial de duas espécies nativas da região amazônica, a copaíba (*Copaifera sp*) e andiroba (*Carapa guianensis*). Os camundongos após o desenvolvimento da infecção causada por *L. amazonensis* e *L. infantum* (causador da leishmaniose visceral) foram tratados por via oral e obtiveram melhora dos parâmetros de carga parasitária e histopatológicos quando comparados ao grupo controle (MORAES et al., 2018).

**Figura 18.** Quantificação da Carga parasitária na lesão



Para avaliar a resolução da resposta inflamatória, foram investigados os níveis de algumas citocinas essenciais para ativação dos mecanismos leishmanicidas de macrófagos e controle da infecção por *L. (L.) amazonensis* (figura 17). Os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  produzidos foram significativamente reduzidos em animais tratados com a combinação de antimoníato de meglumina NEOS20 e em monoterapia com antimoníato de meglumina quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Esses achados podem indicar que os níveis reduzidos de citocinas foram associados a respostas inflamatórias menores, controlando a inflamação e consequentemente diminuindo o tamanho das lesões.

**Figura 19.** Níveis de citocina nas lesões de camundongos tratados com a combinação de NEOS20 por via tópica, antimoníato de meglumina administrado por via intraperitoneal (Glucantime® 100 mgSb + 5 / Kg / dia), combinação antimoníato de meglumina e NEOS20 e grupo controle não tratado por 30 dias.



A redução dos níveis de citocinas corrobora com os resultados anteriores. A capacidade de *Leishmania* de resistir intracelularmente está relacionada com a resposta inata ou adaptativa. Ao ser interiorizado, o macrófago acaba colaborando com o processo de multiplicação e infecção de novas células pelo protozoário. Sabe-se, contudo, que uma resposta imunitária eficaz ajuda a resolver a doença destruindo o agente patogênico por células fagocitárias (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). Os níveis de IFN- $\gamma$  parecem estar envolvidos tanto no controle da multiplicação do parasita durante as fases iniciais da infecção de *Leishmania* como na mediação da lesão do tecido (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). A dosagem de IFN- $\gamma$  na lesão mostrou que os níveis desta citocina eram significativamente mais baixos do que no grupo de controle, o que aponta para o fim

do processo. A interleucina-10 (IL-10) tem sido associada a um pior prognóstico da Leishmaniose cutânea. O seu bloqueio tem demonstrado diminuição na progressão da doença (KANE; MOSSER, 2001; CASTELLANO et al., 2015). Aqui, a NEOS20 em combinação com o antimoníaco de meglumina diminuiu os níveis de lesão IL-10 que poderiam ter favorecido a melhor redução do tamanho das lesões.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

---

A patologia da CL é muito ampla e ao propor um possível tratamento para a doença é necessário avaliar tanto a questão da eliminação do agente infectante, como as questões relacionadas ao intenso processo inflamatório presente. Neste sentido, após os estudos propostos por este trabalho foi possível identificar que a utilização tópica de NEOS20 combinada com o antimoníato de meglumina apresentou os melhores resultados na redução do tamanho das lesões, melhora de seu aspecto geral e diminuição significativa das interleucinas IL10 e IFN- $\gamma$ , indicando uma possível atividade antiinflamatória e cicatrizante, corroborando com os estudos encontrados na literatura. Quando comparada com o OS não encapsulado, a NEOS20 mostrou melhores resultados no tratamento das feridas, resultados estes atribuídos a nanoestrutura na qual o OS foi inserido, que certamente melhorou a sua penetrabilidade na pele, levando a uma maior absorção dos compostos bioativos. Este achado é muito importante considerando que uma maior difusão destes compostos pode sugerir uma maior chance desses metabólitos atingirem os protozoários intracelularmente, proporcionando os efeitos esperados levando até a sua eliminação completa.

Esta pesquisa apresentou excelentes resultados, principalmente quanto ao que se propôs, que foi demonstrar a atividade tópica da nanoemulsão em lesões causadas por LC. Adicionalmente, a metodologia empregada no desenvolvimento das nanoformulações é relativamente simples e de baixo custo, considerada uma vantagem importante quando se pesquisa um candidato a fármaco.

Para perspectivas futuras, a avaliação da atividade leishmanicida frente a formas amastigotas intracelulares e a toxicidade frente a macrófagos da nanoemulsão serão avaliadas.

## REFERÊNCIAS

---

- ABDELMONEM, R.; YOUNIS, M. K.; HASSAN, D. H.; EL-GAWAD, M. A.; AHMED, E-S.; HASSANEIN, E.; EL-BATOUTY, K. ELFAHAM, A. Formulation and characterization of chlorhexidine HCl nanoemulsion as a promising antibacterial root canal irrigant: in-vitro and ex-vivo studies. **International Journal of Nanomedicine**. n. 14, p. 4697–4708, 2019.
- AFONSO, L. et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 84, n. 2, p. 389–396, 2008.
- AGUIAR, M.G.; PEREIRA, A.M.; FERNANDES, A.P.; FERREIRA, L.,A. Reductions in Skin and Systemic Parasite Burdens as a Combined Effect of Topical Paromomycin and Oral Miltefosine Treatment of Mice Experimentally Infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 4699-4704, 2010.
- AKHAVAN, A. A. et al. Experimental Parasitology *Leishmania* species : Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. **Experimental Parasitology**. v. 126, n. 4, p. 552–556, 2010.
- AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* Infections: Molecular Targets and Diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**. 2017.
- ALBUQUERQUE, K. C. O. DE et al. Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with *Copaifera*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2017.
- ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.
- ALMEIDA, M. DE F. O. et al. CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). **Quim. Nova**. v. 34, n. 7, p. 1182–1187, 2011.
- ALVES, S. F. et al. Microencapsulation of Essential Oil from Fruits of *Pterodon emarginatus* Using Gum Arabic and Maltodextrin as Wall Materials: Composition and Stability. **Drying Technology**, v. 32, n. 1, p. 96–105, 2014.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 377, n. 1–2, p. 142–147, 2009.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**. v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.

ARRAIS-SILVA, W.W.; NUNES, P.S.G.; CARVALHO, J.D.; BRUNE, M.W.; ARRAIS-LIMA, C.; BATALINI C. Preliminary phytochemical and antileishmanial studies of the ethanolic extracts of *Pterodon pudescens*. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.16, n.3, p.561-565, Campinas, 2014.

ASIB, N.; OMAR, D.; AWANG, R. M.; ASHIKIN, N.; ABDULLAH, P. Preparation, Characterization and Toxicity of Nano-Emulsion Formulations of Rotenone Extract of *Derris Elliptica*. **J. Chem. Bio. Phy. Sci.** v. 5, n. 4, p. 3989-3997, 2015.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology.** v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ASSUNÇÃO, L. A.; LEMES, S. R.; ARAÚJO, L. A.; COSTA, C. R.; MAGALHÃES, L. G.; K.K. MOURA, K. K.; MELO-REIS, P. R.; Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of sucupira oil (*Pterodon emarginatus*). **Genetics and Molecular Research.** v. 14, n. 2, p. 6323-6329, 2015.

BAHMANI, M. et al. Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 9, p. 695–701, 2015.

BALASUBRAMANI, S. et al. Development of nanoemulsion from *Vitex negundo* L. essential oil and their efficacy of antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities (*Aedes aegypti* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 17, p. 15125–15133, 2017.

BALDISSERA, M. D.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. B.; ZIMMERMANN, C. E. P.; VAUCHER, R. A.; SANTOS, R. C. V.; RECH, V. C.; TONIN, A. A.; GIONGO, J. L.; MATTOS, C. B.; KOESTER, L.; SANTURIO, J. M.; MONTEIRO, S. G. Trypanocidal activity of the essential oils in their conventional and nanoemulsion forms: In vitro tests. **Experimental Parasitology.** v. 134, p. 356–361, Ed. Elsevier, 2013

BHATTACHARYA, S.; BISWAS, M.; HALDAR, P. The triterpenoid fraction from *Trichosanthes dioica* root exhibits in vitro antileishmanial effect against *Leishmania donovani* promastigotes. **Pharmacognosy Research**, v. 5, n. 2, p. 109, 2013.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology.** v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALARAMAN, S. et al. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: A host defense response. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 317, n. 2, p. 639–647, 2004.

BAVARESCO, O. S. A.; PEREIRA, I. C. P.; MELO, C. D.; LOBATO, F.; FALCAI, A.; MARIA ROSA QUARESMA BOMFIM, M. R. Q. Utilização popular da *Pterodon* spp no tratamento de doenças reumáticas. **Rev. Investig. Bioméd.** p. 81-91, 2016.

BAJERSKI, L.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; BENDER, E. A.; FREDDO, R. J.;

BRUXEL, F.; HAAS, S. E. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 52, n. 3, 2016.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial - Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste**. p. 861 – 874, Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**. Brasília, 2017. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)> Acesso em: 21 mar 2018

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, 2012. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas\\_integrativas\\_complementares\\_plantas\\_medicinais\\_cab31.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf)> Acesso em: 20 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Plantas Medicinais & Orientações Gerais para o Cultivo**. Brasília, 2006. Disponível em <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cartilha\\_plantas\\_medicinais.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cartilha_plantas_medicinais.pdf)> Acesso em: 20 mar. 2018.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. S. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quím. Nova**. v. 35, n. 9, p. 1827-1840, 2012.

BUSTAMANTE, K.G.L.; LIMA, A.D.F.; SOARES, M.L.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; BARA, M.T.F.; PIMENTA, F.C.; PAULA, J.R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.12, n.3, p.341-345, 2010.

CALDEIRA, L. R.; FERNANDES, F. R.; COSTA, D. F.; FRÉZARD, F.; AFONSO, L. C. C.; FERREIRA, L. A. M.; Nanoemulsions loaded with amphotericin B: A new approach for the treatment of leishmaniasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 70, p. 125–131, 2015.

CALLA-MAGARIÑOS, J. et al. Quinolinic Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause Suppress Production of Proinflammatory Cytokines in vitro and Control Inflammation in vivo upon *Leishmania* Infection in Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 77, n. 1, p. 30–38, 2013.

CALLAHAN, H. L. et al. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818–822, 1997.

CARNEIRO, G. et al. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 9, n. 9, p. 1083–1097, 2012.

CARVALHO, J. C. T. et al. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**. v. 19, n. 11, p. 946–950, 2005.

- CARVALHO, J. C. T. et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 127–133, 1999.
- CHANDRA, A. R.; MAHESH, S. Cutaneous leishmaniasis. v. 7, p. 1212–1217, 2017.
- CHEN, B.; HOU, M.; ZHANG, B.; LIU, T.; GUO, Y.; DANG, L.; WANG, Z. Enhancement of the solubility and antioxidante capacity of  $\alpha$ -linolenic acid using an oil in water microemulsion. **Food Funct.** n. 8, p. 2792–2802, 2017.
- CHOUPANIAN, M.; OMAR, D.; BASRI, M. ASIB, N. Preparation and characterization of neem oil nanoemulsion formulations against *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum* adults. **J. Pestic. Sci.** v. 42, n. 4, p. 158–165, 2017.
- CHEUKA, P. M. et al. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. n. May 2016, [s.d.].
- CLARK, A. M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharmaceutical Research**. 1996.
- COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D. et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 4, p. 331–340, 2017.
- COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends in Parasitology**. v. 21, n. 5, p. 244–249, 2005.
- COMMITTEE, W. H. O. E. FAQ about authors' rights. n. March, p. 22–26, 2010.
- DA COSTA, R. C. et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 22, n. 1, p. 135–140, 2014.
- COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose Cutânea Difusa ( Lcd ) No Brasil Após 60 Anos De Sua Primeira Descrição Diffuse. v. 79, p. 16–24, 2009.
- COSTA, E. V. et al. A pyrimidine- $\beta$ -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products**. v. 69, n. 2, p. 292–294, 2006.
- DA GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 107, n. 5, p. 664–674, 2012.
- DA SILVA B.J.M., HAGE A. A. P., SILVA, E. O., R. A. P. D. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. **Journal of integrative medicine**. v. 16, n. 4, p. 211–222, 2018.
- DA SILVA, F. M. A et al. Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from Amazonian *Unonopsis* species. **Brazilian Journal of**

**Pharmacognosy.** v. 22, n. 6, p. 1368–1371, 2012.

DA SILVA SANTOS, É. et al. Optimization of extraction method and evaluation of antileishmanial activity of oil and nanoemulsions of *Pterodon pubescens* benth. fruit extracts. **Experimental Parasitology.** v. 170, p. 252–260, 2016.

DA SILVA, V. D. et al. Chemical composition of *Ocimum canum* Sims. essential oil and the antimicrobial, antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Industrial Crops and Products.** v. 119, n. March, p. 201–208, 2018a.

DA SILVA, V. P. et al. Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products,** v. 123, n. March, p. 638–645, 2018b.

DE AGUIAR, M. G. et al. Plasma antimony determination during cutaneous leishmaniasis treatment with intralesional infiltration of meglumine antimoniate. **Tropical Medicine and International Health.** v. 3, 2018.

DE ANDRADE, P. M. et al. Chemical composition and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *cryptocarya aschersoniana* mez. (lauraceae juss.). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias.** v. 90, n. 3, p. 2671–2678, 2018.

DE FREITAS ROCHA, A. T. et al. Visceral leishmaniasis and vulnerability conditions in an endemic urban area of Northeastern Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 112, n. 7, p. 317–325, 2018.

DELGADO-ALTAMIRANO, R. et al. Chemical constituents with leishmanicidal activity from a pink-yellow cultivar of *Lantana camara* var. *aculeata* (L.) collected in Central Mexico. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 20, n. 4, 2019.

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

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology.** v. 3, n. JUN, p. 1–10, 2012.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. p. 239–243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.** v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine.** v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012.

DUTRA, R. C.; FAVA, M. B.; ALVES, C. C. S.; FERREIRA, A. P.; BARBOSA, N. R. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 61, p. 243–250, 2009a.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, n. 2, p. 429-435, 2009b.

DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; DITZ, D.; MARCON, R.; PIMENTA, D. S.; LOPES, M. T. P.; RAPOSO, N. R. B. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 22, n. 5, p. 971 – 978, 2012

ESTEVEZ, Y. et al. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, n. 2, p. 254–259, 2007.

FARIA, A. M.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, L. L.; BASTOS, T. S. A.; LOULY, C. C. B.; MATOS, M. P. C.; CONCEIÇÃO, E. C.; MOURA, V. M. B. D. Acaricidal activity of ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* and *Lafoensia pacari* and oil resins from *Copaifera* sp. and *Pterodon emarginatus* against *Sarcoptes scabiei* var. *swiss*. **Pesq. Vet. Bras.** v. 37, n. 12, p. 1411-1415, 2017.

FERREIRA, M. R. A.; SANTIAGO, R. R.; SOUZA, T. P.; EGITO, E. S. T.; OLIVEIRA, E. E.; SOARES, L. A. L. Development and Evaluation of Emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) Oil. **Am. Assoc. of Pharm. Sci.** v. 11, p. 1383 – 1390, 2010.

FERNANDES, A. C.; UYTTERHOEVEN, V.; KUENEN, S.; WANG, Y-C.; SLABBAERT, J. R.; SWERTS, J.; KASPROWICZ, J.; AERTS, S.; VERSTREKEN, P. Reduced synaptic vesicle protein degradation at lysosomes curbs TBC1D24/sky-induced neurodegeneration. **J. Cell Biol.** v. 207, n. 4, p. 453–462, 2014.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**. n. 25, p. 1-9, 2015.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 14 Jan. 2019. p. 1–2, [s.d.].

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29840>>. Acesso em: 23 jun. 2019

FORESTIER, C. L. et al. Imaging host cell-leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host and Microbe**. v. 9, n. 4, p. 319–330, 2011. GALCERAN, C. B. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy- vouacapan-1 $\beta$ 7-oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 3, p. 139–143, 2011.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by HLB. **J. Soc Cosmet Chem**, v.1, p.311-326, 1949.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. BIOACTIVITY IN PLANTS: THE LINK BETWEEN PHYTOCHEMISTRY AND MEDICINE. **Phytochemistry**. v. 30, n. 12, p. 3864–3874, 1991.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 46, n. 4, 2010.

HERMOSO, A. et al. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from piper elongatum and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 3975–3980, 2003.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**. v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HOSCHEID, J.; CARDOSO, M. L. C. Sucupira as a Potential Plant for Arthritis Treatment and Other Diseases. **Arthritis**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

HOSCHEID, J. et al. Pterodon pubescens oil nanoemulsions: Physiochemical and microbiological characterization and in vivo anti-inflammatory efficacy studies. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 27, n. 3, p. 375–383, 2017.

IQBAL, H. et al. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 6, n. 1, p. 1–5, 2016.

IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: A review of plant compounds studied for activity against Trypanosoma cruzi. **Natural Product Reports**. v. 28, n. 4, p. 809–823, 2011.

IZUMI, E. et al. Terpenes from copaifera demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 55, n. 7, p. 2994–3001, 2012.

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

JAIN, V.; JAIN, K. Molecular targets and pathways for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**. v. 23, n. 1, p. 161–170, 2018.

KAUFFMANN, C. et al. Chemical Composition and Evaluation Preliminary of Antileishmanial Activity in vitro of Essential Oil from Leaves of Eugenia pitanga , A Native Species of Southern of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**. v. 20, n. 2, p. 559–569, 2017.

KUMAR, M. et al. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system:

A review. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.  
KVIST, L. P. et al. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. v. 106, p. 390–402, 2006.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**. v. 3, n. AUG, 2012.

KUMAR, M. et al. Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. **Preventive Nutrition and Food Science**. v. 24, n. 3, p. 225–234, 2019.

KVIST, L. P. et al. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. v. 106, p. 390–402, 2006.

LIMA, G. S. et al. Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). **Phytomedicine**. v. 22, n. 12, p. 1133–1137, 2015.

LIMA, P. C.; SANTOS, M. C. DOS; CALABRESE, K. S.; SILVA, A. A.; ALMEIDA, F. Avaliação da Capacidade Leishmanicida de Espécies Vegetais do Cerrado **Rev. Patol. Trop.** v. 44, n. 1, p. 45-55, 2015.

LIMA, H.C. DE; LIMA, I.B. *Pterodon* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29842>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

MAGILL, A. J. Leishmaniasis. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**, p. 739–760, 2017.

MARÍN, C. et al. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 6, p. 1069–1074, 2009.

MARTINS, G. A. de S.; LIMA, M. D. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. **Enciclopédia biosfera**. v. 9, n. 16, p.2556-2569, 2013.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 2005.

M. MACHADO, P. PIRES, A.M. DINIS, M. SANTOS-ROSA, V. ALVES, L. SALGUEIRO, C. CAVALEIRO, M. C. S. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 223–231, 2012.

MOREIRA, A. L. et al. Acyclic Sesquiterpenes from the Fruit Pericarp of *Sapindus saponaria* Induce Ultrastructural Alterations and Cell Death in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

MIRANDA, M. L. D.; GARCEZ, F. R.; ABOT, A. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos

e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Quim. Nova.** v. 37, n. 3, p. 473-476, 2014

MONDAL, D. et al. Enhanced Case Detection and Improved Diagnosis of PKDL in a Kala-azar-Endemic Area of Bangladesh. v. 4, n. 10, 2010.

MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; SCULL, R.; CUELLAR, A.; SETZER, W. N. Antileishmanial Activity of the Essential Oil from *Bixa orellana*. **Phytother. Res.** n. 28, p. 753–758, 2014.

MORAES, A. R. D. P. DE et al. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology.** v. 187, p. 12–21, 2018.

MOREIRA, A. L. et al. Acyclic Sesquiterpenes from the Fruit Pericarp of *Sapindus saponaria* Induce Ultrastructural Alterations and Cell Death in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.** v. 2017, 2017.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology.** v. 11, n. 10, p. 1464–1488, 2011.

NOAZIN, S. et al. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. **Vaccine.** v. 26, n. 52, p. 6759–6767, 2008.

O. KAYSER; A. F. KIDERLEN; S. L. CROFT. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, p. 55–62, 2003.

OLIVEIRA, D. M. T.; PAIVA, E. A. S. Anatomy And Ontogeny Of *Pterodon Emarginatus* (Fabaceae: Faboideae) Seed. **Braz. J. Biol.** v. 65, n. 3, p. 483 - 494, 2005.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; CRUZ, R. A. S.; ROCHA, C. F.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; SANTOS, K.; CONCEIÇÃO, E. C. da; LIVEIRA, L. A. R.; KELECOM, A.; FERNANDES, C. P.; CARVALHO, J. C. T. Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. **PLoS ONE.** v. 11, n. 1, 2016.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M. et al. Utilization of dynamic light scattering to evaluate *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and solvent-free method. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 27, n. 3, p. 401–406, 2017.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A. S.; CONCEIÇÃO, E. C. da; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Utilization of dynamic light scattering to evaluate *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and solvent-free method. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 27, n. 3, p. 401–406, 2017.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; DUARTE, J. L.; CRUZ, R. A. S.; SOUTO, R. N. P.;

FERREIRA, R. M. A.; PENICHE, T.; CONCEIÇÃO, E. C. da; OLIVEIRA, L. A. R.; FAUSTINO, S. M. M.; FLORENTINO, A. C.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Pterodon emarginatus oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) control. **J. Nanobiotechnol.** v. 15, n. 2, 2017a.

OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; BEZERRA, D. C.; DUARTE, J. L.; CRUZA, R. A. S.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; NOGUEIRA, J.; CONCEIÇÃO, E. C. da; LEITÃO, S.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Essential oil from Pterodon emarginatus as a promising natural raw material for larvicidal nanoemulsions against a tropical disease vector. **Sustainable Chemistry and Pharmacy.** v. 6, p. 1-9, 2017b

OLIVEIRA, L. A. R. et al. Isolation and structural characterization of two new furanoditerpenes from Pterodon emarginatus (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 10, p. 1911–1916, 2017c.

OLIVEIRA, L. A. R. et al. Vouacapane diterpenoids isolated from pterodon and their biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 5, p. 663–672, 2017d.

OLIVEIRA, A.; PRADO, B.; FILHO, D. Copaiba Oil : An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. v. 2012, 2012.

OMS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OPAS/OMS. Informe de Leishmanioses. *Informe Epidemiológico das Américas*. n 6, 2018. Disponível em <[www.paho.org/xmlui/handle/123456789/34857](http://www.paho.org/xmlui/handle/123456789/34857)> Acesso em: 06 mai. 2018.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

Oryan, A.; Akbari, M. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630–635, 2007.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. e1032–e1039, 2010.

PEARSON, R. D. et al. The immunobiology of leishmaniasis. **Reviews of infectious diseases**, v. 5, n. 5, p. 907–927, 1983.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; RONALD, N. In Vivo Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. **SCIENCE**, v. 321, n. August, p. 970–975, 2008.

VIVIANE G. A. PIRES, V. G. A.; DE MOURA, M. R. Preparação de novos filmes poliméricos contendo nanoemulsões do óleo de melaleuca, copaíba e limão para aplicação como biomaterial. **Quim. Nova**, v. 40, n. 1, p. 1-5, 2017

RAPOSO, N. R. B.; DUTRA, R. C.; FERREIRA, A. S. Biological Properties of Sucupira Branca (*Pterodon emarginatus*) Seeds and Their Potential Usage in HealthTreat. **Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention**. Cap. 129, 2011.

REGINA, A. et al. Experimental Parasitology Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology**, v. 187, p. 12–21, 2018.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 447–455, 2010.

RODRIGUES, I. A. et al. Arrabidaea chica Hexanic Extract Induces Mitochondrion Damage and Peptidase Inhibition on *Leishmania* spp. . **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

SACKS D, KAMHAWI S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**. v. 55, p. 453–83., 2001.

SADURNÍ, N. et al. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 438–445, 2005.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. v. 120, p. 204–208, 2008.

SANTOS, A.P.; ZATTA, D.T.; MORAES, W.F.; BARA, M.T.F.; FERRI, P.H.; SILVA, M.R.R.; PAULA, J.R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.

SANTOS, D. C. M.; SOUZA, M. L. S.; TEIXEIRA, E. M.; ALVES, L. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M.; AGUIAR, M. M. G. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. **Journal of Drug Targeting**, 2017.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011

SANTOS, A. O. DOS et al. Experimental Parasitology *Leishmania amazonensis* : Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145–151, 2011

SANTOS, C. M. et al. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of

cutaneous leishmaniasis: Development, characterization, and in vitro skin permeation studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 322–329, 2012.

SANTOS, D. C. M.; SOUZA, M. L. S.; TEIXEIRA, E. M.; ALVES, L. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M.; AGUIAR, M. M. G. A new nanoemulsion formulation improves antileishmanial activity and reduces toxicity of amphotericin B. **Journal of Drug Targeting**, 2017.

SANTOS, C. B.R.; RAMOS, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; SILVA, G.M.; GIULIATTI, S.; BALDERAS-LOPEZ, J. L.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C.T. Oil from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog.: A traditional antiinflammator. Study combining in vivo and in sílico. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 107–120, 2018.

.SANTOS, O. DOS et al. **Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil**. v. 108, n. February, p. 59–64, 2013.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.

SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, n. August, p. 1–6, 2016.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.

SHAKER, D. S. et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, 2019.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: Distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 45, n. 4, p. 255–272, 2008.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SILVA, H. D.; CERQUEIRA, M. A.; SOUZA, B. W. S.; RIBEIRO, C.; AVIDES, M. C.; QUINTAS, M. A. C.; COIMBRA, J. S. R.; CUNHA, M. G. C.; VICENTE, A. A. Nanoemulsions of b-carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. **Journal of Food Engineering**. v.102, p. 130–135, 2011.

SHAKER, D. S. et al. Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, 2019.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 18–45, 2014.

SOARES, D. C. et al. Trans -  $\beta$  -Caryophyllene: An Effective Antileishmanial Compound Found in Commercial Copaiba Oil (Copaifera spp.) . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from Ocimum gratissimum. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2006.

URANW, S. et al. Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis in Nepal : A Retrospective Cohort Study ( 2000 – 2010 ). v. 5, n. 12, p. 1–8, 2011.

VALENTIM, D. S. S. et al. Effects of a nanoemulsion with Copaifera officinalis oleoresin against monogenean parasites of Colossoma macropomum: A Neotropical Serrasalminae. **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 7, p. 1041–1048, 2018.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. DA S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018.

VARELA, M. T. et al. New alkenyl derivative from Piper malacophyllum and analogues: Antiparasitic activity against Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 90, n. 5, p. 1007–1011, 2017.

VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of Piper regnellii var. pallescens. **Parasitology International**, v. 59, n. 2, p. 154–158, 2010.

VERMELHO, A. B. et al. In vitro cytotoxic effects of the essential oil from Croton cajucara (red sacaca) and its major constituent 7- hydroxycalamenene against Leishmania chagasi. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO: Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **World Health organization Geneva**, n. 13, p. 169–180, 2016.



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da eficácia de produtos nanoestruturados contendo óleo de Sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel) no tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental.", protocolo do CEUA: 392/2018 sob a responsabilidade de Andre Luis Branco de Barros que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 03/12/2018.

|                          |                                                      |
|--------------------------|------------------------------------------------------|
| Vigência da Autorização  | 03/12/2018 a 02/12/2023                              |
| Finalidade               | Pesquisa                                             |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Hamster / <i>Mesocricetus auratus</i>                |
| Nº de animais            | 2                                                    |
| Peso/Idade               | 100g / 5(semanas)                                    |
| Sexo                     | feminino                                             |
| Origem                   | Biotério do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG) |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / Balb/c                        |
| Nº de animais            | 7                                                    |
| Peso/Idade               | 20g / 5(semanas)                                     |
| Sexo                     | feminino                                             |
| Origem                   | Centro de bioterismo da UFMG                         |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / balb/c                        |
| Nº de animais            | 7                                                    |
| Peso/Idade               | 20g / 5(semanas)                                     |
| Sexo                     | feminino                                             |
| Origem                   | Centro de bioterismo (ICB/UFMG)                      |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / BALB/C                        |
| Nº de animais            | 7                                                    |
| Peso/Idade               | 20g / 5(semanas)                                     |
| Sexo                     | feminino                                             |
| Origem                   | Centro de bioterismo (ICB/UFMG)                      |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / BALB/C                        |
| Nº de animais            | 7                                                    |
| Peso/Idade               | 20g / 5(semanas)                                     |
| Sexo                     | feminino                                             |
| Origem                   | Centro de bioterismo da UFMG                         |
| <b>*Espécie/linhagem</b> | Camundongo isogênico / Balb/c                        |
| Nº de animais            | 7                                                    |