



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
COORDENAÇÃO DE PESQUISAS EM SOCIEDADE, AMBIENTE E SAÚDE -
COSAS

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE
***Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae)**

BRUNO BEZERRA JENSEN

Manaus/Amazonas

Agosto, 2017

BRUNO BEZERRA JENSEN

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO DE
Libidibia ferrea (Fabales: Fabaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologias para Saúde.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, PhD

Coorientadora: Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski, PhD

Manaus/Amazonas

Agosto, 2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Jensen, Bruno Bezerra

J54a Atividade antileishmania da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae). / Bruno Bezerra Jensen. 2017

87 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco Coorientadora:
Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose Tegumentar. 2. *Libidibia ferrea*. 3. Ensaio *in vitro*.
4. Microemulsão. 5. Ensaio *in vivo*. I. Franco, Antonia Maria Ramos
II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo dom da vida e por ter me proporcionado força durante essa árdua trajetória.

A minha família por todo incentivo e compreensão, principalmente à minha mãe, avó, irmã e tias.

A minha orientadora pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa no Laboratório de Leishmaniose desde a Iniciação Científica, motivando a busca pela disciplina na pesquisa e encorajamento nessa longa trajetória acadêmica.

A minha Coorientadora Claudia D. Comandolli-wyrepkowski por ter me mostrado o caminho da ciência e me acompanhado durante as etapas acadêmicas.

A Profa. Dra. Katia Solange pelo compartilhamento do conhecimento na área de tecnologia farmacêutica, que foi primordial nesse estudo.

A Doutora Fabiane pela grande amizade e ter compartilhado comigo todos os momentos, principalmente as emoções oscilantes.

A Doutora Francimeire pela ajuda essencial em todos os momentos requisitados.

A Doutoranda Ana Flávia por todos os esclarecimentos de dúvidas e apoio durante as graduações desse estudo.

Ao Doutorando Pedro Domingos pela parceria no ensaio biológico *in vivo*.

Ao meu aluno de Iniciação Científica Caio Coutinho pela disposição e apoio durante ao ensaio *in vivo*.

Ao Doutorando Fabrício Rolim pelo auxílio no manuseio dos equipamentos para a caracterização da microemulsão.

A Dra. Maria da Paz por ter me recebido em seu Laboratório de Produtos Naturais do INPA e fornecido toda estrutura para realização da parte química.

Aos mestrandos Paulo e Henrique do Laboratório de Produtos Naturais pela atenção e compartilhamento de ideias nessa área abrangente.

Ao Professor Dr. Fernando Marques pela grande amizade.

As amigas da pós-graduação Anny, Sabrina, Laís e Berna por terem vivenciados grandes momentos durante esse período.

A Prof^a Dr^a. Tatiane Pereira por ter me oportunizado o uso dos equipamentos para caracterização da microemulsão.

Aos mestrandos Arine e Rodrigo Silva pelo auxílio no desenvolvimento da microemulsão.

Ao gestor do Biotério Central do INPA, Dr. Leonardo Brandão pela acessibilidade da infraestrutura.

A colega de Laboratório Pauline Soldera pelo apoio no Laboratório em que compartilhamos.

A Dra. Maricleide Naiff pelas palavras de incentivo.

Aos técnicos Lourival Maciel e Ana Cleide pelo auxílio durante as etapas experimentais.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Prof. Dr. Carlos Gustavo, por todo apoio e acessibilidade nos momentos precisos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação que me instigaram a buscar cada vez mais conhecimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por ter consolidado o meu conhecimento nessa área multidisciplinar.

A Banca Examinadora por terem aceitado o convite de participar da defesa desta dissertação.

A Capes pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o término deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

(Albert Einstein)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença negligenciada de ocorrência em 98 países, considerada um problema de saúde pública. O tratamento utilizado para essa enfermidade no Brasil, vem demonstrando ineficácia, devido à ocorrência de reações adversas, resistência e devido a via de administração ser inacessível aos pacientes que residem em regiões mais longínquas, além do longo período de aplicação. Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que várias partes das plantas possuem atividade contra o protozoário causador da doença, servindo de base para a formulação de fitoterápicos ou como alvo para a obtenção de princípios ativos contra a leishmaniose. *Libidibia ferrea* é uma espécie vegetal popularmente conhecida como jucá, que vem demonstrando grande interesse pela pesquisa terapêutica, com várias atividades biológicas comprovadas, como por exemplo, o uso do extrato metanólico e suas frações avaliadas em trabalhos preliminares apresentaram proeminente atividade antileishmania. Outro ponto de grande relevância é na escolha do veículo mais eficaz para alcançar o efeito terapêutico. A microemulsão é um bom recurso por ser um sistema estável, considerado um ótimo veículo de diferentes classes medicamentosas, onde através da via transdérmica tem demonstrado uma boa permeabilidade cutânea, tornando-se uma alternativa para o tratamento local dessa doença. Desse modo o objetivo desse trabalho é de avaliar o potencial antileishmania das subfrações de diclorometano (DCM) de *L. ferrea*, avaliando a sua atividade biológica *in vitro*, assim como, desenvolver e caracterizar uma microemulsão tópica incorporada com essa fração, realizando ensaio experimental *in vivo*. Foi obtida a fração DCM a partir do fracionamento do extrato MeOH do fruto de *L. ferrea*, permitindo novos fracionamentos pelo método de cromatografia em coluna. Essas subfrações foram submetidas aos ensaios *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, pelo método colorimétrico Alamar Blue[®], quanto à atividade citotóxica em macrófagos peritoneais, com a finalidade de destacar a mais efetiva para a atividade antileishmania. A fração DCM também foi utilizada para o desenvolvimento de uma microemulsão tópica. Esta formulação foi caracterizada por Potencial Zeta com avaliação do tamanho de gotículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS), índice de polidispersão (IPD) e análise físico-química. Nos ensaios *in vivo*, os hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente inoculados com *L. amazonensis* foram agrupados para receber tratamento local com a microemulsão incorporada com a fração DCM e posteriormente eutanasiados para retirada de fragmentos de tecidos para análise por impressão por aposição e cultivo de biópsia de lesões. Os resultados dos bioensaios demonstraram que a subfração 8 (Sf8) apresentou atividade contra *L. amazonensis*, com IC₅₀ 52,33 µg.mL⁻¹. Não foi observada atividade citotóxica em macrófagos expostos a essa subfração. A Sf8 reduziu em 21,5% o número de formas amastigotas *in vitro*. Quanto ao ensaio *in vivo* a microemulsão controlou o desenvolvimento da lesão e redução da carga parasitária, não houve diferença estatística comparando com o tratamento padrão, Glucantime[®]. Esse estudo permitiu identificar a subfração com maior atividade antileishmania e o desenvolvimento de uma formulação promissora para o tratamento da leishmaniose tegumentar, contribuindo para elaboração de um proposto fitoterápico, sugerindo inclusive, a continuidade de estudos futuros com a sua associação com o Glucantime[®] para fins de potencializar essa terapia.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar; *Libidibia ferrea*; Ensaio *in vitro*; Microemulsão; Ensaio *in vivo*.

ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis is a neglected disease occurring in 98 countries, considered a public health problem. The treatment used for this disease in Brazil has been shown to be ineffective, due to the occurrence of adverse reactions, resistance and because the route of administration is inaccessible to patients residing in furthest regions, besides the long period of application. In recent years, studies have shown that several parts of plants have activity against the protozoan that causes the disease, serving as the basis for the formulation of herbal medicines or as a target for obtaining active principles against leishmaniasis. *Libidibia ferrea* is a plant species popularly known as jucá, which has been showing great interest in therapeutic research, with several proven biological activities, such as the use of methanolic extract and its fractions evaluated in preliminary studies showed prominent antileishmania activity. Another point of great relevance is in choosing the most effective vehicle to achieve the therapeutic effect. One area that is being well studied is nanostructured, such as the microemulsion, a stable system, considered a great vehicle of different drug classes, where through the transdermal route has shown a good skin permeability, becoming an alternative for local treatment of this disease. Thus, the objective of this work is to evaluate the antileishmanic potential of *L. ferrea* dichloromethane (DCM) subfractions, evaluating its biological activity in vitro, as well as to develop and characterize a topical microemulsion incorporated with this fraction, performing an in vivo experimental study. The fraction DCM was obtained from the fractionation of the MeOH extract of the fruit of *L. ferrea*, allowing new fractions by the method of column chromatography. These subfractions were submitted to in vitro assays against promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* by the Alamar Blue[®] colorimetric method for cytotoxic activity in peritoneal macrophages, in order to highlight the most effective for antileishmania activity. The DCM fraction was also used for the development of a topical microemulsion. This formulation was characterized by Zeta Potential with droplet size evaluation by dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (IPD) and physicochemical analysis. In the in vivo assays, the hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentally inoculated with *L. amazonensis* were pooled to receive local treatment with the microemulsion incorporated with the DCM fraction and subsequently euthanized for removal of tissue fragments for apposition print and biopsy culture analysis of injuries. The results of the bioassays showed that subfraction 8 (Sf8) showed activity against *L. amazonensis*, with IC₅₀ 52.33 µg.mL⁻¹. No cytotoxic activity was observed in macrophages exposed to this subfraction. Sf8 reduced the number of amastigotes in vitro by 21.5%. Regarding the in vivo assay the microemulsion controlled the development of the lesion and reduction of the parasitic load, there was no statistical difference comparing with the standard treatment, Glucantime[®]. This study allowed to identify the subfraction with greater antileishmania activity and the development of a promising formulation for the treatment of tegumentary leishmaniasis, contributing to the elaboration of a proposed phytotherapy, suggesting the continuity of future studies with its association with Glucantime[®] for purposes to potentiate this therapy.

Keys-word: Cutaneous leishmaniasis; *Libidibia ferrea*; *In vitro* assay; microemulsion; *In vivo* assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Formas promastigota (a) e amastigota intracelular (b) de <i>Leishmania</i>	17
Figura 02. Ciclo biológico da Leishmaniose.....	18
Figura 03. Formas Clínicas das lesões de Leishmaniose. (a) Lesão cutânea. (b) Lesão mucocutânea. (c) Lesão cutânea difusa.....	19
Figura 04. Incidência mundial da Leishmaniose Tegumentar no ano de 2012.....	21
Figura 05. Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por ano confirmado, entre os anos de 2010 a 2015, nos estados da Região Norte.....	23
Figura 06. Estrutura química do Antimoniato de meglumina.....	26
Figura 07. Estrutura química da Anfotericina B.....	27
Figura 08. Estrutura química do Isetionato de pentamidina.....	28
Figura 09. Estrutura química da pentoxifilina.....	29
Figura 10. Estrutura química da Apigenina.....	31
Figura 11. Espécie vegetal <i>Libidibia ferrea</i>	32
Figura 12. Gotículas de microemulsão e nanoemulsão.....	35
Figura 13. Fluxograma da trajetória metodológica do estudo.....	40
Figura 14. Fluxograma geral da preparação dos extratos obtidos de epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i>	42
Figura 15. Fluxograma da preparação das partições do extrato obtidos de epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i>	43
Figura 16. Mecanismo da cromatografia em camada delgada.....	44
Figura 17. Fluxograma do Delineamento experimental utilizado no estudo experimental <i>in vivo</i>	50
Figura 18. Curva de crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584) acompanhada por 7 dias, com contagem diária.....	55
Figura 19. Atividade antileishmania das subfrações de <i>Libidibia ferrea</i> frente a promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584).....	59
Figura 20. Atividade citotóxica das subfrações mais ativas em macrófagos de cultivo primário (murino) incubados a 37 °C por 48 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica Alamar Blue®.....	61
Figura 21. Atividade das Subfrações frente a formas amastigotas (<i>Leishmania amazonensis</i>) interiorizadas em macrófagos de cultivo primário (murino).....	62

Figura 22. Efeito da atividade das subfrações de <i>Libidibia ferrea</i> contra amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em macrófagos de cultivo primário (murinos).....	63
Figura 23. Aspecto das Microemulsões: A) Placebo (MPLA) e B) incorporada com a fração diclorometano de <i>Libidibia ferrea</i> (MFDCM).....	64
Figura 24. Comportamento da variação de viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das microemulsões.....	65
Figura 25. Comportamento reológico das microemulsões.....	65
Figura 26. Distribuição dos tamanhos das microemulsões: A) MPLA (Placebo); B) MFDCM (incorporada com a fração diclorometano de <i>Libidibia ferrea</i>).....	67
Figura 27. Evolução Clínica do volume das lesões em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados no focinho com <i>Leishmania amazonensis</i> , durante o tratamento local.....	68
Figura 28. Aspecto clínico macroscópico das lesões cutâneas em <i>Mesocricetus auratus</i> infectados por <i>Leishmania amazonensis</i> no período inicial ao término do tratamento.....	70
Figura 29. Avaliação ponderal dos hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> , presente nesse experimento.....	71
Figura 30. Score de parasitas viáveis visualizados em meios de cultivo NNN (Novy-McNeal-Nicolle) sete dias após sementeira de fragmentos das lesões dos hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> dos grupos experimentais.....	72
Figura 31. Índices da abundância relativa de amastigotas e do percentual de macrófagos infectados (carga parasitária) visualizados e quantificados por microscopia óptica (1000x) nas impressões em lâminas dos tecidos proveniente dos locais de lesão de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.....	20
Tabela 02 – Número de notificação de Leishmaniose Tegumentar Americana entre os anos de 2010 a 2015, nas regiões do Brasil.....	22
Tabela 03 – Relação da eficácia e custo dos medicamentos padrões para Leishmaniose tegumentar.....	29
Tabela 04 – Tipos de tratamento utilizados nesse ensaio biológico <i>in vivo</i>	51
Tabela 05 – Rendimento das subfrações de <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. Ex Tul) LP Queiroz.....	54
Tabela 06 – Atividade antileishmania para as formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e valores calculados de IC ₅₀ por regressão linear para as subfrações de <i>Libidibia ferrea</i>	60
Tabela 07 – Análise das gotículas dispersas das Microemulsões Placebo (MPLA) e incorporada com a fração diclorometano de <i>Libidibia ferrea</i> (MFDCM).....	66

LISTA DE SÍMBOLOS

° – graus

°C – graus Celsius

® – marca registrada

% – por cento

cm – centímetro

g – grama

µm – micrômetro

mg – miligrama

min – minuto

µL – microlitro

mL – mililitro

nm – nanômetro

rpm – rotações por minuto

ζmV – potencial zeta

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP** – Adenosina Difosfato
- AM** – Antimoniato de Meglumina
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- GTP** – Guanina Trifosfato
- LC** – Leishmaniose Cutânea
- LCD** – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LMC** – Leishmaniose Mucocutânea
- LT** – Leishmaniose Tegumentar
- LTA** – Leishmaniose Tegumentar Americana
- NNN** – Meio de cultura sólido Novy, McNeal e Nicolle
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- RPMI 1640** – Roswell Park Memorial Institute medium 1640
- Sb^v** – Antimônio Pentavalente
- SBF** – Soro Fetal Bovino
- SFM** – Sistema Fagocítico Mononuclear
- SINAN** – Sistema de Informação de Agravos e Notificações
- WHO** – World Health Organization
- L. ferrea*** – *Leishmania ferrea*
- L. amazonensis*** – *Leishmania amazonensis*
- L. guyanensis*** – *Leishmania guyanensis*
- FDCM** – Fração Diclorometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 O PROTOZOÁRIO	17
2.1.1 Ciclo Biológico da Leishmaniose	18
2.2 A LEISHMANIOSE.....	19
2.3 EPIDEMIOLOGIA	20
2.3.1 Epidemiologia Mundial	20
2.3.2 Epidemiologia no Brasil.....	21
2.3.3 Epidemiologia no Amazonas.....	22
2.4 DIAGNÓSTICO.....	23
2.5 TRATAMENTO CONVENCIONAL.....	25
2.6 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTILEISHMANIA.....	29
2.7 <i>Libidibia ferrea</i> COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO	31
2.8 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO: MICROEMULSÃO.....	34
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	41
4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO MeOH DE <i>Libidibia ferrea</i>	41
4.3 PARTIÇÕES DO EXTRATO	42
4.4 SUBFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO DCM DE <i>L. ferrea</i>	43
4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	43
4.5 ATIVIDADES <i>IN VITRO</i> COM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i>	44
4.5.1 Teste de Esterilidade do meio de cultivo.....	44
4.5.2 Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária	44
4.5.3 Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	45
4.5.4 Determinação da atividade antileishmania e concentração inibitória 50% (IC ₅₀) das substâncias isoladas da fração DCM de <i>Libidida ferrea</i>	45

4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i>	46
4.6.1 Determinação da atividade citotóxica.....	47
4.6.2 Determinação da atividade antileishmania e da concentração inibitória 50% (IC ₅₀) em amastigotas interiorizados em macrófagos.....	47
4.7 PREPARAÇÃO DA MICROEMULSÃO.....	48
4.7.1 Determinação do pH.....	48
4.7.2 Reologia.....	48
4.7.3 Índice de refração.....	48
4.7.4 Tamanho de gotículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e índice de polidispersão (IPD).....	48
4.7.5 Potencial Zeta.....	49
4.8 ENSAIO BIOLÓGICO <i>IN VIVO</i>	49
4.8.1 Procedência dos animais.....	49
4.8.2 Inoculação.....	49
4.8.3 Delineamento experimental.....	50
4.8.4 Aspecto clínico.....	51
4.8.5 Eutanásia.....	52
4.8.6 Diagnóstico parasitológico.....	52
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial através do repasto sanguíneo do inseto flebótomo fêmea (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; BRASIL, 2017). Essa patologia pode manifestar diferentes formas clínicas, dentre elas, a leishmaniose cutânea e a cutâneo-mucosa, relacionadas com uma determinada espécie de *Leishmania* e da relação do parasito com seu hospedeiro (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; MOTA; MIRANDA, 2011).

Essa doença apresenta registro em 98 países, distribuídos nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com notificações de 220.000 casos anualmente, caracterizando-se como um problema de saúde pública (ALVAR et al., 2012). Somente nas Américas, a Leishmaniose tegumentar é endêmica em 18 países, com casos registrados do México à Argentina (OPAS, 2015). O Brasil apresenta uma média anual de 26.008 casos relatados de LT, no entanto, em 2015 apresentou apenas 19.395 casos, a redução desse número está diretamente relacionada com a quantidade de notificações (ALVAR et al., 2012; OPAS, 2015; SINAN/SVS/MS, 2017). Essa endemia, considerada um grave problema de saúde destaca-se em três regiões no Brasil, região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (GRIMALDI et al., 1989; COSTA, 2005). Dentre os estados na região norte, o Amazonas registrou 10.533 casos apenas no período de 2010 a 2015 (SINAN/SVS/MS, 2017).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) permaneceram há mais de meio século como primeira escolha terapêutica para o tratamento das leishmanioses (LIMA et al., 2007). Segundo o Ministério da Saúde, atualmente a indicação da droga deve considerar a espécie da *Leishmania* infectante, recomenda-se como tratamento de pacientes infectados por *L. braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*, o Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]) endovenoso ou intramuscular, por um período de 20 dias consecutivos. Nos casos de pacientes oriundos de áreas onde há predomínio de *L. guyanensis* a primeira escolha para o tratamento é o Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) endovenoso ou intramuscular, de três a dez doses (BRASIL, 2017).

Contudo, apresentam inúmeras problemáticas, como a via de administração (via parenteral), longo tempo de aplicação e manifestação de efeitos colaterais, que

contribuem no abandono do tratamento, consecutivamente induzindo a resistência do parasito, reduzindo a eficácia do tratamento. As reações mais comuns são de graus leves a moderadas, como, mialgia, vômitos, hipotensão, insuficiência renal aguda e nefrotoxicidade (BRASIL, 2017; FERREIRA; MAROCHIO; CARVALHO, 2012).

A ausência de terapia mais acessível tem exigido o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes, seguros e acessíveis aos doentes em qualquer região, e uma dessas alternativas, é o uso das plantas medicinais, que apresentam metabólitos secundários em abundância, que podem ser utilizados para fins terapêuticos (MISHRA; TIWARI, 2011). A OMS vem considerando como prioridade a investigação farmacológica de plantas medicinais para tratamento de doenças, pois estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, a maioria destas de plantas (CALIXTO et al., 2001; WHO, 2011). Nas últimas décadas, 69% de todos os novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas foram derivados ou baseados por produtos naturais (NAGLE et al., 2014).

Uma das espécies vegetais que vem demonstrando grande interesse para uma proposta terapêutica é a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea*, árvore nativa no Brasil, conhecida popularmente como Jucá ou Pau-ferro, apresenta ampla distribuição e propriedades econômicas e também farmacológicas (SOUZA, 2007). Estudos químicos e farmacológicos de extratos obtidos de *L. ferrea* tem demonstrado seu potencial biológico anti-inflamatório (CARVALHO et al., 1996), antimicrobiano e antifúngico (SAMPAIO et al., 2009), agente hipoglicemiante (VASCONCELOS et al., 2011), cicatrizante, e antioxidante (BATUBARA; MITSUNAGA; OHASHI, 2009; SILVA et al., 2011). Estudos químicos com esta espécie têm demonstrado a presença de compostos fenólicos com possíveis aplicações farmacológicas, como as chalconas e os polifenóis (NAKAMURA et al., 2002; NOZAKI et al., 2007).

Os trabalhos de Cortez (2004) e Falcão (2010) foram pioneiros na avaliação da inibição do crescimento de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* sob extratos obtidos de *L. ferrea*. Assim como o trabalho de Comandolli-Wyrepkowski (2015), que realizou testes biológicos *in vitro* com as frações Hexânica, Diclorometânica, Acetato de etila e n-butanólica, onde a fração DCM apresentou um melhor resultado antileishmania contra as formas

promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, e baixo índice de citotoxicidade.

Contudo, uma questão que deve ser avaliada ao descobrir uma fração ou substância ativa é quanto ao estudo da via de administração, pois é imprescindível para determinação da melhor forma de aplicação dos medicamentos com atividade biológica em ensaios *in vitro*, para que possam tentar reproduzir a sua eficácia em animais de experimentação. A via de administração transdérmica tem sido reconhecida como uma via de elevada potencialidade para administração de fármacos (ELSHAFEEY et al., 2012). Essa via oferece vantagens em relação a outras vias de administração, como a via oral, com ausência de metabolismo de primeira passagem, por não ser invasivo, mais cômodo ao paciente e possibilitar a liberação controlada do fármaco (GALLO, 1989; SUBEDI et al., 2010).

A área de liberação de fármacos está surgindo a um ritmo muito rápido em relação às últimas décadas. A microemulsão é um sistema nanoestruturado inovador para o âmbito farmacológico, e é considerada uma alternativa para diferentes classes terapêuticas, como, antiinflamatórios não estereoidais, anestésicos, derivados de plantas medicinais, antimicrobianos, entre outros (FIGUEIREDO et al., 2013; SVIRSKIS et al., 2013; TIRNAKSIZ et al., 2012; TIWARY; SAPRA; JAIN, 2007).

Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo de avaliar o potencial antileishmania da fração DCM de *L. ferrea*, subfracionando-a e verificando a sua atividade biológica *in vitro*, assim como, desenvolver e caracterizar uma microemulsão tópica incorporada com essa fração, realizando ensaio experimental *in vivo*, com hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. amazonensis*, na tentativa de desenvolver uma formulação com eficácia terapêutica e mais acessível para o tratamento da leishmaniose tegumentar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PROTOZOÁRIO

O protozoário do gênero *Leishmania* foi descrito pela primeira vez em 1903, por Leishman e Donovan, no entanto, em períodos distintos e isolados (ROSS, 1903). Este protozoário apresenta a seguinte posição sistemática (após LEVINE et al., 1980):

Reino: Protista Haeckel, 1866

Sub-reino: Protozoa Goldfuss, 1817

Filo: Sarcomastigophora Desing, 1866

Classe: Zoomastigophorea Calkins, 1909

Ordem: Kinetoplastida Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976

Sub-ordem: Trypanosomatina Kent, 1880

Família: Trypanosomatidae Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905

Gênero: *Leishmania* Ross, 1903

São parasitas digenéticos (heteroxenos), apresentando duas principais características morfológicas, a forma promastigota (presença de flagelo livre) encontrada no trato digestivo do inseto hematófago, conhecido como flebotomíneo (Diptera: Psychodidae), e a forma amastigota de característica oval (ausente de flagelo livre) intereorizada nas células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados (Figura 01) [LAINSON, 1985; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012].

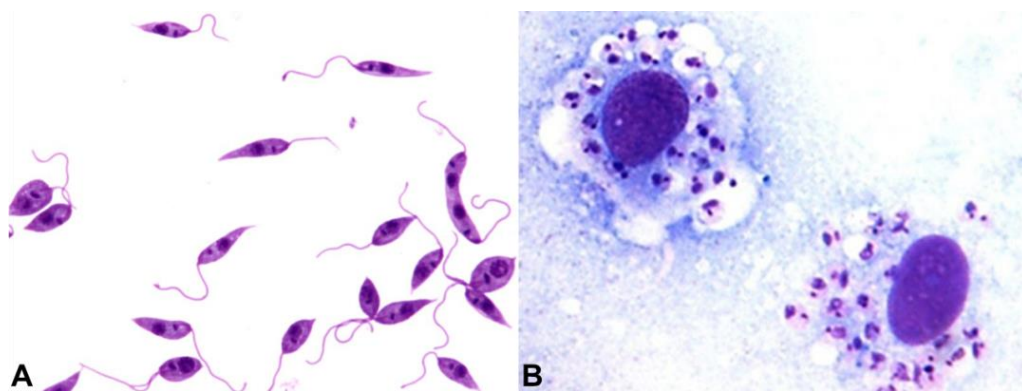


Figura 01. Formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania* sp.

(Fonte: www.medicina.ufmg.br; alfa.socialappscloud.com).

2.1.1 Ciclo Biológico da Leishmaniose

O ciclo biológico tem início quando as fêmeas de flebotomíneos infectadas com o parasita do gênero *Leishmania* realizam o repasto sanguíneo, inoculando junto com sua saliva, as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado, estimando-se de 10 a 100 parasitos, que irão ser fagocitados pelas células fagocíticas mononucleares, bem como células dendríticas (DCs) ou neutrófilos, mas infectando preferencialmente os macrófagos (SCHLEIN, 1993; RITTIG; BOGDAN et al., 2000). No interior dessas células, as promastigotas transformam-se rapidamente em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária, até o rompimento das células fagocíticas e invasão dos parasitas em novas células não infectadas. Na realização de um novo repasto sanguíneo, as fêmeas do flebotomo ingerem o parasita na forma amastigota, que passarão por um processo de desenvolvimento, denominado metaciclogênese no interior do intestino do vetor, após passarem por alguns estágios intermediários através de processos enzimáticos, até migrarem para a porção anterior do aparelho digestivo do inseto, aptas a causar a infecção no hospedeiro mamífero (promastigotas metacíclicas), reiniciando um novo ciclo (Figura 02) [LAINSON; SHAW, 1978; LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006].

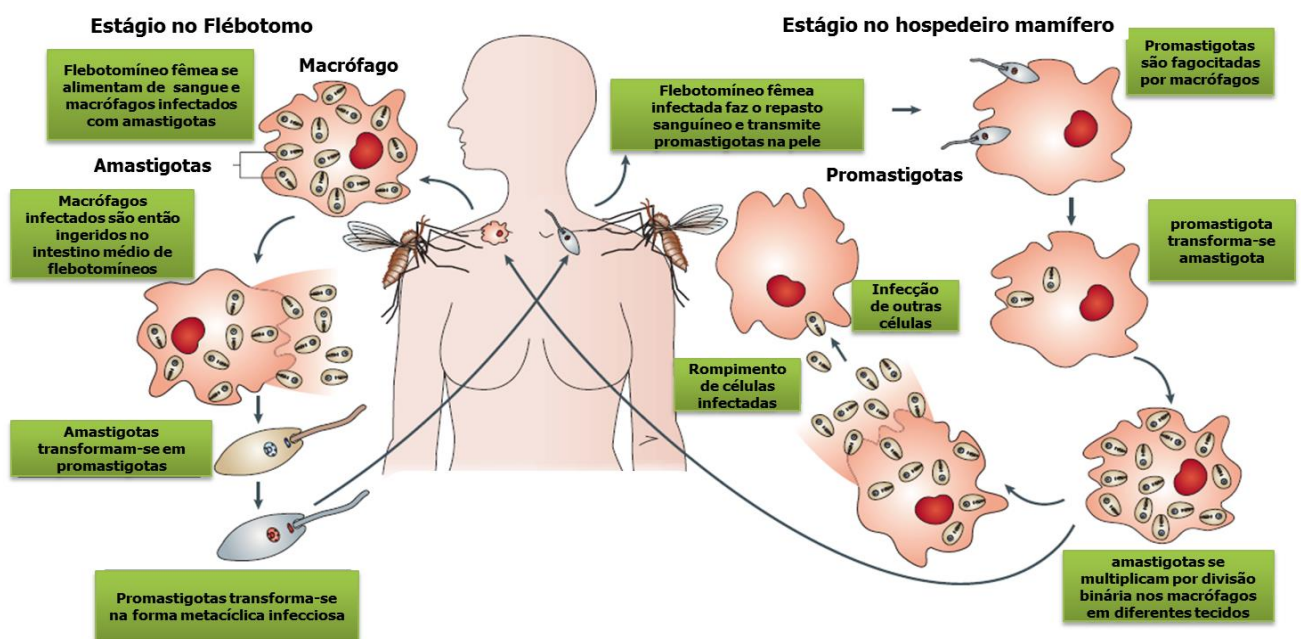


Figura 02. Ciclo biológico da Leishmaniose (Fonte: Modificado LIPOLDOVÁ, 2006).

2.2 A LEISHMANIOSE

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical negligenciada de grande significância pelos níveis de evolução clínica dos pacientes (BRASIL, 2017; PIGOTT et al., 2014). Sua transmissão ocorre de forma vetorial através da fêmea de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* infectada com o protozoário do gênero *Leishmania* (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; BRASIL, 2017).

Essa doença é considerada como um grande problema de saúde pública, principalmente por ser enquadrada como uma doença negligenciada, devido acometer em torno de 12 milhões de pessoas mundialmente, muitas vezes vivendo em estado de extrema pobreza e por apresentar reduzidos índices de investimento no desenvolvimento de pesquisas afins, até mesmo por não despertarem interesse da indústria farmacêutica no âmbito lucrativo (REDDY et al., 2007; CASTRO, 2012; BRASIL, 2017).

A leishmaniose tegumentar pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro. Classificam-se principalmente como: Leishmaniose cutânea (LC), caracterizada pela formação de úlceras únicas, Leishmaniose mucocutânea (LM) com características de lesões mucosas agressivas que afetam as regiões nasofaríngeas. Além das formas citadas, existem outras formas clínicas, como a Leishmaniose difusa (LCD), uma variante da LC (Figura 03) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; MOTA; MIRANDA, 2011).



Figura 03. Formas Clínicas das lesões de Leishmaniose. (a) Lesão cutânea. (b) Lesão mucocutânea. (c) Lesão cutânea difusa. (Fonte: Carvalho, 2002; Pinheiro, 2006).

No Brasil, a forma tegumentar é causada por sete espécies distintas, sendo seis delas do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. De acordo com cada espécie existem particularidades concernentes às manifestações clínicas,

vetores, resposta imune em resposta a infecção e a resposta terapêutica [Tabela 01] (SILVEIRA; LAINSON 2004; VALE; FURTADO, 2005).

Tabela 01 – Espécies do gênero *Leishmania* responsáveis pela Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.

Espécies	Manifestações Clínicas
<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC; LCD raramente
<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC; LMC
<i>L. (V.) guyanensis</i>	LC; LMC
<i>L. (V.) lainsoni</i>	LC
<i>L. (V.) naiffi</i>	LC
<i>L. (V.) shawi</i>	LC
<i>L. (V.) lindenbergi</i>	LC

LC – Leishmaniose Cutânea; LMC – Leishmaniose Mucocutânea; LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa. (L.) = *Leishmania*; (V.) = *Viannia*. Fonte: Silveira; Furtado (2004).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

2.3.1 Epidemiologia Mundial

A Leishmaniose Tegumentar apresenta distribuição mundial nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com registro anual de 220.000 casos, em sua maioria, países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a disseminação está associada com as mudanças socioeconômicas, com população de baixa renda e poucos recursos médicos (SHAW, 1987; LAINSON; JESUS, 2006; ALVAR et al., 2012). Os dez países com maior número de casos notificados são o Afeganistão, Algéria, Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru (Figura 04), que juntos totalizam 70 a 75% da incidência global de LT (ALVAR et al., 2012).

Nas Américas, a Leishmaniose Tegumentar (Cutânea e mucosa) é endêmica em 18 países, com casos distribuídos do México à Argentina. No período de 2001 a 2013 foram registrados uma média anual de 57.228 casos. Em uma análise do período de 2010 a 2013, foi observada uma redução de casos registrados (19,2%) diretamente relacionado à redução de notificações (OMS, 2015).

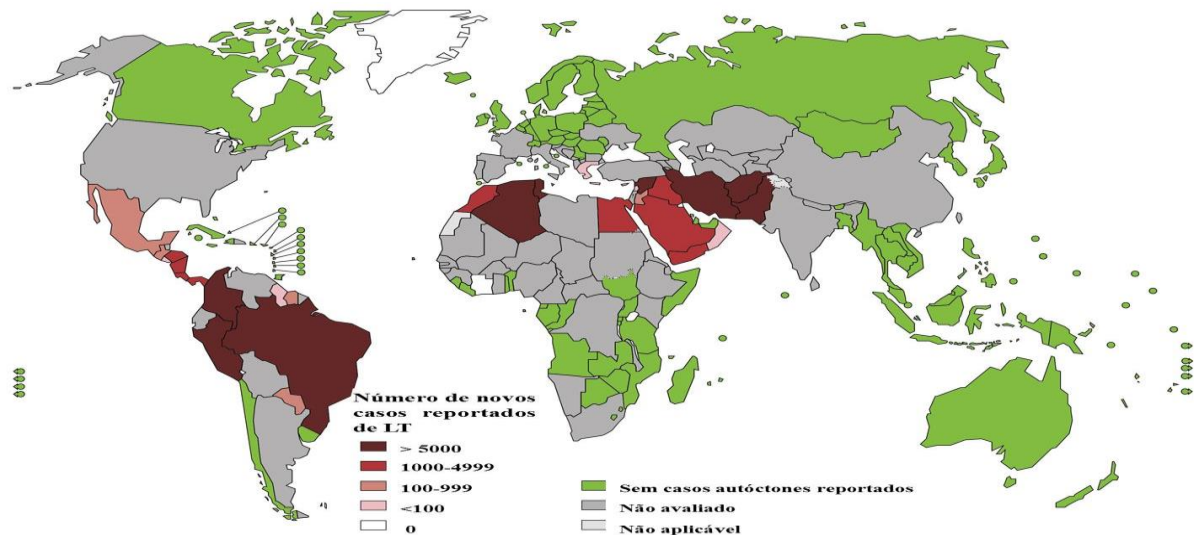


Figura 04. Incidência mundial da Leishmaniose Tegumentar no ano de 2012.

Fonte: OMS, 2013. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png. Acesso em 03/01/2017.

2.3.2 Epidemiologia no Brasil

O Brasil apresenta um total de 26.008 casos relatados de Leishmaniose Tegumentar por ano, demonstrando-se majoritário dentre os países das Américas (ALVAR et al., 2012). No período de 1995 a 2015 ocorreram 534.662 casos no Brasil, com relevantes coeficientes de incidência e prevalência, apresentando tendência de aumento do número de casos. Isso, quando comparando os dados a partir do ano de 1985, quando foram implantadas ações de vigilância e controle de LTA no país, com o número de 5.000 casos naquela época (BRASIL, 2013; NEGRÃO; FERREIRA, 2014; SINAN/SVS/MS, 2017). Essa endemia de grave problema da saúde pública destaca-se em três regiões no Brasil, região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (COSTA, 2005).

No período de 2010 a 2015 a LTA apresentou uma média anual de 21.672 casos novos no país, com o coeficiente de detecção de 11,7 casos por 100.000 habitantes em 2012 (SINAN/SVS/MS, 2017). As regiões com maior número de casos novos são a região Norte e Nordeste, apresentando 9.983 e 8.124 respectivamente, em 2012. Os números de registros mais elevados foram na região Norte, seguidos das regiões Centro-Oeste e Nordeste, conforme apresentado na tabela 02. A

interação do homem com o meio ambiente é muitas vezes determinante na rede de causalidades múltipla dessa doença (GRIMALDI et al., 1989).

Tabela 02 – Notificações de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana entre os anos de 2010 a 2015, nas regiões do Brasil.

Região/Ano	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Total
TOTAL	21.863	21.337	23.420	18.130	20.227	19.283	124.260
Região Norte	7.108	8.615	10.196	8.407	10.387	8.939	53.652
Região Nordeste	8.911	7.952	8.279	5.355	4.969	5.152	40.618
Região Sudeste	2.428	2.179	1.388	1.150	1.460	1.762	10.367
Região Sul	253	317	439	296	373	493	2.171
Região Centro-Oeste	3.163	2.274	3.118	2.922	3.038	2.937	17.452

Fonte: SINAN/SVS/MS, 2017.

2.3.3 Epidemiologia no Amazonas

No Estado do Amazonas, o número de notificações de leishmaniose é bastante significativo (Figura 05), possivelmente relacionado com a abertura de novas estradas e a instalação de novos núcleos residenciais em áreas onde, previamente, existia densa floresta tropical, os treinamentos militares, na selva (TALHARI et al., 1988; PINHEIRO et al., 2008). Entre os estados da Região Norte, o Amazonas está na segunda colocação em número de casos notificados de LTA, ficando atrás apenas do estado do Pará (Figura 05).

Das sete espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil relacionadas à LTA, apenas quatro delas são encontradas no Estado do Amazonas, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. naiffi* e *L. guyanensis*, sendo a última com maiores índices de prevalência (CAMARA et al., 2010). Algumas informações quanto a casos humanos isolados de *L. lainsoni* (BRASIL, 2017) e *L. shawi* (comunicação pessoal, Guerra,

2016) no Estado já foram descritos no Estado, sem confirmação quanto a serem casos autóctones.

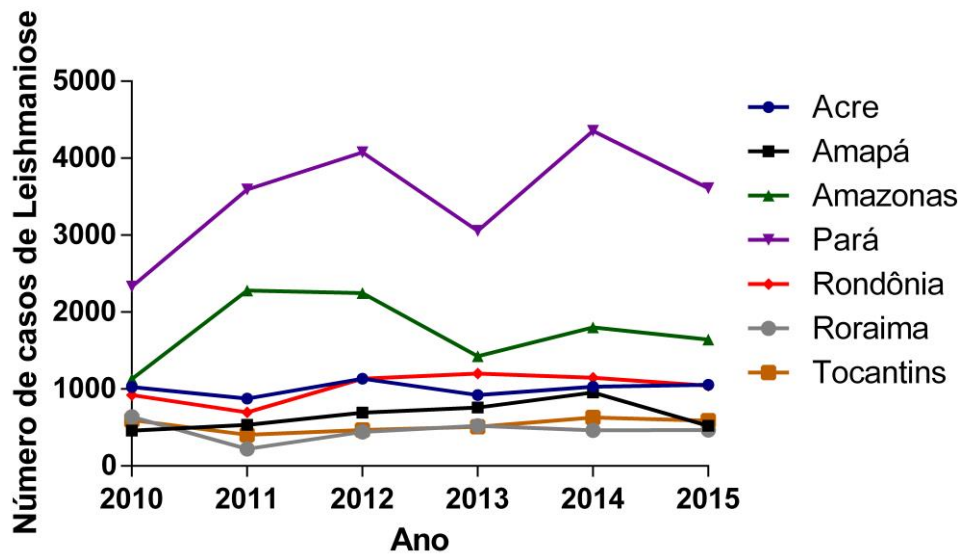


Figura 05. Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por ano confirmado, entre os anos de 2010 a 2015, nos estados da Região Norte. Fonte: SINAN/SVS/MS, 2017.

No Amazonas, o município de Manaus registra o maior número de casos, seguido do município de Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva. Em 2013, foram notificados 725 casos de LTA em Manaus, 108 em Presidente Figueiredo e 100 em Rio Preto da Eva (SINANNET, 2013).

2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (como pesquisa parasitológica ou imunológica), normalmente é necessária a associação de alguns desses métodos para garantir um diagnóstico final (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O diagnóstico clínico baseia-se na maioria das vezes nas características das lesões juntamente com o processo de anamnese, onde os dados epidemiológicos são também de grande relevância, para que se possa realizar o diagnóstico diferencial das outras dermatoses granulomatosas que apresentam lesões semelhantes à LTA (GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES, 2016). No entanto, não é possível determinar com exatidão, pois a maioria dos pacientes relata o uso de tratamentos não convencionais antes da procura da assistência médica, dificultando

o diagnóstico, sendo assim, necessitando do auxílio de outros métodos de diagnóstico como confirmatório (NAIFF-JUNIOR et al., 2009).

O diagnóstico parasitológico é o método que vai garantir com mais certeza o processo infeccioso a partir do achado de parasita, que pode ser realizado através de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e indireta (BRASIL, 2013; GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES, 2016; BRASIL, 2017). O exame direto de esfregaços corados é realizado com o material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda da úlcera, com o qual é feito o esfregaço em lâmina por oposição, e corado com Giemsa ou Leishman (BRASIL, 2013). Os parasitas crescem relativamente bem em diversos meios de cultivo à temperatura entre 24 e 26 °C e o meio mais empregado para isolamento é o meio bifásico NNN (MCNEAL, 1904; NICOLLE, 1908; NOVY), propício ao crescimento dos parasitas. Geralmente após o quinto dia já pode ser encontrado as formas promastigotas do parasita (BRASIL, 2013).

O isolamento *in vivo* é realizado a partir da inoculação do material obtido por biópsia ou raspado de lesão, triturado em solução salina, aplicados por via intradérmica em animais de laboratório, de preferência hamster (*Mesocricetus auratus*), nas patas posteriores ou focinho, as lesões desenvolvem-se a partir de um mês, sendo assim, necessário o acompanhamento do animal por três a seis meses (GONTIJO; CRAVALHO, 2003; BRASIL, 2013; NEVES, 2016).

O diagnóstico histopatológico é dado a partir da obtenção do fragmento de pele, que é submetido às técnicas histológicas de rotina, onde normalmente é possível identificar cinco padrões histopatológicos: 1- Reação exsudativa celular; 2- Reação exsudativa e necrótica; 3- Reação exsudativa e necrótica-granulomatosa; 4- Reação exsudativa e granulomatosas e 5- Reação exsudativa e tuberculoide, mas é no encontro de amastigotas que se pode definir ou sugerir o diagnóstico (MAGALHAES, 1986).

O diagnóstico molecular é realizado a partir da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) – PCR, que é um teste que permite amplificar em escala exponencial sequências específicas de DNA, no qual vários pares de iniciadores diferentes também vêm sendo utilizados, obtidos a partir de sequências de genes do ácido ribonucleico ribossômico (RNA), sequências de gene, mini-exon derivados de genes de RNA e repetição genômica de sequências de minicírculos de kDNA (ISAZA et al., 2002; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Essa

técnica apresenta alta sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades relativamente baixas de DNA do parasita. Uma das técnicas que vem demonstrando grandes vantagens é a PCR em tempo real (qPCR), com a possibilidade de se utilizar dados computadorizados, não sendo necessário um técnico especializado em parasitologia, fácil de identificar a espécie do parasito. Entretanto, é uma técnica de laboratório de difícil uso na rotina, devido o custo, necessitando de um termociclador especial e reagentes diferenciados e profissionais capacitados (MURRAY et al., 2005; BRASIL, 2017).

No diagnóstico imunológico podem-se destacar duas técnicas bastante utilizadas para diagnosticar a LTA: Intradermorreação de Montenegro (IDRM), teste imunológico utilizado no Brasil, capaz de avaliar a reação de hipersensibilidade tardia no paciente, a partir do inóculo de 100 µL de antígeno intradermicamente na face interna do braço, havendo reação positiva, verifica-se uma reação inflamatória local formando um nódulo ou pápula, e é utilizado para o diagnóstico ou monitoramento de protocolos de vacinação contra a LTA (NOGUEIRA et al., 2008). Outro teste imunológico comumente utilizado é o sorológico como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), técnica sensível, porém pode apresentar resultado falso positivo, por reação cruzada com outras doenças como a leishmaniose visceral, doença de Chagas, paracoccidiodomicose, entre outras. Sendo assim, a imunofluorescência não deve ser utilizada como critério isolado para diagnóstico de LTA (BRASIL, 2017).

2.5 TRATAMENTO CONVENCIONAL

O tratamento para Leishmaniose foi implantado pelo médico Gaspar Vianna, em 1912, com a administração do tártaro emético (antimônio trivalente). Por apresentar uma alta toxicidade, o seu uso clinicamente foi suspenso, até que o medicamento passasse por várias modificações, apresentando menores efeitos tóxicos ao paciente. No ano de 1947, os complexos de antimônio pentavalentes (Sb^{+5}), com efeitos menos tóxicos, foram introduzidos na farmacoterapia das leishmanioses (VIANNA, 1912; REZENDE, 2009).

O Antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) [Figura 06], conformação do antimoniato pentavalente, até hoje ainda é utilizado para a leishmaniose como droga de primeira escolha preconizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Este

composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônio e da N-metil-glucamina (obtida previamente a partir da aminação redutora da glicose em presença de metilamina), sendo assim, hidrossolúvel e pouco solúvel em compostos orgânicos, e não bem definida a sua fórmula estrutural (RATH et al., 2003).

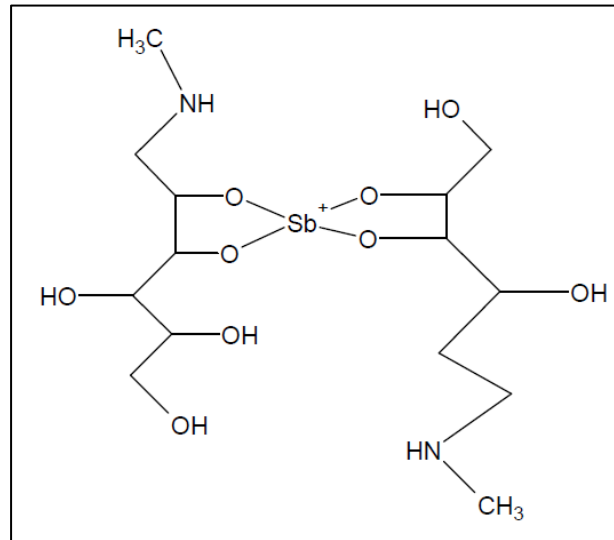


Figura 06. Estrutura química do Antimoniato de meglumina. Fonte: JENSEN, 2016. Chemdraw[®].

O mecanismo de ação dessa droga, ainda é pouco elucidado, no entanto, o mais indicado é na interferência na bioenergética da forma amastigota de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP (Adenosina trifosfato) e GTP (Guanina trifosfato) [BERMAN, 1998]. Acredita-se que a inibição da glicólise e do ciclo do ácido cítrico possa explicar parcialmente a incapacidade de fosforilar a ADP (Adenosina difosfato) [BERMAN, 1985].

Sugere-se que após a administração do antim nio pentavalente possa desempenhar um mecanismo de pr -droga, sendo convertido a antim nio trivalente (Sb^{III}), sendo possível explicar a partir da reação de óxido-redução, onde a Glutathiona reduzida induz a redução de Sb^{+5} , sendo assim, apresentando atividade antileishmania (FRÉZARD et al., 2001).

Embora o antimoniato pentavalente já seja utilizado há mais de meio século e apresente menor toxicidade que os antimoniais trivalentes, pode apresentar inúmeros efeitos colaterais, como toxicidades cardíaca, pancreática, renal, artralguas,

mialgias e dores abdominais (SILVA, 2012). Os antimônios são contraindicados no uso concomitante de beta-bloqueadores e antiarrítmicos. A hepatotoxicidade também é frequente e pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados (FRANKE et al., 1990; MARZOCHI, 2010).

A Anfotericina B (Abelcet[®]) [Figura 07] é um antibiótico polieno que interage com ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a sua permeabilidade e o balanço iônico, causando a morte celular (ROBETS, 2003). Considerada droga de primeira escolha para gestantes, sua atuação se dá nas formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* (MARZOCHI, 2010). No entanto, esta droga é contra indicada para pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas. As reações adversas mais frequentes são febre, náuseas, vômitos, hipopotassemia e flebite no local da infusão (BRASIL, 2017).

A Anfotericina pode ser encontrada também na forma lipossomal (AmBisome[®]), onde é composta de fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, o fármaco atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de Anfotericina B. Esta droga é registrada para uso no tratamento da leishmaniose visceral, mas também pode se fazer uso para leishmaniose tegumentar quando as outras indicações terapêuticas não obtiverem sucesso ou forem contraindicadas (BRASIL, 2017).

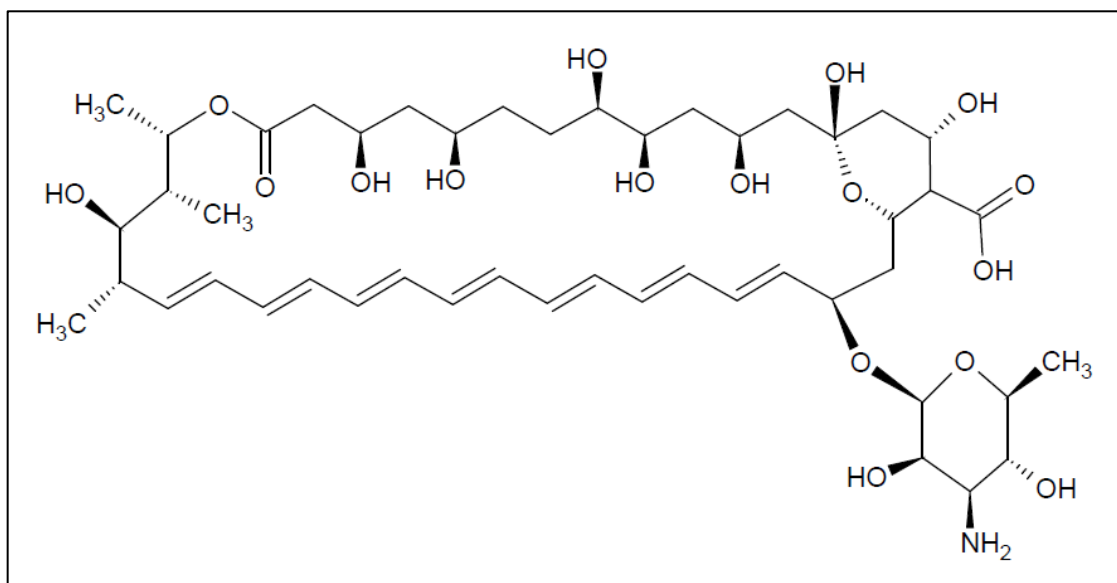


Figura 07. Estrutura química da Anfotericina B. Fonte: JENSEN, 2016. Chemdraw[®].

O Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) [Figura 08] faz parte do grupo das amidinas, composto orgânico da guanidina, usado pela via intramuscular, de eliminação lenta, deposita-se principalmente no fígado e nos rins, também é considerada uma droga de segunda escolha no Brasil (SILVA, 2012; BRASIL, 2013). Segundo o trabalho de Neves (2011), a Pentamidina apresentou eficácia similar ao Antimoniato pentavalente para o tratamento de Leishmaniose Tegumentar, para espécie *L. guyanensis*, tem vantagem de ser utilizada por tempo mais curto e apresentar menos efeitos adversos.

Existem diferentes indicativos para o mecanismo de ação da Pentamidina, dentre eles, a interferência no transporte de aminoácidos, interferência na captação ou função das poliaminas, inibição da síntese de DNA e RNA, proteínas e fosfolipídeos, interferindo assim na respiração aeróbica e anaeróbica dos tripanossomas (WARING, 1965; GALE; FOLKES, 1967; ALCHALABI; GUTTERRID, 1977; MESHNICK; CERAMI, 1984). Os eventos adversos mais comuns são dor no local da aplicação, vômitos, mialgia, hipotensão, síncope e hipoglicemia (BRASIL, 2017).

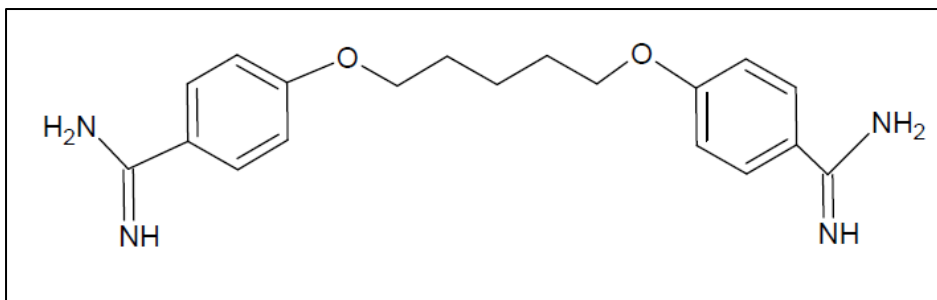


Figura 08. Estrutura química da Isetionato de pentamidina. Fonte: JENSEN, 2016. Chemdraw[®].

Embora os medicamentos preconizados pelo Ministério da saúde apresentem eficácia moderada para leishmaniose tegumentar, eles apresentam um custo alto para tratamento e de difícil acesso para os enfermos (Tabela 03) [NAGLE et al., 2014].

Tabela 03 – Relação da eficácia e custo dos medicamentos padrões para a Leishmaniose Tegumentar.

Droga Padrão	Eficácia	Custo
Anfotericina B	>95%	~US\$ 100
Anfotericina Lipossomal	~100%	US\$ 280
Pentamidina	70 – 80%	~US\$ 100
Antimoniato de Meglumina	35 – 95%	US\$ 50 – 70
Pentoxifilina	*	US\$ 15 - 63

* Estudo sendo avaliado em associação com drogas padrões. Fonte: Modificado NAGLE et al., 2014; Brasil, 2017.

A pentoxifilina (Figura 09) vem a ser um fármaco da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas. É apresentado como comprimido revestido, de liberação prolongada, contendo 400 mg de pentoxifilina. Algumas pesquisas têm demonstrado sucesso no emprego da pentoxifilina como coadjuvante (imunomodulador) no tratamento da leishmaniose tegumentar, com desfecho de cura em menor tempo quando comparado ao tratamento convencional. O seu papel é atuar como um adjuvante, não tem indicação como medicamento isolado, mas sim em associação ao antimoniato de meglumina. É contraindicado para menores de 12 anos, grávidas, lactentes, distúrbios hemorrágicos, entre outros. Apesar de ainda terem sido feitos poucos tratamentos associados, já possui uma PORTARIA (Nº 67, DE 19 DE NOVEMBRO DE 2015), referente à decisão quanto a ampliação do uso da pentoxifilina 400 mg em associação ao antimônio para o tratamento da leishmaniose tegumentar mucosa no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2015; BRASIL, 2017).

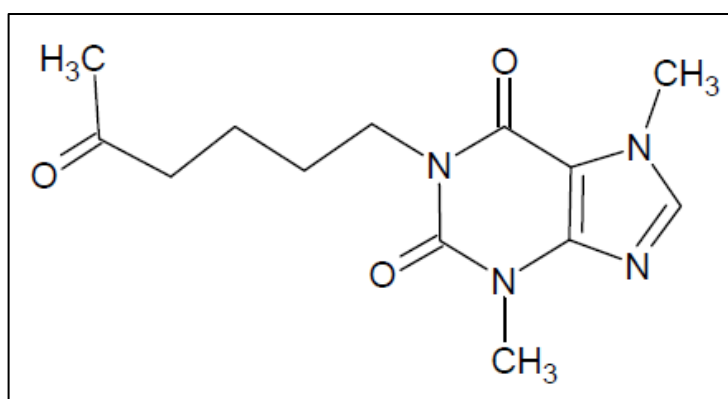


Figura 09. Estrutura química da pentoxifilina. Fonte: JENSEN, 2017. Chemdraw®.

2.6 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO ANTILEISHMANIA

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos é tão antigo quanto à existência da espécie humana, e até nos dias atuais é um recurso alternativo para muitas comunidades e grupos étnicos. Nas regiões mais pobres do país e até em grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em mercados e cultivadas em quintais residenciais para consumo (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Muitas sociedades tradicionais apresentam uma diversificada farmacopéia natural, que é considerada dinâmica de informações empíricas, vivenciadas pelas mesmas. Esses ambientes estão sendo alvo de estudos por pesquisadores, que possuem a finalidade de registro de novas espécies e comprovações de suas atividades medicinais (AMOROZO, 2002). Uma vez isolando seus metabólitos secundários que apresentam atividade farmacológica, pode-se progredir para um medicamento, pois se estima que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, a maioria destas de plantas (CALIXTO, 2001; WHO, 2001).

Os produtos naturais e derivados de plantas medicinais têm sido de grande interesse na busca de novos medicamentos com atividade antileishmania. Este interesse pode ser atribuído à identificação potencial das estruturas químicas, e às propriedades muitas vezes inerentes às moléculas já isoladas. Nas últimas décadas, 69% de todos os novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas foram derivados ou baseados por produtos naturais (NAGLE et al., 2014).

Inúmeros compostos químicos, isolados de extratos vegetais, tem demonstrado atividade antileishmania sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* em ensaios biológicos *in vitro*. Já foram descritos atividade antileishmania dos grupos químicos, como, terpenóides (OKETCH-RABAH et al., 1997; CAMACHO et al., 2001; KENNEDY et al., 2011), aminoglicosteróides e aminosteróides (KAM et al., 1998), naftoquinonas (KAYSER et al., 2000), chalconas (CHRISTENSEN et al., 1994; BOECK et al., 2006), glicosídeos iridóides (MITTAL et al., 1998), flavonóides (ARAUJO; ALEGRIO; LEON, 1998), neolignanas (BARATA et al., 2000) e de alcalóides (KAM et al., 1999; DOLORENZI et al., 2002; FERREIRA et al., 2002).

Um estudo bastante promissor para terapia da leishmaniose tegumentar é o com Apigenina (5,7,4'-trihidroxiflavona) [Figura 10], um flavonóide encontrado em

frutas e vegetais, o qual desempenhou excelente resultado com efeito leishmanicida contra as formas intracelulares de *L. amazonensis* em macrófagos e eficaz no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* através da administração oral (FONSECA-SILVA et al., 2016).

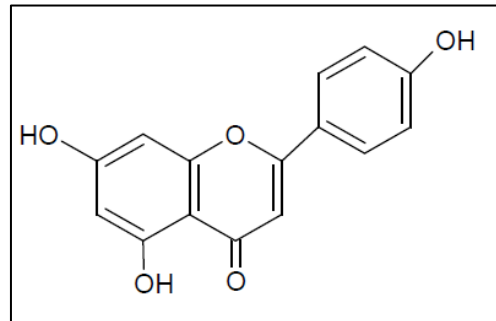


Figura 10. Estrutura química da Apigenina. Fonte: JENSEN, 2017. Chemdraw®.

A busca por novas substâncias para fins terapêuticos deve ser incentivada constantemente, pois deve ser levada em consideração a biodiversidade da flora na floresta Amazônica, considerada a maior do mundo, com grandes oportunidades para explorar seus recursos para fins terapêuticos, principalmente para muitas doenças que carecem de medicamentos mais eficazes, tais como as doenças negligenciadas, exemplo da leishmaniose tegumentar (OLIVEIRA et al., 2008).

2.7 *Libidibia ferrea* COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO

A *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea* basônimo de (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex. Tul.) é conhecida popularmente como jucá, pau ferro, ibirá-obi, imirá-itá (DI STASI, 1996; SOUZA, 2007). Essa espécie vegetal apresenta a seguinte classificação taxonômica (CHASE et al, 2003; LIMA et al, 2010):

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe: Magnoliopsida (Dicotilidoneae)

Subclasse: Rosidae

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Sub-família: Caesalpinioideae (Caesalpinioideae, leguminose)

Espécie: *Libidibia ferrea* (Mart ex. Tul. L.P. Queiroz)

Essa espécie vegetal pertence à família botânica Fabaceae, de grande importância pelo seu número de espécies, aproximadamente 19.000 espécies em mais de 650 gêneros (PALMIL et al., 1981; SOUZA; JUDD et al, 1999; LORENZI, 2012). Somente no Brasil, existe o registro de pelo menos 200 gêneros e 2700 espécies, correspondendo a maior família em número de espécies no país (SOUZA; LORENZI, 2012).

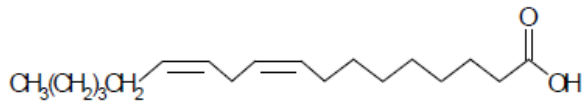
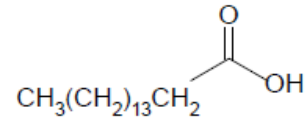
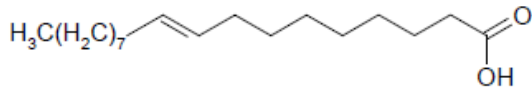
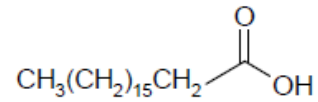
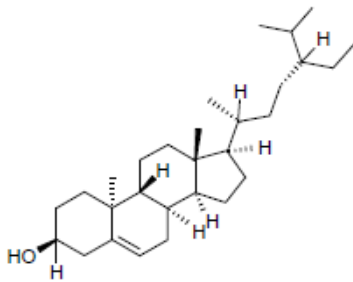
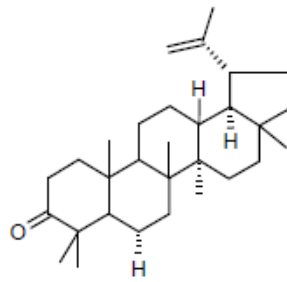
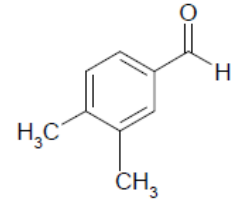
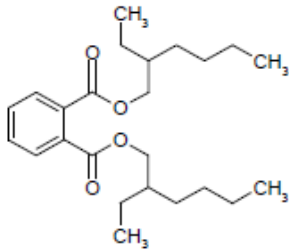
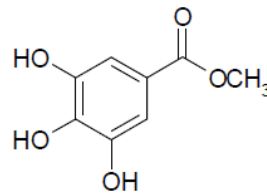
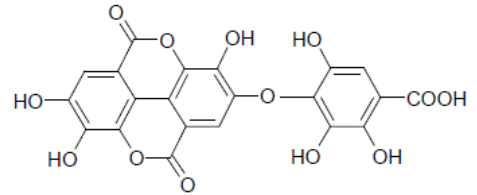
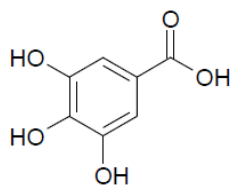
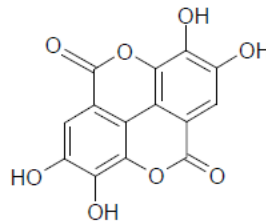
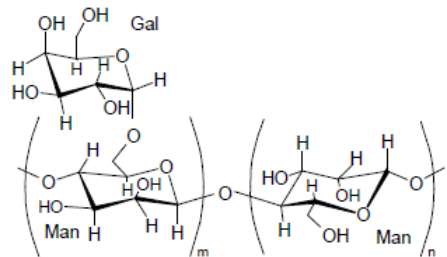
A *L. ferrea* é uma espécie nativa do Brasil, largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste. Quanto à sua estrutura botânica, possui flores amarelas, pequenas, em cachos, folhas compostas, folioladas e frutos legumes indeiscentes de cor marrom escuro, tipo legume, com sementes escuras. Possui classificação arbórea, com altura de 10 – 15 metros, e tronco curto de 40 – 60 cm diâmetro (Figura 11) [LORENZI, 2002].



Figura 11. Espécie vegetal *Libidibia ferrea*. Fonte: COMANDOLLI-WYREPKOWSKI (2011).

Essa planta apresenta inúmeros fins terapêuticos, por exemplo, as suas partes, como, folhas, cascas, semente, raízes e pedaços de madeira podem ser utilizadas no tratamento de diversas infecções (DI STASI, 1996). Cavalheiro et al. (2009) demonstraram que o extrato aquoso das sementes apresentou atividades celulásica, anticoagulante e larvicida contra *Aedes aegypti*. Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcolólico da casca e das folhas demonstraram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos (GONZALES; BARROS; BACCHI, 2004).

Os frutos são antidiarreicos, anticatarrais, cicatrizantes e têm sido usados para o tratamento de diabetes e prevenção do câncer (NAKAMURA 2002; MAIA; 2004). O extrato metanólico (80%) dos frutos obtido através da maceração durante 72 h foi testado frente às cepas *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralise*, *Lactobacillus casei*, apresentando uma concentração inibitória mínima 25 a 100 µg/mL (SAMPAIO et al., 2009). O extrato etanólico de frutos apresentou forte atividade antioxidante no teste in vitro e demonstrou uma correlação significativa e linear entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante pelo ensaio de fosfomolidênio, bem como a atividade de eliminação do radical superóxido (SILVA et al. 2011). Devido à abundância de atividades biológicas com o epicarpo (fruto) dessa espécie, tornou-se um enfoque de estudo e consecutivamente foi possível o isolamento de várias substâncias (Quadro 01).

Quadro 01 – Substâncias isoladas do fruto de *Libidibia ferrea*.**Ácido Linoleico****Ácido Palmítico****Ácido Esteídico****Ácido Esteárico****Gama- sitosterol****Lupenona****3,4-dimetilbalsaldeído****di-2-ethylhexylphthalate****Metil Galato****2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) Ácido Elágico****Ácido Gálico****Ácido Elágico****Galactomanano**

Fonte: FERREIRA; SOARES (2015).

2.8 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO: MICROEMULSÃO

O marco inicial da produção de microemulsão descrito na literatura foi na década de 40 por Hoar e Schukman (1943) ao descreverem a produção de uma solução translúcida a partir da titulação de uma emulsão com hexanol. No entanto, somente no fim da década de 50, foi estabelecido o termo microemulsão, que ao longo dos anos, tem recebido redefinições proporcionais aos avanços tecnológicos (SCHULMAN et al., 1959).

Atualmente as microemulsões são definidas como um sistema nanoestruturado termodinamicamente estável, isotrópicas e transparentes ou translúcidas, nas quais a fase oleosa está dispersa num meio aquoso ou fase aquosa no meio oleoso, composta por um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando uma interface óleo/água e apresentando gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm). Comparando-se com nanoemulsão, possui uma escala de gotícula bem menor (Figura 12), e as substâncias ativas podem ser veiculadas quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (LAWRENCE, 1994; OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA et al., 2002; ZHU et al. 2008).

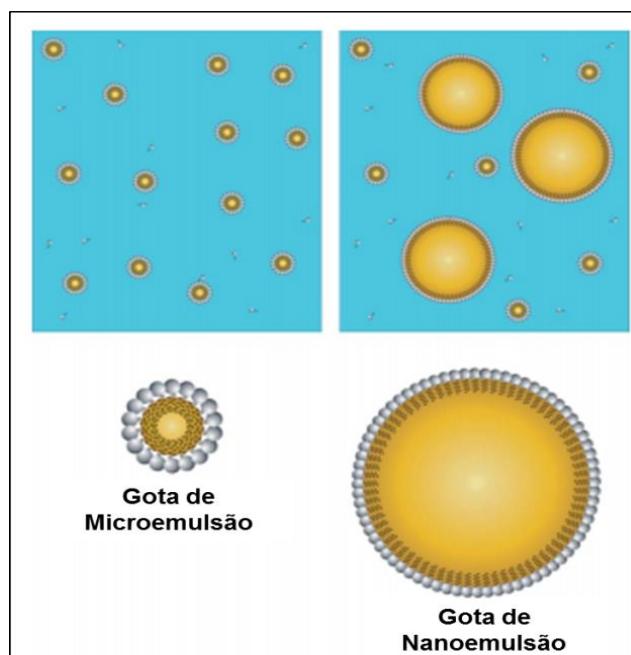




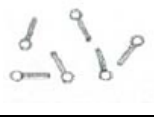


Figura 12. Gotículas de microemulsão e nanoemulsão. Fonte: Modificado MCCLEMENTS (2012).

Os tensoativos permitem um aumento na permeabilidade de membrana celular, o que colabora para a absorção do fármaco e a biodisponibilidade (SINTOV; SHAPIRO, 2004; FORMARIZ et al., 2007). Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e o co-tensoativo (LAWRENCE, 1996; OLIVEIRA, 1997).

Os nanoestruturados de classificação microemulsionados podem apresentar aspectos visualmente diferentes dos outros, uma vez que os demais apresentam emulsões líquidas opacas, representadas por sistemas de elevada viscosidade, ou com separação de fases. O sistema microemulsionado líquido apresenta características translúcidas ou opticamente transparentes e tamanho de gotículas minoritárias (Quadro 2) [FORMARIZ, 2004].

Quadro 2 – Escala de Granulometria das Emulsões.

Denominação	Tamanho	Aparência	Aspecto
Macroemulsão	2-20 μm 2.000-20.000 nm		Branca leitosa
Nanoemulsão	0,1-0,3 μm 100-300 nm		Branca azulada
Microemulsão	<0,1 μm 100 nm		Translúcida
Soluções micelares	0,01 μm 10 nm		Transparentes
Soluções moleculares	0,001 μm 1 nm		Transparentes

Fonte: Modificado ANSEL; POPOVICH, ALLEN (1999).

Estudos com esses nanoestruturados têm sido relevantes na área farmacêutica, possibilitando oportunidades alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com redução de reações adversas (OLIVEIRA et al., 2004).

Os sistemas microemulsionados vêm sendo objeto de várias patentes em todo o mundo, a China e os Estados Unidos da América são os maiores detentores de patentes envolvendo microemulsões para uso transdérmico, onde possuem a finalidade de incorporação de diferentes classes terapêuticas, como, antiinflamatório não estereoidal (AINE), anestésicos, imunossupressor, antiparkinsoniano, derivados de plantas medicinais, anti-hormonal, antimicrobiano e dentre outros (FIGUEIREDO et al., 2013).

Em estudo com a piperina, substância derivada de *Piper nigrum* (pimenta-preta) foi obtida uma formulação em microemulsão que desempenhou resultado bastante satisfatório no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* (uma das espécies causadoras de leishmaniose visceral no Velho Mundo). Os animais apresentaram uma redução da carga parasitária no fígado e baço em 78 e 75%, respectivamente (VEERAREDDY; VOBALABOINA; NAHID, 2004). Esse sistema nanoestruturado vem despertando grande interesse como tratamento alternativo para várias patologias, podendo ser testado para a leishmaniose tegumentar, já que possui a capacidade de carrear a droga ou a substância ativa de forma eficaz.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antileishmania da fração e subfrações de diclorometano obtidas do fruto de *Libidibia ferrea* (Martius exTul.) LP Queiroz (Fabales: Fabaceae-“Caesalpinoideae”).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Etapa 1: Subfracionamento da fração DCM de *L. ferrea* e Ensaios Biológicos *in vitro*

- Subfracionar a fração diclorometano obtida do extrato metanólico dos frutos de *Libidibia ferrea*;
- Avaliar o efeito das subfrações obtidas da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* quanto à atividade *in vitro* contra as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade das subfrações mais ativas da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* frente às células de cultivo primário (macrófagos peritoneais murinos) para a determinação do índice de seletividade;
- Determinar a atividade das subfrações mais ativas da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* em macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis*;

Etapa 2: Desenvolvimento da microemulsão e Teste biológico *in vivo*

- Desenvolver e caracterizar a microemulsão com a fração DCM de *Libidibia ferrea*;

- Estudar o efeito do tratamento tópico com as formulações contendo fração DCM em animais de experimentação (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (L.) amazonensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- a) Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, CSAS, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco;
- b) Área de Experimentação Animal, Biotério Central, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pelo MSc. Leonardo Brandão Matos;
- c) Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, com a colaboração da Dra. Maria da Paz Lima;
- d) Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, com a colaboração da Profa. Dra. Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi;

A seguir, é descrita a trajetória metodológica conforme o fluxograma na figura 13.

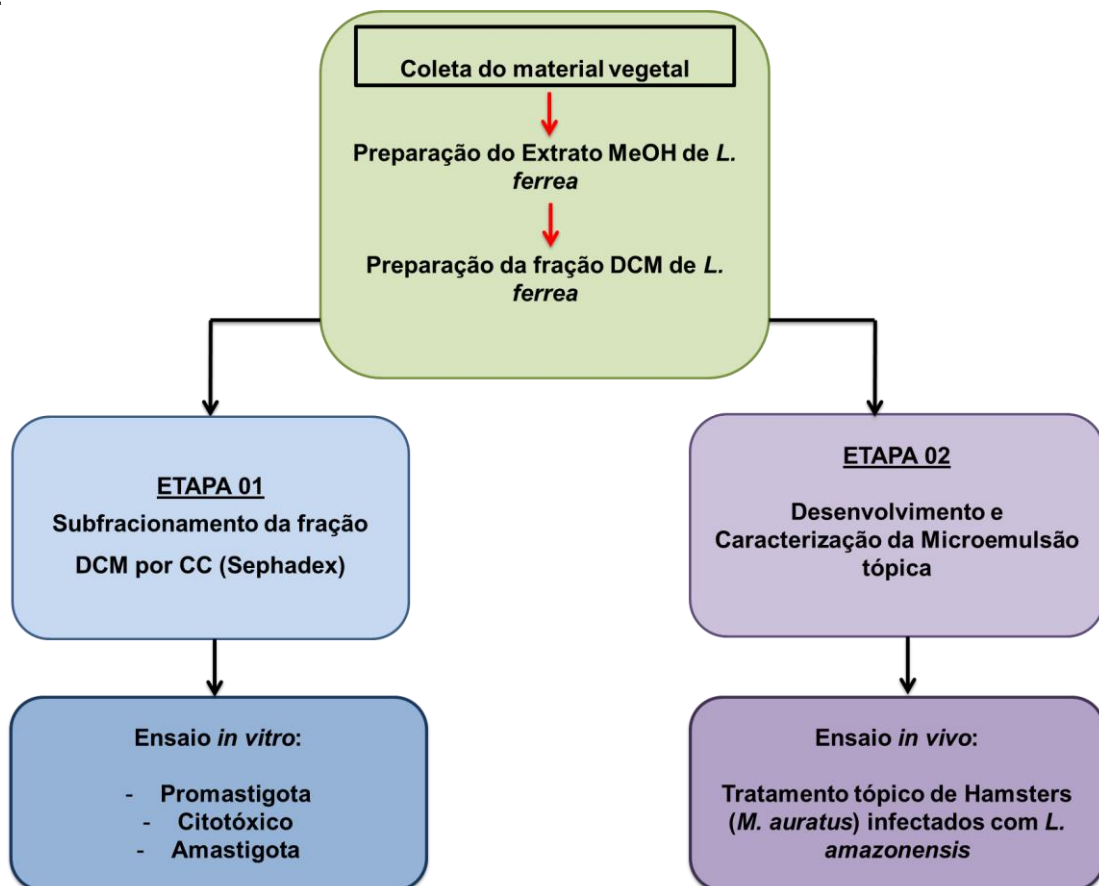


Figura 13. Fluxograma da trajetória metodológica do estudo.

Etapa 1: Subfracionamento da fração DCM de *L. ferrea* e Ensaios Biológicos *in vitro*

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Foram realizadas coletas para a obtenção do material vegetal (epicarpo) de *Libidibia ferrea* de uma propriedade particular no bairro Parque Dez de Novembro, Manaus, Amazonas. Coordenadas: 3°4'34"S 60°0'11"W. Para a coleta, foi obtida uma permissão do proprietário do local para a obtenção deste material. Foram coletadas amostras de frutos. A coleta foi realizada no mês de julho de 2011, e o indivíduo consistia em um exemplar adulto em fase de frutificação.

Exsicatas foram preparadas e enviadas ao Departamento de Botânica do Instituto de Pesquisas da Amazônia. Do material foi identificada à espécie *Libidibia ferrea* (Mart. ExTul.) LP Queiroz – Fabaceae-Caesalpinioideae – de acordo com Lewis (2005) e APG III. A exsicata foi depositada no herbário do INPA sob o registro 246150.

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO MeOH DE *Libidibia ferrea*

Todo o material vegetal coletado, separado, foi seco em estufa de circulação forçada, com temperatura inferior à 45°C. Após a secagem, as partes foram moídas e pulverizadas em moinho de facas.

Após a pulverização, os materiais foram extraídos com Hexano (VETEC) e metanol (VETEC). O esquema geral para a preparação de todos os extratos está ilustrado na figura 14. Foram realizadas três extrações ou mais, de acordo com a necessidade, com cada solvente utilizando banho em ultrassom por 20 minutos em cada extração. O volume de cada solvente utilizado variou conforme a quantidade de material vegetal, mantendo a proporção de 250 mL de solvente para cada 100 g de material pulverizado, em cada extração. Após o banho em ultrassom, o material foi filtrado, e o resíduo vegetal após as três extrações com o solvente foi seco a temperatura ambiente (TA). Esse mesmo material vegetal foi extraído com os outros solventes, em ordem crescente de polaridade. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (YAMATO).

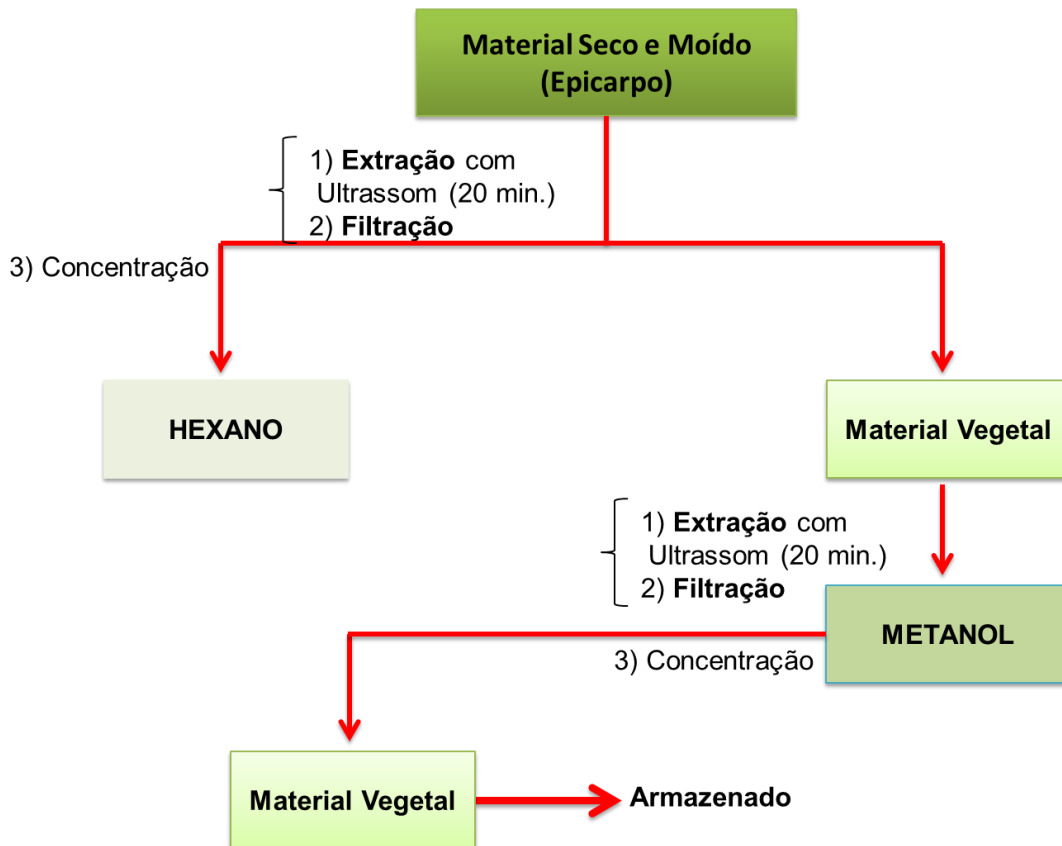


Figura 14. Fluxograma geral da preparação dos extratos obtidos de epicarpo de *Libidibia ferrea*.

4.3 PARTIÇÕES DO EXTRATO

O extrato foi fracionado por partição líquido-líquido para realizar as partições, 20 g do extrato metanólico foi solubilizado em 200 mL de H₂O:MeOH (9:1) e extraído três vezes (200 mL de solvente, cada vez) com cada um dos solventes utilizados na partição. As partições foram realizadas com Hexano e DCM (Figura 15). Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para a avaliação da atividade leishmanicida. As frações foram concentradas em rotaevaporador (YAMATO).

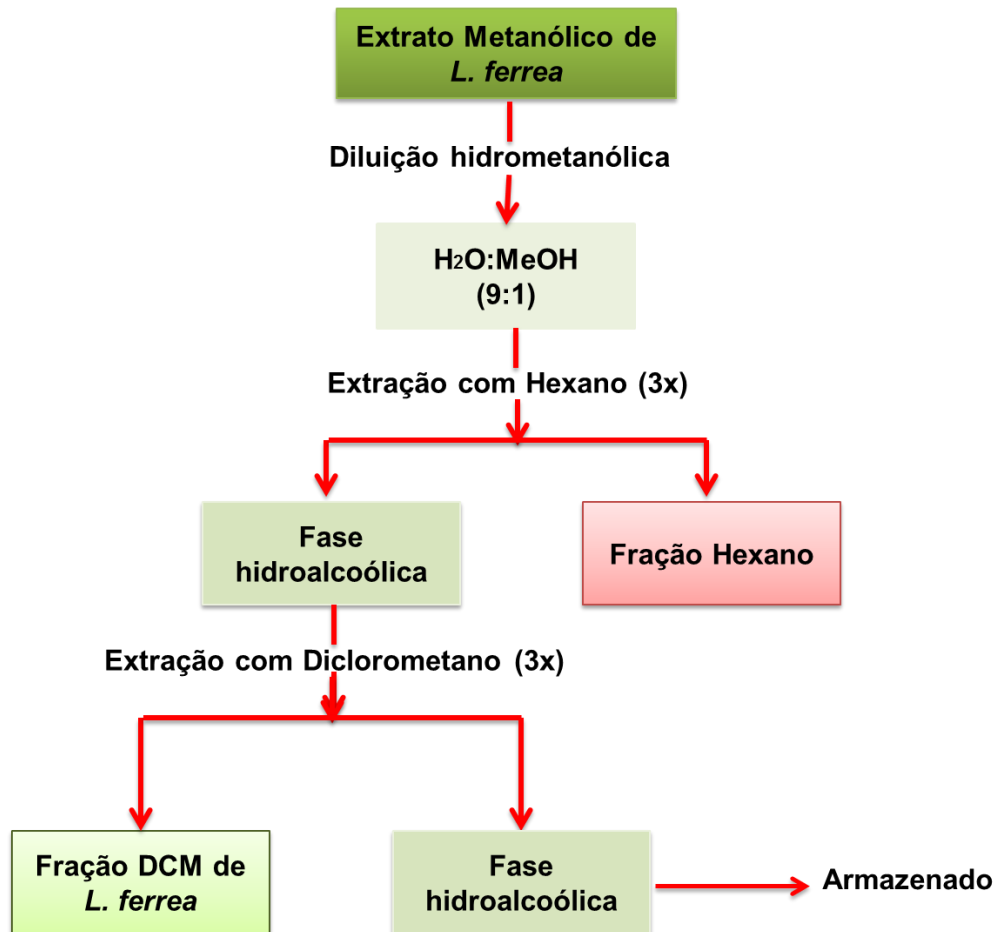


Figura 15. Fluxograma da preparação das partições do extrato obtido de epicarpo de *Libidibia ferrea*.

4.4 SUBFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO DCM DE *L. ferrea*

4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise em CCD, foram preparadas alíquotas das amostras, diluindo-as em solventes orgânicos, aplicando-as em seguida com o auxílio de tubo capilar de vidro a 0,5 cm da base da cromatoplaça de alumínio com sílica gel 60 (MERCK), com a distância de 1 cm entre um *spot* e outro. Após eluição, realizada com 1,5 mL de solvente (gradiente) em cuba de vidro (dimensão: 8x5x3 cm), realizou-se comparações como demonstrada na figura 16. Os reveladores empregados foram radiação ultravioleta (254 e 365 nm) e vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico.

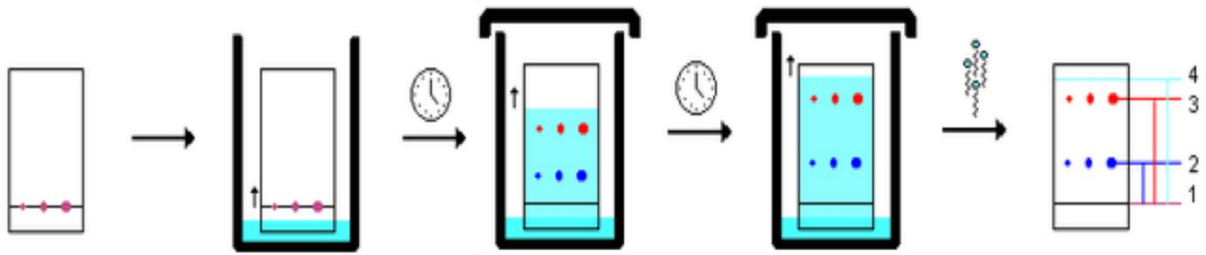


Figura 16. Mecanismo da cromatografia em camada delgada. Fonte: modificado SILVA (2014).

4.4.2 Cromatografia em Coluna (CC)

O fracionamento da fração DCM de *L. ferrea* foi realizada em coluna de vidro com dimensões $\varnothing = 2,5$ cm e alt = 47 cm, utilizando o suporte cromatográfico Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) por mecanismo de exclusão.

4.5 ATIVIDADES *IN VITRO* COM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

4.5.1 Teste de Esterilidade do meio de cultivo

Após a filtragem do meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640 – Sigma Chemical Co, USA), foi adicionado 950 μ L em um microtubo estéril, em seguida incubado na estufa a 37°C durante 48h. Após esse tempo de incubação foi acrescentado 50 μ L de Alamar Blue® (Resazurina a 0,4%) e reincubado por mais 72h. Após esse período, observou se houve mudança de coloração, a permanência da cor azul é considerada negativa e caso houvesse a alteração da coloração para rósea, é indício positivo para contaminação (adaptado FRANZBLAU et al., 1998).

4.5.2 Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária

Foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), criopreservadas no criobanco do Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas/COSAS/INPA. Para o cultivo das formas promastigotas foi utilizado o meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino inativado (SFBi) e 50 μ g/mL de antibiótico (Gentamicina), incubados a 24°C de

acordo com JAFFE et al. (1984), e posteriormente utilizada para os bioensaios e criopreservação. As amostras foram criopreservadas em solução de Criopreservação (10% de glicerina / Merck em meio *Schneider Drosophila Medium* (Sigma) contendo 30% SFBi) e armazenadas no Freezer -80 °C (Sanyo), após amplificação em garrafas de cultivo de células (em poliestireno, área de crescimento de 25 cm², 50 mL, estéril) e centrifugação a 4.400 rpm (Rotação por minuto) durante 15 minutos, com posterior lavagem do sedimento e ressuspensão deste em solução de criopreservação.

4.5.3 Curva de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Para a determinação das fases de crescimento dos parasitas nas condições estabelecidas de cultivo, foi realizada a curva de crescimento em meio líquido RPMI 1640 completo, suplementado com 10% SFBi e incubados em estufa a 25 °C +/- 1°C. Os parasitas foram cultivados (forma promastigota das espécies estudadas) a partir de uma concentração de 10⁶ células/mL. A contagem foi realizada em intervalos de 24 horas, quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 400x, até a observação de menos de 10% de sobrevivência. O cálculo foi feito utilizando a fórmula: nº de parasitas = média dos quatro quadrantes maiores x inverso da diluição da amostra x 10⁴. Para o estudo foram utilizadas as formas promastigotas de cultivo axênico na fase logarítmica, na qual ocorrem as formas consideradas infectantes. A curva foi construída graficamente utilizando o software GraphPadPrism® 6.0.

4.5.4 Determinação da atividade antileishmania e concentração inibitória 50% (IC₅₀) das subfrações obtidas da fração DCM de *Libidida ferrea*

A atividade antileishmania das substâncias isoladas da fração DCM de *L. ferrea* foram avaliadas pela inibição do crescimento e mortalidade de *L. amazonensis*. Antes de cada experimento foi observada a motilidade flagelar e morfologia geral dos parasitas para posterior comparação.

As subfrações obtidas de *L. ferrea* foram filtradas e diluídas em meio de cultura, para o ensaio foram usadas às concentrações de 125 a 7,8 µg/mL. O

controle negativo foi o DMSO 1% (Dimetilsulfóxido/Merck) e controle positivo foi Isotionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) nas concentrações de 6 a 0,375 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para a realização dos bioensaios, as formas promastigotas na fase logarítmica (log) tardia foram centrifugadas a 4.400 rpm/15 minutos, lavadas em salina estéril, diluídas e contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para obter a concentração parasitária de 2×10^6 células/mL, também em volume final de 100 μL /poço de acordo com Fumarola et al. (2004). Posteriormente esta concentração de promastigotas foi adicionada aos poços contendo as substâncias diluídas, totalizando um volume final de 200 μL /poço. A placa do Bioensaio (na presença de promastigotas, controles e substâncias isoladas) foi incubada em estufa a 25 °C durante 48 horas.

Os bioensaios foram realizados em triplicata e a média do número de células vivas foi utilizada para calcular por regressão linear, a IC_{50} (Concentração inibitória para 50% das células). O valor de IC_{50} foi utilizado para expressar os resultados das atividades das subfrações obtidas de *L. ferrea* avaliadas e selecionado as que se apresentaram mais promissoras para estudos posteriores. Os resultados foram expressos em gráficos utilizando o software GraphPadPrism[®] 6.0.

4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE *IN VITRO* CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

- **Obtenção de Macrófagos peritoneais murinos:** Para a obtenção dos macrófagos, foram utilizados camundongos BALB/C jovens provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, o projeto foi aprovado sob o número 014/2015 da CEUA. Os animais foram eutanasiados, sendo injetados 5 mL de meio RPMI na cavidade peritoneal. Os macrófagos foram coletados com auxílio de uma seringa, centrifugados, ressuspensos e diluídos em meio de cultivo completo para obter 10^5 células/mL conforme Gordon et al. (1974). As células foram adicionadas em placas estéreis contendo lamínulas de vidro em cada poço.

- **Infecção dos macrófagos murinos com *Leishmania*:** Os macrófagos (10^5 células/mL) foram infectados com 10^6 promastigotas/mL por duas horas. Foi utilizada a espécie *L. amazonensis*. Em seguida, os poços foram lavados com RPMI

completo por três vezes, aquecido a 37°C, para a remoção das promastigotas não interiorizadas e células não aderidas (ESLAMI; TANNER, 1994; TEMPONE et al., 2004).

4.6.1 Determinação da atividade citotóxica

Macrófagos foram incubados na presença das subfrações obtidas de *L. ferrea* em diferentes concentrações em estufa a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, os poços foram lavados com solução salina e em seguida adicionado 100 µL de meio Schneider[®] + 20 µL do reagente Alamar Blue[®] e após quatro horas de incubação, foram realizadas as leituras colorimétricas em espectrofotômetro (Bio-Tek[®]), utilizando o comprimento de onda de 590 nm (AHMED et al., 1994), com modificações. O cálculo de IC₅₀ foi realizado por regressão linear.

4.6.2 Determinação da atividade antileishmania e da concentração inibitória 50% (IC₅₀) em amastigotas interiorizados em macrófagos

Os macrófagos infectados foram incubados na presença das subfrações obtidas de *L. ferrea*. As mesmas foram adicionadas aos poços em diferentes concentrações. Após seis horas de incubação em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, os poços foram lavados com solução salina e adicionados a este novo meio de cultura completo e incubados novamente por mais 24 horas nas mesmas condições. Após esse período, as lamínulas de vidro foram removidas, e as células infectadas foram fixadas e coradas por Giemsa para contagem do número de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas por macrófagos (num total de 200 macrófagos). A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico em 1000x de aumento. Os resultados foram expressos em gráficos utilizando o software GraphPadPrism[®] 6.0. O valor de IC₅₀ foi obtido por meio de regressão linear.

Etapa 2: Desenvolvimento da microemulsão e Teste biológico *in vivo*

4.7 PREPARAÇÃO DA MICROEMULSÃO

A microemulsão (ME) foi desenvolvida a base de álcool isopropílico, Tween[®] 20, água destilada, ácido oleico e fração DCM da *L. ferrea* a 2%, pelo método de agitação magnética por formação espontânea, conforme trabalho de Rolim (2016).

4.7.1 Determinação do pH

A determinação do pH da microemulsão foi realizado diretamente nas formulações através da utilização de um potenciômetro calibrado com pH 4,0 – 7,0. Os resultados foram obtidos em triplicata.

4.7.2 Reologia

A determinação do comportamento reológico da microemulsão foi realizada em Viscosímetro Brookfield Digital DV-II + pró. As análises reológicas foram obtidas com variação de velocidade de 0 a 120 rpm (curva ascendente) e de 120 a 0 rpm (curva descendente), com um tempo de 10 segundos de leitura e 20 pontos. O *spindle* utilizado foi do tipo SC4-18. O equipamento forneceu os dados de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento através do *software* Brookfield Rheocalc versão 3.2. Os gráficos de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento foram construídos no Software GraphPad Prisma 6.0.

4.7.3 Índice de refração

Para a determinação do índice de refração foi utilizado um refratômetro tipo Abbé previamente calibrado com água destilada.

4.7.4 Tamanho de gotículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e índice de polidispersão (IPD)

O tamanho de gotícula e índice de polidispersão da microemulsão foi determinado em equipamento ZetaSizer Malvern[®], localizado no Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica/UFAM sob orientação da Dra. Katia Solange Geraldi. As medidas foram realizadas em triplicata sob

temperatura constante de 25°C com feixe de luz de comprimento de onda 659 nm, com ângulo de incidência de 90°C.

4.7.5 Potencial Zeta

As medidas do potencial Zeta (ζ mV) foram realizadas utilizando o equipamento ZetaSizer Malvern®. Este potencial foi alcançado submetendo-se a formulação a uma voltagem fixa e utilizando os valores fornecidos pelo aparelho para calcular o ζ mV.

4.8 ENSAIO BIOLÓGICO *IN VIVO*

4.8.1 Procedência dos animais

O modelo biológico experimental para o estudo foi de 36 hamsters (*Mesocricetus auratus*), adultos (acima de 90 dias), machos e pesando equivalente a 150 g cada animal. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, e o tratamento dos animais infectados ocorreu nas dependências do próprio Biotério/INPA. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno em condições adequadas a sua manutenção, com dieta e água *ad libitum* e livres de patógenos. O projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais – CEUA/ INPA, possui o número de protocolo 009/2015.

4.8.2 Inoculação

Foram inoculados 0,1 mL de solução com 10^6 cel/mL do parasito na forma promastigota de *L. amazonensis* recém-isoladas em cultivo de procedência do Criobanco do Laboratório de Leishmaniose, aplicados na base de orelha para experimentação. Após a inoculação, os animais foram separados e agrupados em gaiolas identificadas e mantidos no biotério em temperatura adequada.

4.8.3 Delineamento experimental

- Experimento:

Foram utilizados 36 camundongos 20 dias após inoculação com *L. amazonensis* no focinho, tratados durante 30 dias consecutivos e separados nos seguintes grupos (Figura 17):

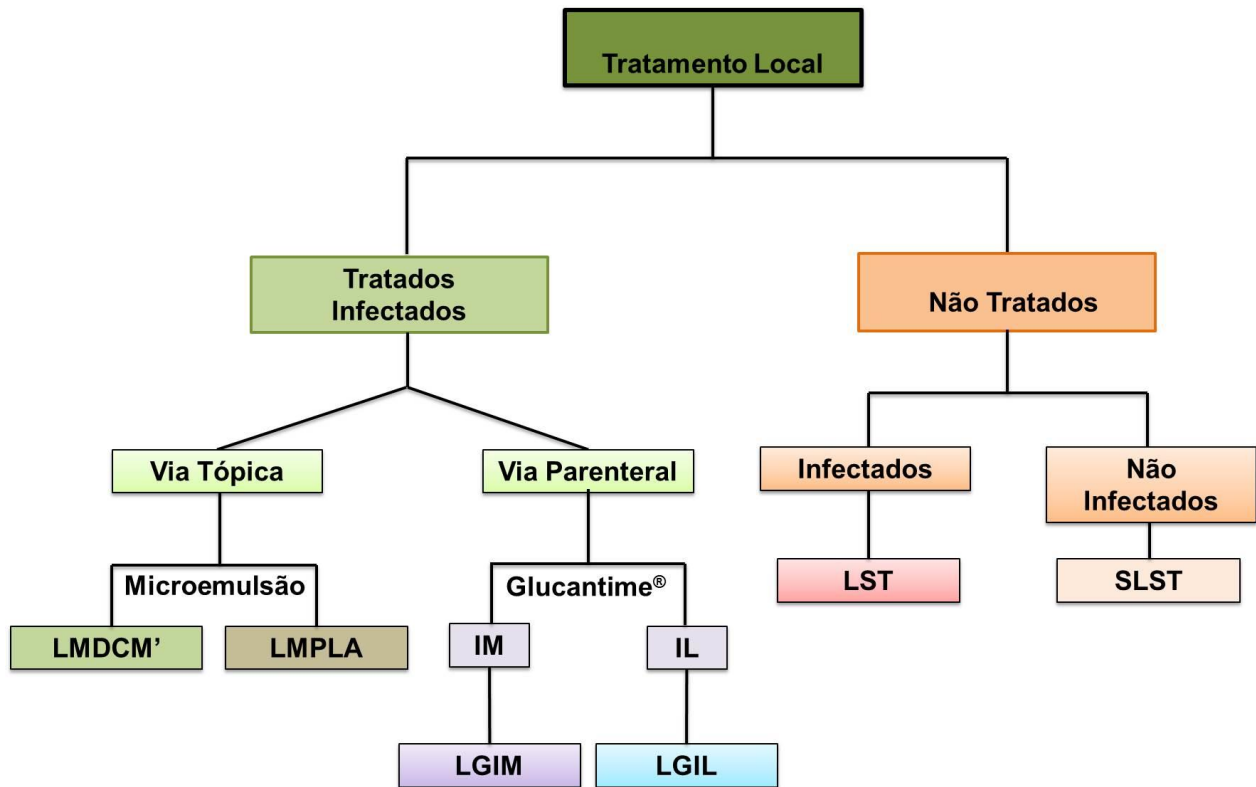


Figura 17. Fluxograma do Delineamento experimental utilizado no estudo experimental *in vivo*. **LMFDCM** – Tratamento tópico com a microemulsão incorporada com a fração DCM de *Libidibia ferrea*. **LMPLA** – Tratamento tópico com a microemulsão placebo. **LGIM** – Tratamento intramuscular com o Glucantime®. **LGIL** – Tratamento intralesional com o Glucantime®. **LST** – Controle negativo, ausência de tratamento. **SLST** – animais sem infecção.

A amostra experimental utilizada foi de seis animais, para cada um dos grupos utilizados para esse estudo. Foram utilizados animais infectados e sadios. O tratamento tópico foram com microemulsões incorporada com a fração DCM e placebo. O controle positivo foi o Glucantime® administrado em duas vias parenterais (Intramuscular e Intralesional) e o controle negativo não recebeu tratamento (Tabela 04).

Tabela 04 – Tipos de tratamento utilizados nesse ensaio biológico *in vivo*.

Grupo	Procedimento		
	Tipo	Dose	Via
LMDCM	Tratamento Fração DCM de <i>L. ferrea</i> em Microemulsão.	7 mg/kg/dia	Tópica
LMPLA	Tratamento Microemulsão placebo.	-	Tópica
LGIM	Tratamento com Glucantime [®] .	20 mg Sb ⁺⁵ /kg/dia	Intramuscular
LGIL	Tratamento com Glucantime [®] .	20 mg Sb ⁺⁵ /kg/dia	Intralesional
LST	*	-	-
SLST	**	-	-

* Animais infectados e sem tratamento (Grupo controle). ** Animais não infectados e sem tratamento.

4.8.4 Aspecto clínico

O volume total das lesões foi aferido diariamente com um paquímetro digital (Zaas[®] Precision) e registrados para análise de progressão da lesão. O aspecto morfológico das lesões foram analisados e feito o acompanhamento da evolução diária, sendo registrado e fotodocumentado para análise da evolução morfológica macroscópica. Os animais foram pesados em balança semi-analítica (Toledo[®]) para acompanhamento da massa corporal ao longo dos 30 dias de experimentação.

4.8.5 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com Vetnil® (Cloridato de Cetamina 10%) e Syntec® (Cloridrato xilazina 2%), de acordo com o indicado pelo Comitê de Ética de Pesquisas com Uso de Animal do INPA.

4.8.6 Diagnóstico parasitológico

Método direto: os esfregaços por aposição em lâmina (*imprints*) foram realizados logo após a coleta de pequenos fragmentos da lesão. Utilizando pinça estéril, esses fragmentos de tecidos foram pressionados em lâminas previamente limpas e desengorduradas, fixado com solução álcool metílico e coradas empregando o Kit Panótico. A densidade de macrófagos parasitados e a carga parasitária (amastigotas) foram estimadas por registro de imagens de 25 campos observados em microscopia óptica sob óleo de imersão (1000 X) e analisadas quantitativamente pelo software ImageJ® (NIH, Maryland, EUA). Foram considerados campos para contagem os que possuíam ao menos cinco macrófagos. As análises foram realizadas por profissionais não envolvidos na experimentação, seguindo modelo de estudo duplo-cego. Os dados foram tabelados e foi calculada a média de amastigotas por macrófago e a média de macrófagos infectados para cada animal da experimentação. A relação percentual de parasitas foi obtida pelo índice

$$\% \text{parasitas} = \bar{X} \text{ amastigotas} \frac{100}{X_{\text{máx}}}$$

Cultivo: após a eutanásia dos animais, as lesões foram seccionadas e desinfetadas com solução salina e Gentamicina®. Em seguida, os fragmentos do focinho foram semeados em meio de cultivo bifásico NNN (NOVY; MCNEAL, 1904; NICOLLE, 1908). Os tubos de cultura com meio NNN foram incubados em estufa a 25 °C durante oito dias. As culturas foram determinadas como negativas quando não havia a presença de parasitas após o período de incubação. Em caso positivo, a concentração de parasitas presentes foi semi-quantificada de acordo com o número logarítmico de células presentes, sendo considerados os valores 1- de 1 até 10 parasitas; 2 - entre 10 a 100 parasitas e 3 – maior que 100 parasitas por campo.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A multiplicação das células parasitárias foi determinada pelas curvas sigmoidais, utilizando-se o software GraphPadPrism 6.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares. Para a análise estatística foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey. Para os ensaios *in vivo* foi empregado *two-way* ANOVA e teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa 1: Subfracionamento da fração DCM de *Libidibia ferrea* e Testes Biológicos *in vitro*

As opções terapêuticas disponíveis atualmente para as doenças negligenciadas são muito limitadas e insuficientes. O potencial dos produtos naturais frente a essas enfermidades ainda é um recurso de grande auxílio à medicina. A avaliação dessas substâncias de origem natural é direcionada por ensaios biológicos, possibilitando o aparecimento de candidatos a fitoterápicos ou fitofármacos (DIAS et al., 2013; IOSET, 2008). Desse modo, estudos prévios com a espécie vegetal *Libidibia ferrea* frente às espécies do gênero *Leishmania* vem estimulando a continuidade da investigação da sua atividade antileishmania, visando o desenvolvimento de fitoterápico seguro (CORTEZ, 2004; FALCÃO, 2010; COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, 2015).

Nesse estudo foi avaliada a atividade antileishmania da fração diclorometano (DCM), e seu potencial de uso como alvo terapêutico para a leishmaniose tegumentar. Após a partição líquido-líquido, foi possível obter um rendimento de 0,43% (510mg) da fração DCM, a partir de 120 g do extrato MeOH do epicarpo de *L. ferrea*. Em seguida, analisada por Cromatografia em camada delgada, empregando-se diferentes sistemas de eluição. Esta análise teve por objetivo preliminar averiguar a ocorrência das classes de substâncias presentes.

A fração DCM foi submetida a um fracionamento em Coluna Sephadex LH-20, eluída com sistema isocrático com MeOH, sendo obtido 12 subfrações com rendimento de 0,3 a 34,2 %. A subfração 3 (Sf3) foi a que apresentou maior rendimento (34,2%) [Tabela 1].

Tabela 05 – Rendimento das subfrações de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) LP Queiroz.

Subfração	Massa (mg)	Rendimento (%)
Sf1	22,5	4,4
Sf2	9,5	1,9
Sf3	174,3	34,2
Sf4	44,8	8,8
Sf5	17,7	3,5

Sf6	13,4	2,6
Sf7	28,9	5,7
Sf8	19,4	3,8
Sf9	18,4	3,6
Sf10	2,7	0,5
Sf11	1,6	0,3
Sf12	48	9,4

As subfrações foram submetidas ao ensaio biológico *in vitro*. A contagem dos parasitas foi realizada em intervalos de 12 horas até a observação de menos de 10% de sobrevivência. A curva de crescimento estabelecida para os parasitas apresentou perfil típico conforme amplamente descrito para *L. amazonensis*, quando o padrão da curva de crescimento mostra claramente as seguintes fases da proliferação celular: fase exponencial de crescimento (fase logarítmica) entre 1 e 4 dias (24 - 96h), fase estacionária, compreendida entre 4 e 5 dias (96 – 120h) e de declínio, a partir do sétimo dia (Figura 18). Esse resultado é condizente com a curva de crescimento parasitário da espécie supracitada no trabalho de Rodriguez et al. (2015). Com base nessa informação, foi estabelecido em período de 48 horas para ensaios de rastreio de substâncias ativas contra esta cepa de *L. amazonensis*.

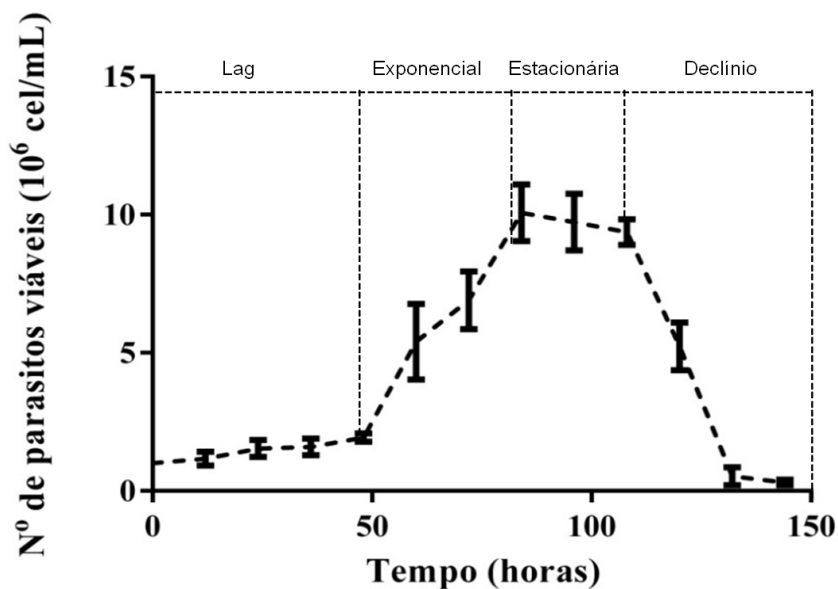


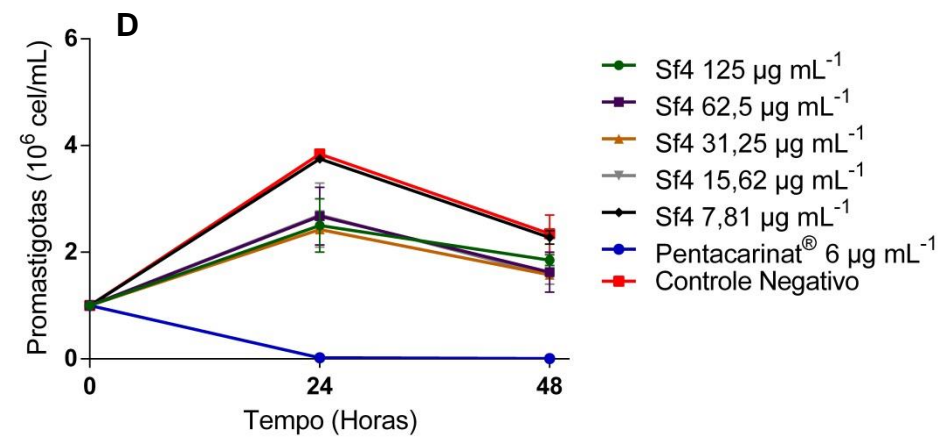
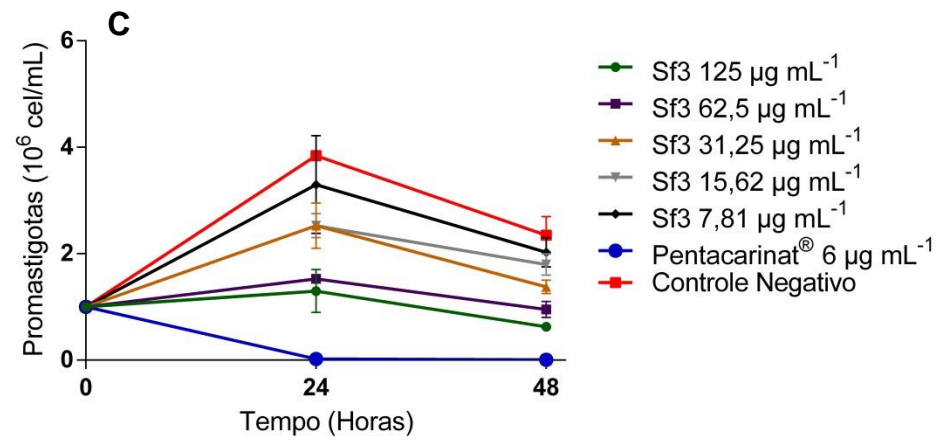
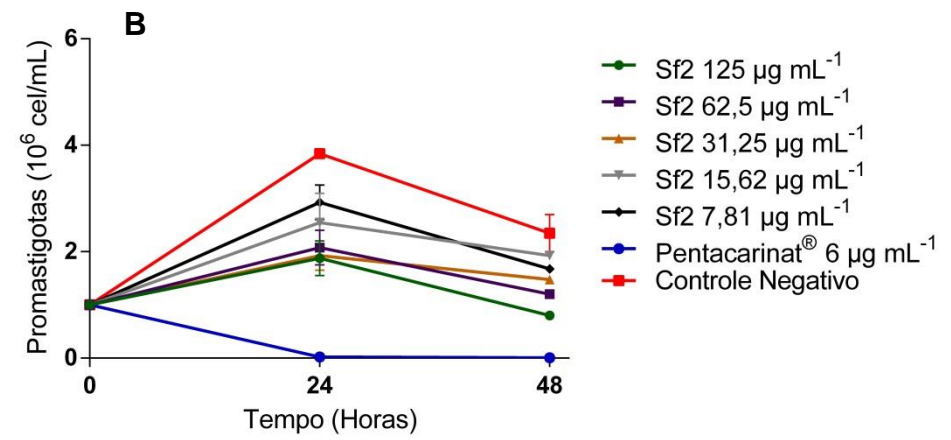
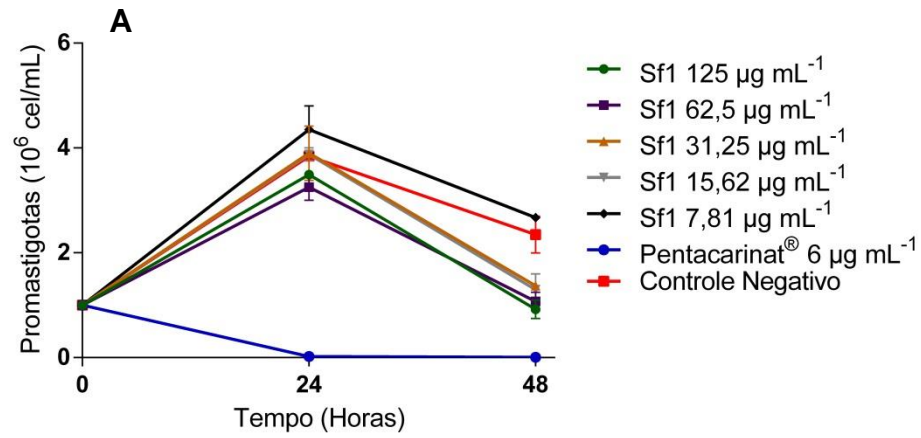
Figura 18. Curva de crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) acompanhada por 7 dias, com contagem diária.

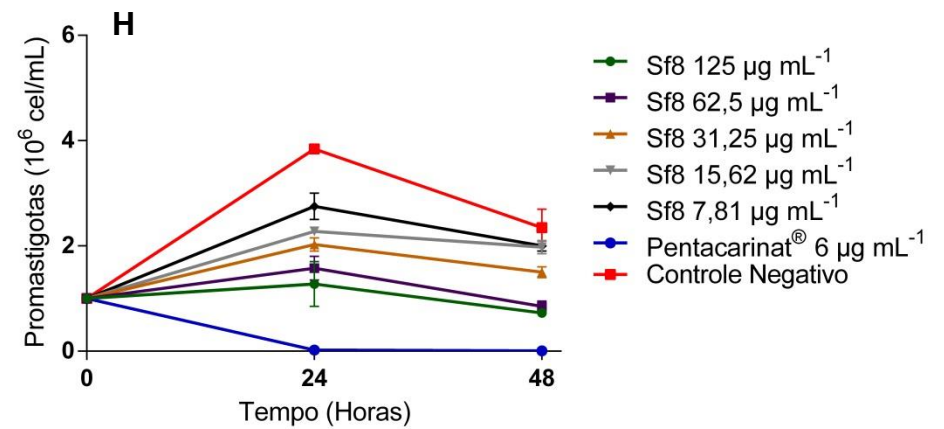
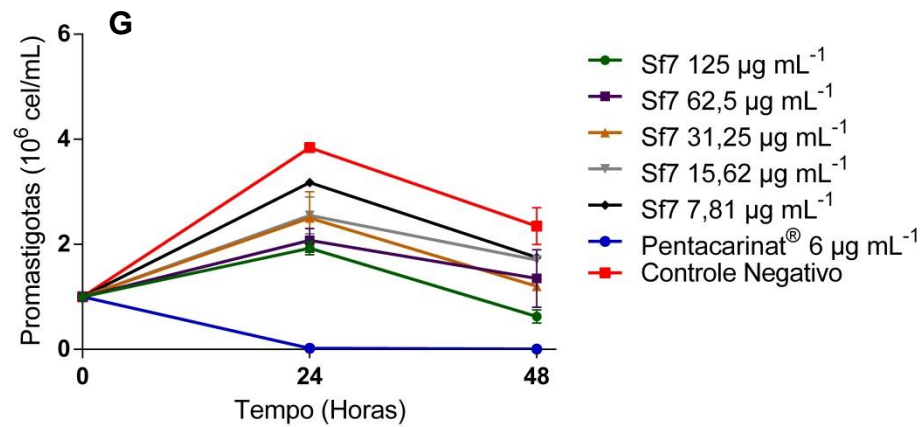
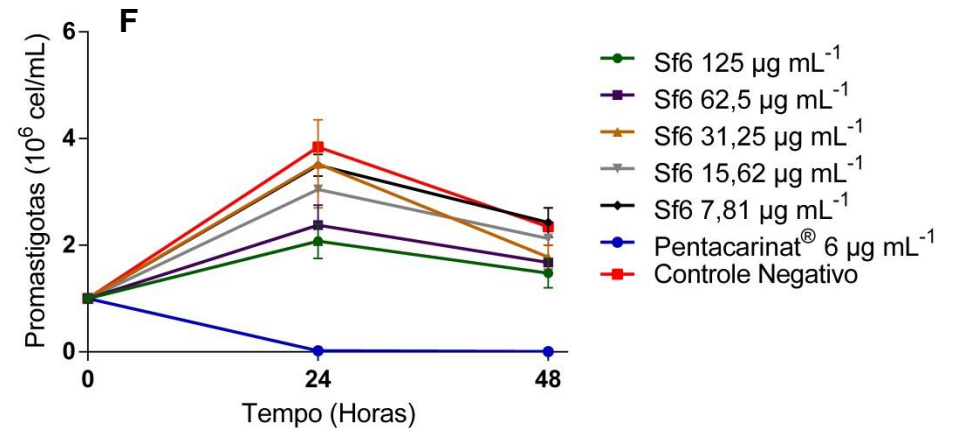
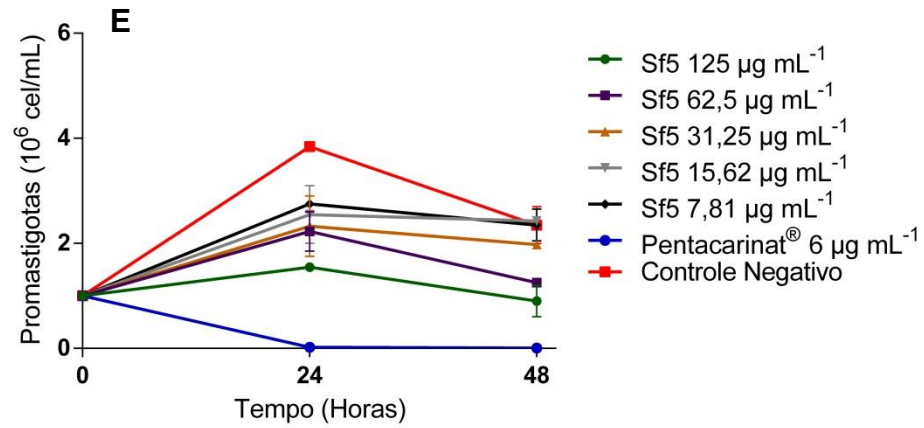
Em meio de cultura as formas promastigotas diferenciam-se em formas metacíclicas infectantes, reproduzindo o processo de metaciclogênese que acontece no hospedeiro invertebrado. Portanto, em todos os experimentos com formas promastigotas, optou-se por utilizar os parasitas no 4º dia do crescimento na 4ª passagem em cultivo.

As subfrações 3 e 8 controlaram o crescimento parasitário em 24 horas e inibiram em 48 horas, esses resultados foram mais significativos do que as demais subfrações, principalmente nas concentrações 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, o controle positivo, Pentacarinat[®] demonstrou melhores resultados no período de 24 e 48 horas (Figura 19).

Os valores de IC_{50} encontrados para as Subfrações obtidas de *L. ferrea* variaram de 52,3 a $>100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 2). Segundo Osorio et al. (2007), as concentrações ativas em ensaios biológicos *in vitro*, podem ser classificadas como: concentrações altamente ativas ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ativas (IC_{50} entre 10-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), moderadamente ativas (IC_{50} entre 50-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e não ativas ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Supracitado, corroborou a análise dos resultados do ensaio biológico com essas subfrações, onde as subfrações 3 e 8 testados contra *L. amazonensis*, desempenharam IC_{50} igual a 59 e 52,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, diante disso consideradas moderadamente ativas.

Segundo o trabalho de Comandolli-Wyrepkowski (2015), a fração DCM apresentou IC_{50} igual a 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *L. amazonensis*, valor mais ativo que as subfrações, fato este observado, sugerindo uma provável perda da ação sinérgica dos compostos presentes, como identificado com outras espécies vegetais frente a outro protozoário, como o *Plasmodium* spp. (RASOANAIVO et al., 2011). Baseado nessas informações deve-se destacar que a interação entre duas ou mais substâncias a partir do extrato pode ter efeito biológico mais promissor que quando utilizadas individualmente, dessa forma destaca-se a importância do desenvolvimento dos fitoterápicos como alternativa terapêutica para a leishmaniose tegumentar, como para qualquer outra doença negligenciada.





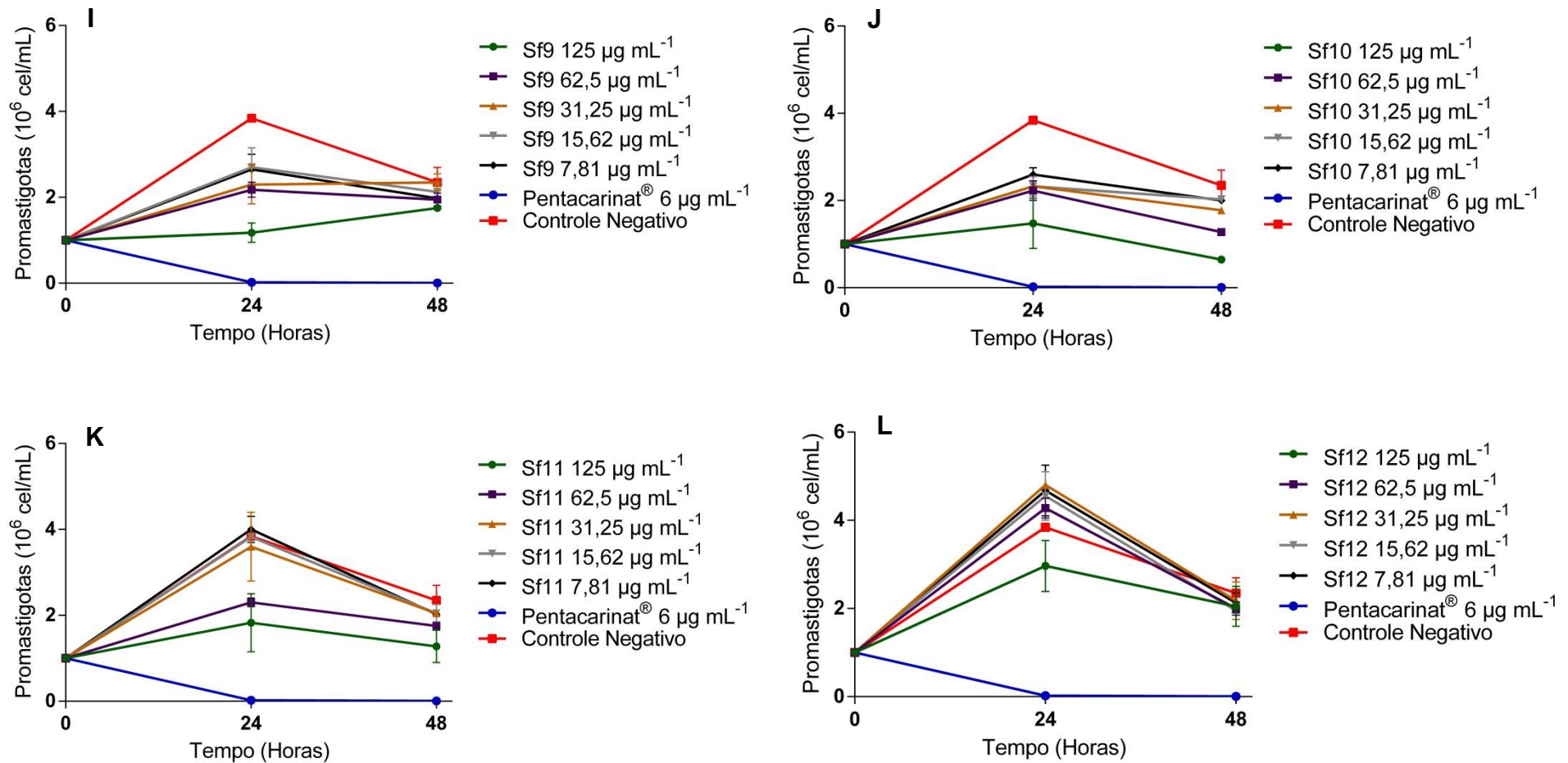


Figura 19. Atividade antileishmania das subfrações de *Libidibia ferrea* frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584). **A** – Subfração 1. **B** – Subfração 2. **C** – Subfração 3. **D** – Subfração 4. **E** – Subfração 5. **F** – Subfração 6. **G** – Subfração 7. **H** – Subfração 8. **I** – Subfração 9. **J** – Subfração 10. **K** – Subfração 11. **L** – Subfração 12. Os parasitas (10^6 células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações a 25°C e avaliados em 48 horas. Isetionato de Pentamidina (Pentacarinat® 6 $\mu\text{g/mL}$) foi usado como controle positivo. Como controle negativo parasitas expostos ao DMSO 1%.

Tabela 06 – Atividade antileishmania para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e valores calculados de IC₅₀ por regressão linear para as subfrações de *Libidibia ferrea*.

Subfração	IC 50 (µg.mL ⁻¹)
Sf1	98,7
Sf2	74,8
Sf3	59
Sf4	>100
Sf5	>100
Sf6	>100
Sf7	81,3
Sf8	52,3
Sf9	>100
Sf10	74,1
Sf11	>100
Sf12	>100

A partir do ensaio biológico frente ao parasita na forma promastigota foi feito uma triagem, avaliando as subfrações mais ativas para os ensaios seguintes, o de citotoxicidade em macrófagos de cultivo primário e contra o parasita na forma amastigota. De acordo com os resultados obtidos as subfrações 3 e 8 foram as sugeridas para a continuidade desse estudo. A subfração 3 apresentou 42,4% de atividade citotóxica na primeira concentração (125 µg.mL⁻¹) e as outras concentrações (62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg.mL⁻¹) apresentaram aproximadamente 99% de viabilidade celular. A Subfração 8 não apresentou efeito citotóxico em nenhuma concentração (125 a 7,81 µg.mL⁻¹), com 100% de células viáveis, aspecto bastante positivo devido muitos produtos vegetais apresentarem toxicidade, inclusive espécies da família Fabaceae (CAMPOS et al., 2016). Não foi observado diferença estatística entre as subfrações, com $p > 0.05$ ($p = 0.476$). As subfrações apresentaram menor toxicidade celular frente ao controle positivo (Pentacarinat[®]), que apresentou apenas 25% das células viáveis, considerado alto teor citotóxico (Figura 20).

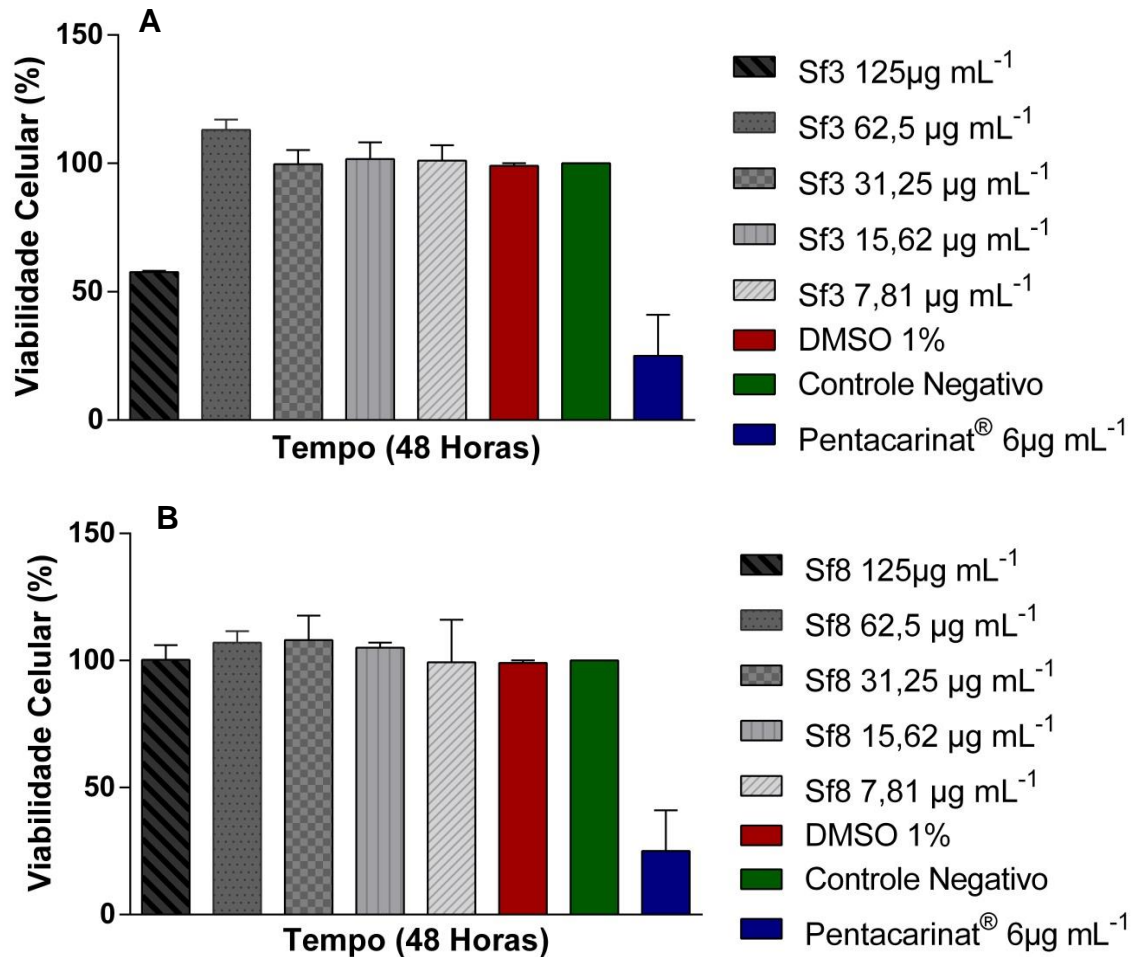


Figura 20. Atividade citotóxica das subfrações mais ativas em macrófagos de cultivo primário (murino) incubados a 37 °C por 48 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica Alamar Blue®. **A** – Macrófagos frente a Subfração 3 (125 a 15,62 µg/mL). **B** – Macrófagos frente a Subfração 8 (125 a 15,62 µg.mL⁻¹).

Devido as subfrações 3 e 8 não mostrarem potencial citotóxico, as mesmas foram selecionadas para avaliação da atividade antileishmania nas formas intracelulares em macrófagos infectados. As subfrações demonstraram baixa atividade contra as amastigotas de *L. amazonensis*. A subfração 8 nas duas maiores concentrações (125 e 62,5 µg.mL⁻¹) apresentaram o maior potencial de inibição, com aproximadamente 21% frente as células infectadas. Já a subfração 3 não mostrou-se eficaz, mesmo na maior concentração (125 µg.mL⁻¹), com 9% de inibição parasitária. O controle positivo, Pentacarinat® mostrou-se ineficaz contra a *L. amazonensis*, apresentando apenas 5,5% de inibição na maior concentração (6 µg.mL⁻¹) [Figura 21]. Embora a subfração 8 ter apresentando o melhor resultado que o Pentacarinat®, não houve diferença estatística, com $p > 0.05$.

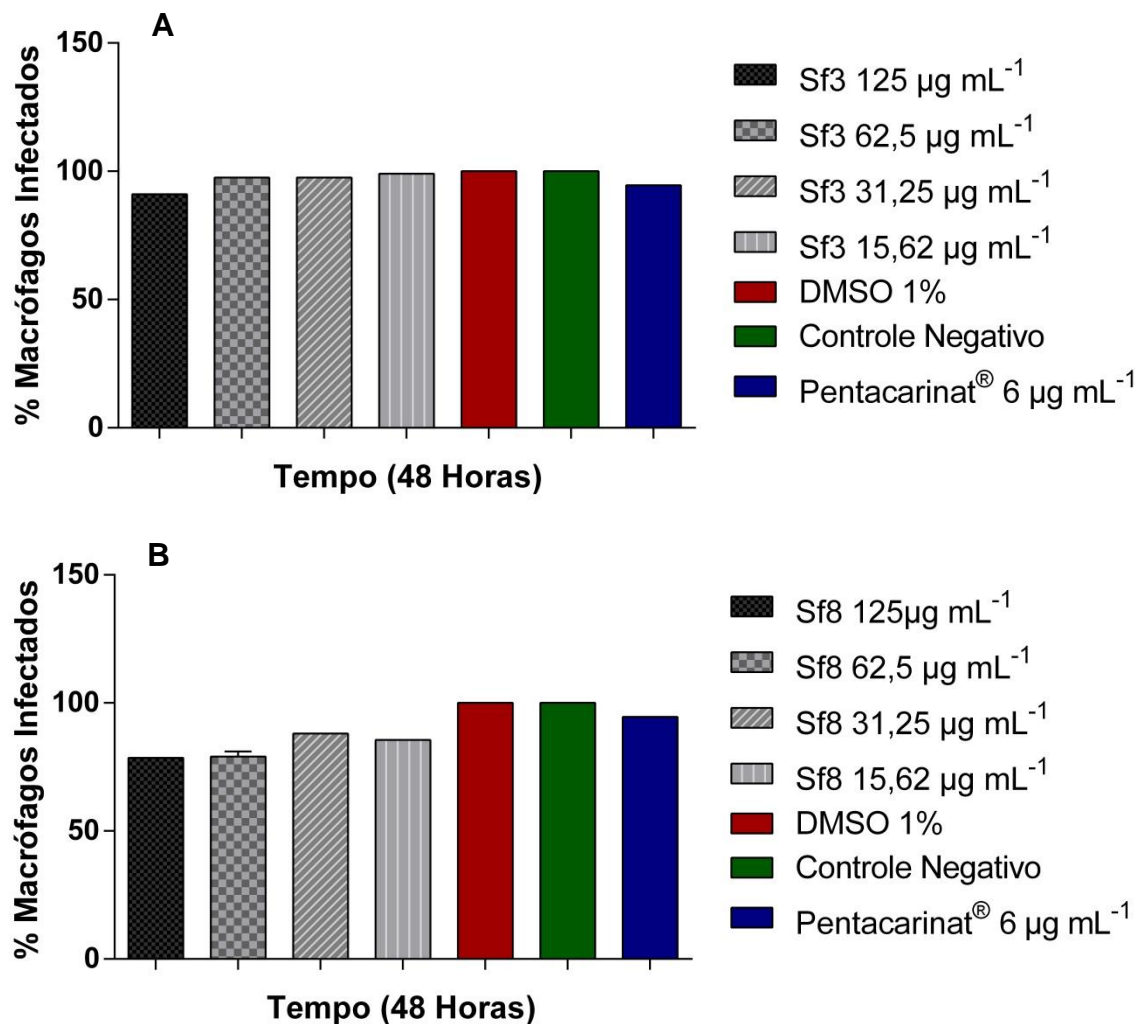


Figura 21. Atividade das Subfrações frente a formas amastigotas (*Leishmania amazonensis*) interiorizadas em macrófagos de cultivo primário (murino). **A** – Diferentes concentrações da Subfração 3 (125 a 15,62 $\mu\text{g/mL}$). **B** – Diferentes concentrações da Subfração 8 (125 a 15,62 $\mu\text{g/mL}$). Incubação 48 horas a 25 °C.

Observou-se por microscopia ótica que a estrutura morfológica dos macrófagos infectados ficaram comprometidas em exposição a subfração 3 e ao Pentacarinat[®], com núcleo desintegrado e alteração no citoplasma, principalmente na exposição das duas maiores concentrações, características de processo apoptótico (PAROLIN; REASON, 2001). Os macrófagos infectados expostos a subfração 8 permaneceram íntegros em todas as concentrações, resultado semelhante aos dos macrófagos infectados (Controle, ausente de tratamento) e as células não infectadas, aspectos morfológicos normais (Figura 22).

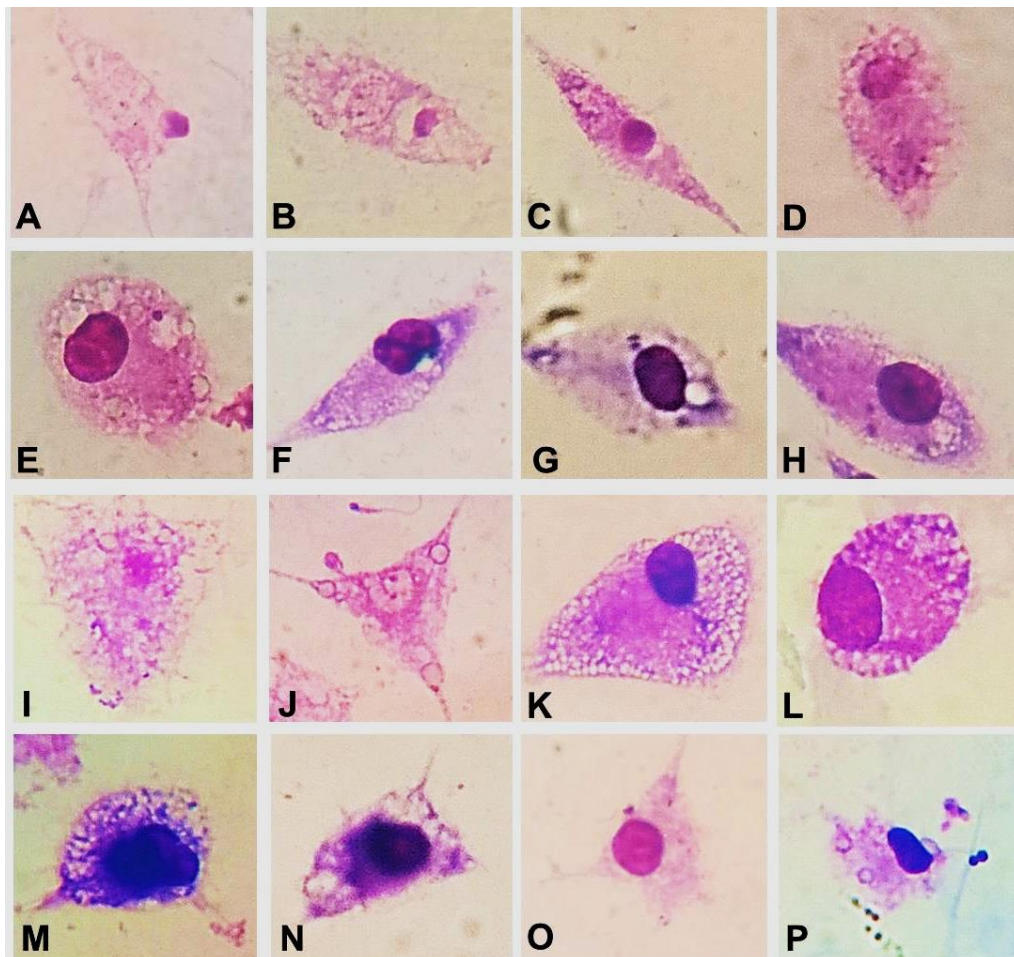


Figura 22. Efeito da atividade das subfrações de *Libidibia ferrea* contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos de cultivo primário (murinos). **Macrófago infectado exposto a Subfração 3 nas concentrações:** A – 125 µg/mL; B – 62,5 µg/mL; C – 31,25 µg/mL; D – 15,62 µg/mL; E – 125 µg/mL; **Macrófago infectado exposto a Subfração 8 nas concentrações:** F – 62,5 µg/mL; G – 31,25 µg/mL; H – 15,62 µg/mL; **Macrófago infectado exposto a Pentacarinat® nas concentrações:** I - 6 µg/mL; J – 3 µg/mL; K – 1,5 µg/mL; L – 0,75 µg/mL; **M e N** – Macrófagos infectados (Controle). **O e P** – Macrófagos não infectados.

Etapa 2: Desenvolvimento da microemulsão e Teste biológico *in vivo*

Desenvolvimento e caracterização da microemulsão

Quanto o aspecto macroscópico, as microemulsões Placebo (MPLA) e a incorporada com a fração diclorometano de *L. ferrea* (MFDCM) apresentaram-se translúcidas (coloração amarelo claro e marrom escuro, respectivamente), límpidas e

homogêneas (monofásicas) [Figura 23] e mostraram-se estáveis (sem turvação ou separação de fases) durante todo o estudo de caracterização.



Figura 23. Aspecto das Microemulsões: A) Placebo (MPLA) e B) incorporada com a fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (MFDCM).

A avaliação do potencial de hidrogênio (pH) é um dos critérios indicativo quanto à estabilidade química da formulação. Normalmente, um baixo valor de pH é proporcional a grande quantidade de ácidos graxos nos sistemas (BRUXEL et al., 2012). Essa informação é também usual quanto à avaliação de tolerância biológica para aplicação na pele, tendo em vista que a faixa tolerável para produtos cutâneos varia entre 5,5 a 8,0 (SILVA et al., 2009). O valor de pH encontrado na microemulsão MPLA foi igual a 5,2 e, ao incorporar a fração DCM de *Libidibia ferrea*, o pH diminuiu para 4,7, fator este possivelmente decorrente da presença de grupos fenólicos já identificados nessa fração (Comandolli-Wyrepkowski, 2015) [Tabela 07]. Frente a isto, durante todo o período de aplicação das formulações nos animais de experimentação, foi avaliado qualquer sinal de irritabilidade cutânea, fato não observado.

Com relação à viscosidade, observou-se que as microemulsões MPLA e MFDCM apresentaram uma viscosidade similar (Figura 24). A determinação desse parâmetro é essencial para verificar se a incorporação da substância não altera significativamente a viscosidade do veículo (DANTAS, 2010). O comportamento reológico dos sistemas foi do tipo newtoniano, no qual não houve alteração da viscosidade mediante o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 25). Esse

comportamento é adequado à aplicação tópica, visto que a baixa influência da temperatura e pressão sobre a viscosidade sugerem bom espalhamento durante a aplicação (SINTOV; LEY; BOTNER, 2010; MARGULIS-GOSMEN; MAGDASSI, 2012).

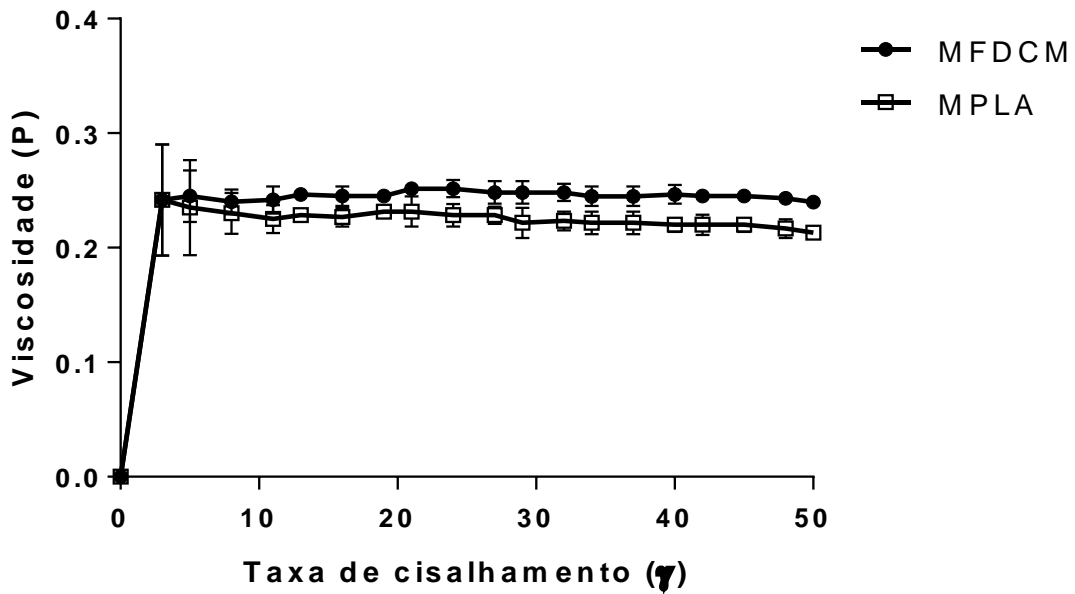


Figura 24. Comportamento da variação de viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das microemulsões.

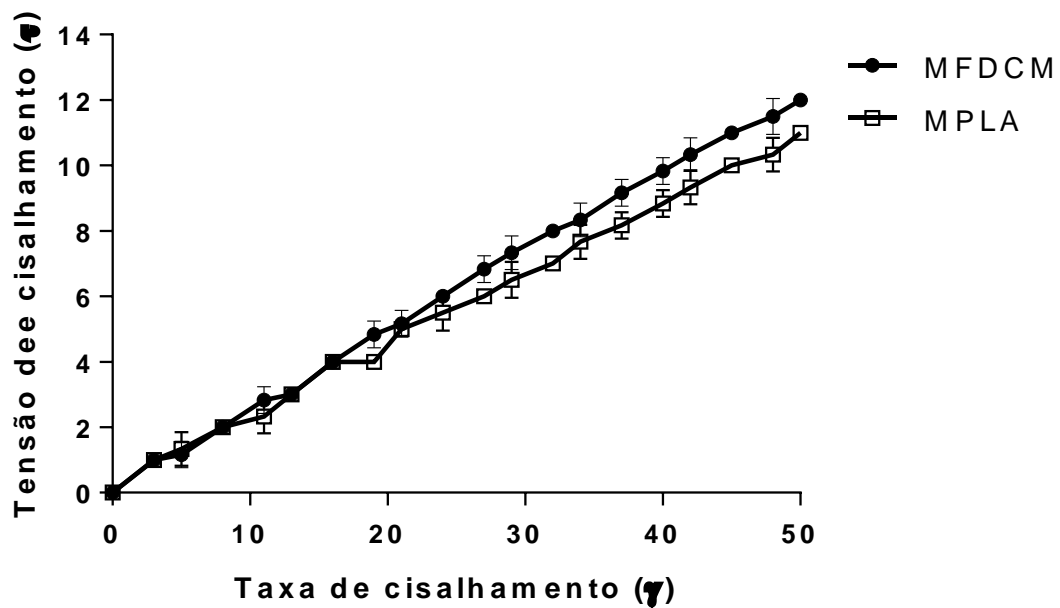


Figura 25. Comportamento reológico das microemulsões.

Os valores do índice de refração das microemulsões MPLA e MFDCM foram de 1,421 e 1,419, respectivamente. Estes valores indicam que o sistema é classificado como isotrópico, ou seja, não apresentam birrefringência, com a incapacidade de desviar o plano de luz incidente (ROSSI et al., 2007). Além disso, possui transparência muito semelhante à água, cujo índice de refração é de 1,333 (SILVA; LIRA; EGITO, 2009).

As microemulsões foram caracterizadas com auxílio do equipamento ZetaSizer, quanto ao tamanho médio das gotículas, índice de polidispersão e potencial Zeta (Tabela 07).

Tabela 07 – Análise das gotículas dispersas das Microemulsões Placebo (MPLA) e incorporada com a fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (MFDCM).

Parâmetro	MPLA	MFDCM
Aspecto macroscópico	Lme	Lac
pH	5,2	4,7
Índice de refração	1,421	1,419
Tamanho de gotícula (nm)	2,7	2,3
Índice de Polidispersão (IPD)	0.4	0.9
Potencial Zeta (mV)	-7,9	- 8,8

Lac=Límpida e amarelo claro; Lme=Límpida e marrom escuro.

Conforme a Figura 26, a formulação MPLA apresentou tamanho médio de gotículas de 2,7 nm, sendo que 99,8% das gotículas medidas estavam na faixa de 1 a 5 nm, que gerou um IPD de 0,4. Apesar da incorporação do extrato, a ME-DCM apresentou tamanho médio de gotículas de 2,3 nm, com 97,3% das gotículas na faixa de 1 a 5 nm. Entretanto, houve um aumento do PDI para 0,9, o que pode ser explicado pelo surgimento de um pequeno sinal na região de 1100 a 1300 nm (Figura 9), mas que corresponde a menos de 3% da formulação. Desse modo, observa-se que os tamanhos das gotículas são compatíveis com sistemas microemulsionados, pois apresenta valores médios menores que 100nm (FORMARIZ, 2004).

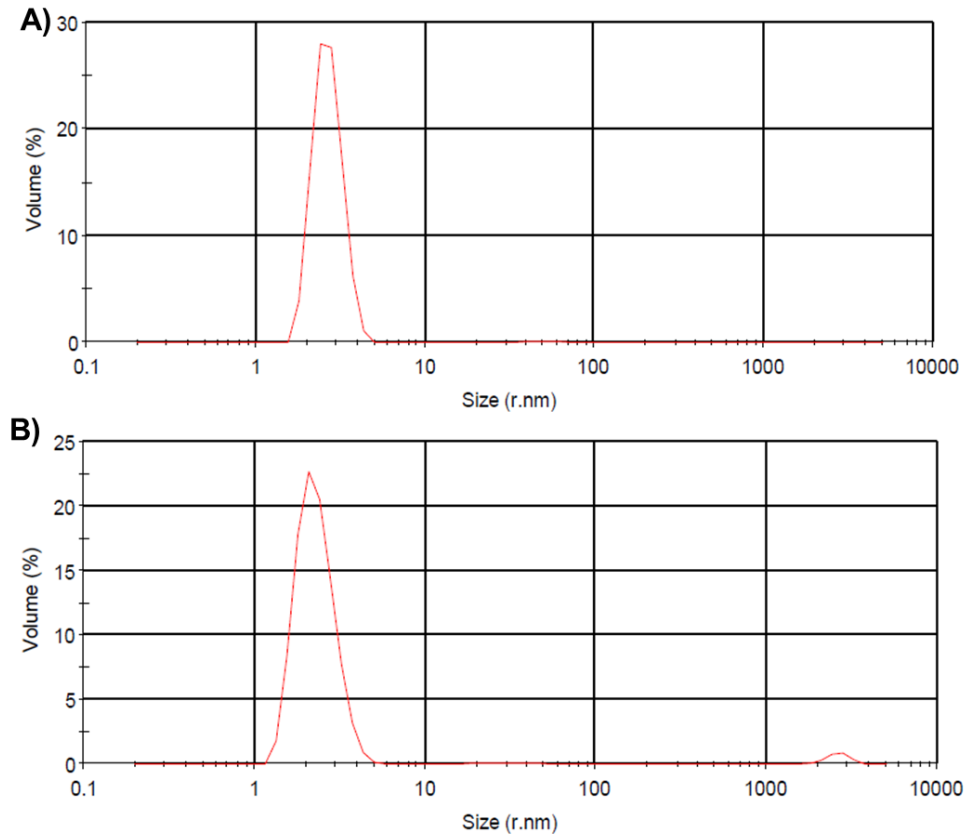


Figura 26. Distribuição dos tamanhos das microemulsões: A) MPLA (Placebo); B) MFDCM (incorporada com a fração diclorometano de *Libidibia ferrea*).

Quanto aos valores de potencial Zeta, quanto maior o módulo (independente se o valor é positivo ou negativo), maior a repulsão entre as gotículas que, ao se chocarem menos, aumentam a estabilidade do sistema (AULTON, 2001). Apesar das formulações MPLA e MFDCM terem apresentado baixos valores de potencial zeta, -7,9 mV e -8,8 mV, respectivamente (Tabela 3), esse achado não é relevante, uma vez que microemulsão, por definição, é um sistema termodinamicamente estável (OKUR et al., 2011).

Vinte dias após o período de inoculação, os animais apresentaram aspecto clínico característicos com a patologia, com lesões nodulares (histiocitoma leishmaniótico). Segundo o trabalho de Comandolli-Wyrepkowski (2017), que realizou ensaio *in vivo* com hamsters (*M. auratus*) infectados com *L. amazonensis*, esses animais de experimentação apresentaram os mesmos sinais clínicos e período de infecção no presente estudo.

Análise estatística não apresentou diferença significativa entre o tratamento LMFDCM (microemulsão incorporada com a fração DCM de *Libidibia ferrea*) e os grupos LGIM e LGIL (tratados com Glucantime[®] pela via parenteral) [Figura 27]. Resultado promissor, pois vale salientar que a microemulsão foi administrada por via tópica e os tratamentos com Glucantime[®] foram por via sistêmica, vulneráveis a apresentarem reações indesejadas (RANG; DALE, 2011).

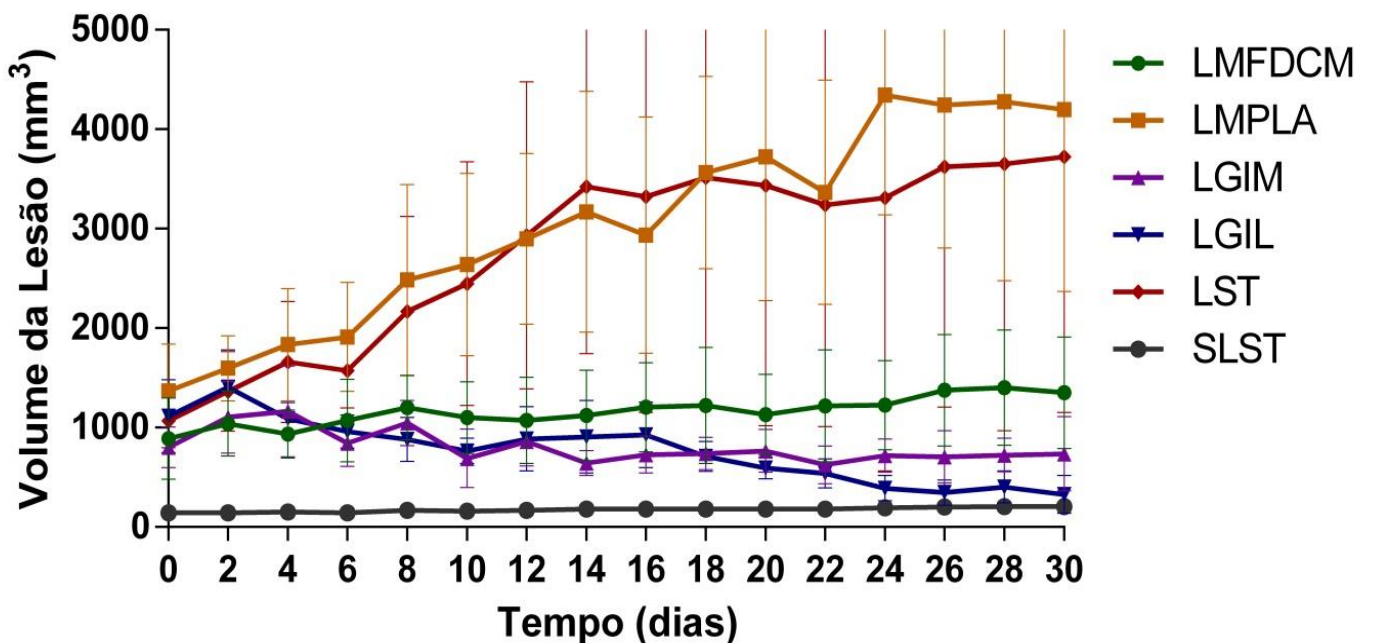


Figura 27. Evolução Clínica do volume das lesões em *Mesocricetus auratus* infectados no focinho com *Leishmania amazonensis*, durante o tratamento local. **LMFDCM** – Tratamento tópico com a microemulsão incorporada com a fração DCM de *Libidibia ferrea*. **LMPLA** – Tratamento tópico com a microemulsão placebo. **LGIM** – Tratamento intramuscular com o Glucantime[®]. **LGIL** – Tratamento intralesional com o Glucantime[®]. **LST** – Controle negativo, ausência de tratamento. **SLST** – animais sem infecção.

No 10^o dia após início do tratamento, o grupo LMFDCM apresentou significância estatística com o grupo LMPLA (microemulsão placebo), com $p < 0.05$ e a partir do 11^o dia mostrou diferença estatística frente ao LST (grupo controle negativo) com $p < 0,001$. Quanto a comparação entre grupo LMPLA e LST, não houve significância estatística, demonstrando que a formulação placebo não interfere na terapia.

A evolução clínica da progressão da lesão é um parâmetro importante e foi registrado diariamente neste estudo, uma vez que na leishmaniose tegumentar

pode-se observar a evolução de lesões histiocitárias em hamsters infectados por *Leishmania* sp., permanecendo nodulares ou cronificando para lesões ulceradas (COSTA-FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008). O grupo controle (LST) apresentou um aumento médio de 383% no volume total das lesões em relação ao primeiro dia até o término do tratamento.

O grupo LMFDCM controlou o desenvolvimento da lesão durante o período experimental (aumento de 25% após 30º dia de tratamento), apresentando lesões nodulares uniformes e discretas (Figura 28). Já o grupo LMPLA evoluiu clinicamente com lesões ulceradas de 1170 a 2100 mm², semelhante ao grupo LST com a presença de úlceras, com variação de 350 a 800 mm², alguns animais apresentaram lesões com abscesso, indicando ativação do processo inflamatório (QUINTELLA, 2010).

Os grupos LGIM e LGIL manifestaram lesões nodulares discretas e redução das mesmas significativamente, onde o primeiro apresentou redução de aproximadamente 20%. Em contrapartida, o grupo com administração intralesional, mesmo sendo a via de administração mais invasiva, mostrou 77% de redução lesional.

Conforme o trabalho de Comandolli- Wyrepkowski (2015), realizado com hamsters infectados com *L. amazonensis*, submetidos ao tratamento tópico com uma emulsão incorporada com a fração DCM de *Libidibia ferrea*, demonstrou ter controle do desenvolvimento da patologia, assim como o grupo LMFDCM.

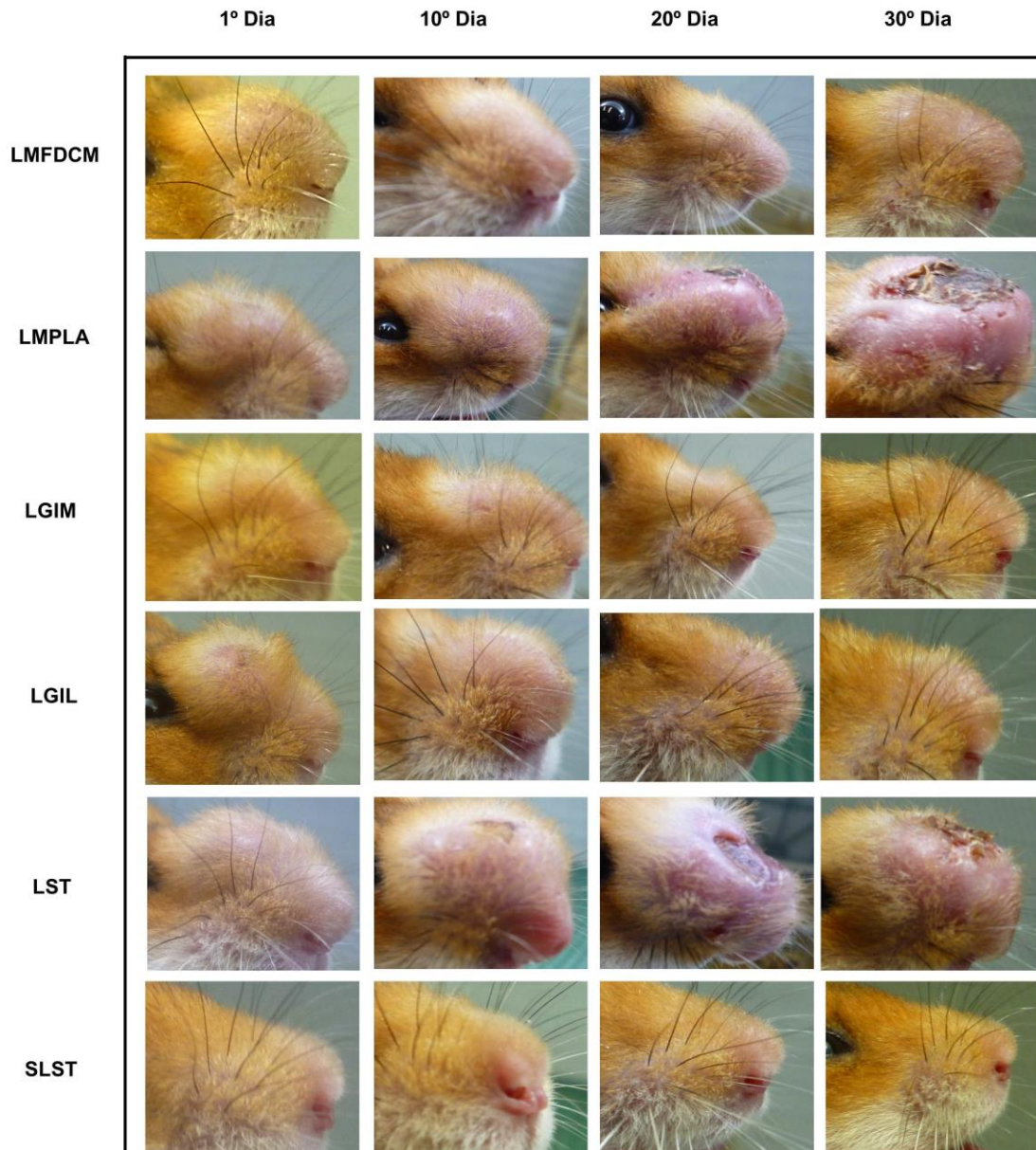


Figura 28. Aspecto clínico macroscópico das lesões cutâneas em *Mesocricetus auratus* infectados por *Leishmania amazonensis* no período inicial ao término do tratamento. **LMFDCM** – Tratamento tópico com a microemulsão incorporada com a fração DCM de *Libidibia ferrea*. **LMPLA** – Tratamento tópico com a microemulsão placebo. **LGIM** – Tratamento intramuscular com o Glucantime®. **LGIL** – Tratamento intralesional com o Glucantime®. **LST** – Controle negativo, ausência de tratamento. **SLST** – animais sem infecção.

Nesse estudo também foi realizada a análise ponderal, pois são informações de extrema importância quanto à avaliação das substâncias, se o tratamento estaria influenciando alterações no sistema fisiológico dos animais (NERY, et al., 2011). Foi possível observar que durante ao período de infecção e de exposição aos tratamentos, não houve interferência no ganho de peso (Figura 29).

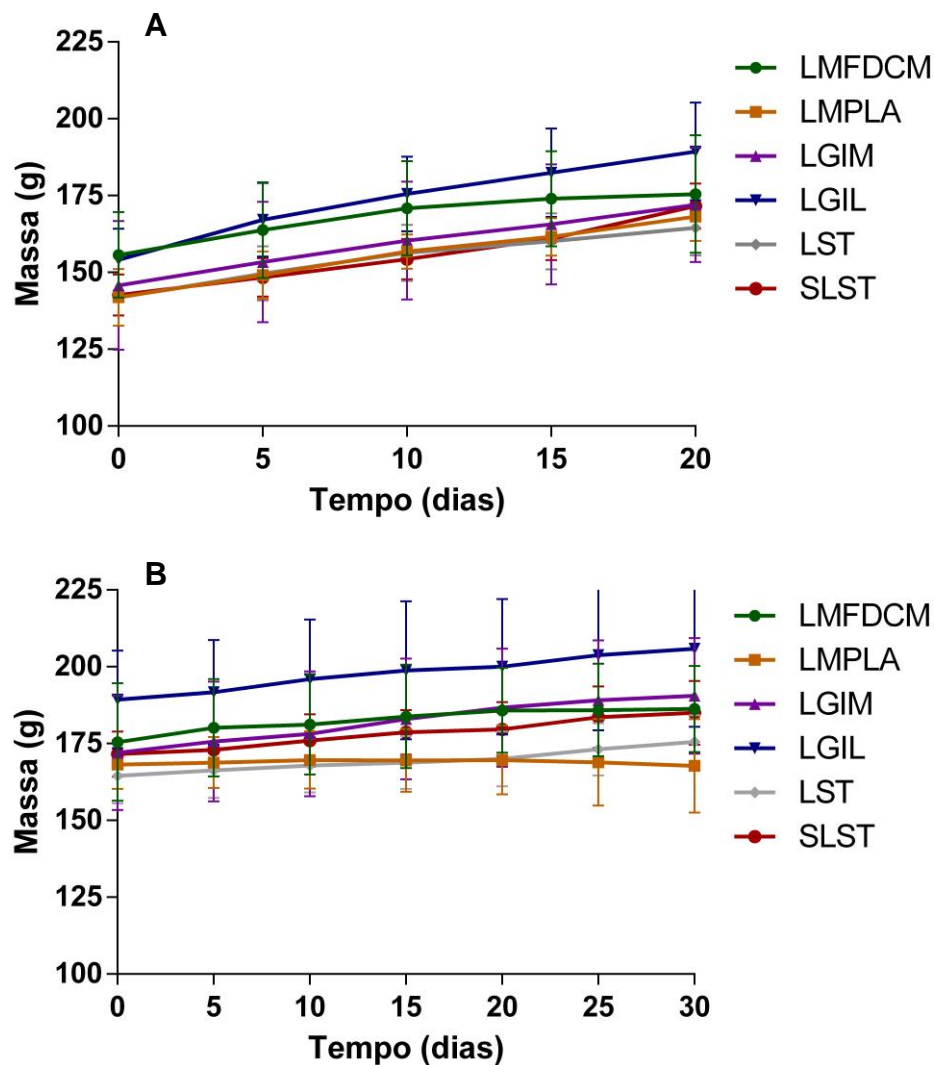


Figura 29. Avaliação ponderal dos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania amazonensis*, presente nesse experimento. A) Análise ponderal no período de infecção. B) Análise ponderal durante o tratamento. **LMFDCM** – Tratamento tópico com a microemulsão incorporada com a fração DCM de *Libidibia ferrea*. **LMPLA** – Tratamento tópico com a microemulsão placebo. **LGIM** – Tratamento intramuscular com o Glucantime®. **LGIL** – Tratamento intralesional com o Glucantime®. **LST** – Controle negativo, ausência de tratamento. **SLST** – animais sem infecção.

A viabilidade parasitária verificada pelo isolamento em meio de cultivo NNN foi semi-quantitativa, e demonstrou maiores scores de parasitas flagelados viáveis, os do grupo LMPLA e LST ($score = 3$) após o período de 7 dias de incubação. Os grupos LMFDCM, LGIM e LGIL mostraram $score < 2$, caracterizando uma redução parasitária (Figura 30).

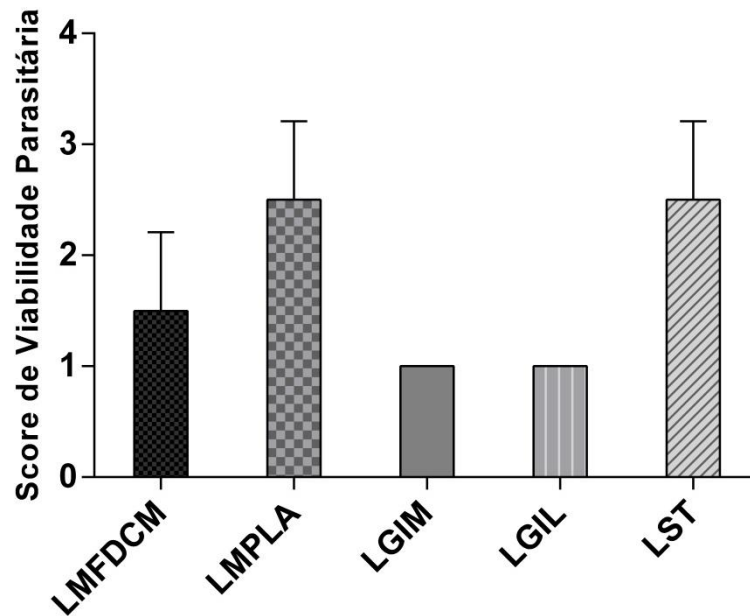


Figura 30. Score de parasitas viáveis visualizados em meios de cultivo NNN (Novy-McNeal-Nicolle) sete dias após sementeira de fragmentos das lesões dos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania amazonensis* dos grupos experimentais. Considera-se 0 = ausência; 1 = 1 a 10 parasitas/campo; 2 = 10 a 100 parasitas/campo e 3 = >100 parasitas/campo.

A avaliação da carga parasitária foi confirmada com a análise dos campos contendo material biológico oriundo das impressões em lâminas, parâmetros determinados pela presença do parasita intracelular e sua abundância relativa frente às diferentes amostras (Figura 31). O grupo LMFDCM não apresentou significância estatística comparando-se com os grupos LGIM e LGIL. Quando comparada com o grupo LST, apresenta grande significância estatística, com $p < 0.001$.

A partir desses resultados é possível observar a redução da carga parasitária, no entanto, nenhum grupo apresentou cura parasitológica. Essa questão levanta muitos questionamentos quanto a possível cura parasitológica após o tratamento com a medicação indicada pelo Ministério da Saúde. Paula (2010), investigou pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana clinicamente curados, porém, a partir de técnicas moleculares foi possível detectar em algumas cicatrizes de pacientes o DNA de *Leishmania*, caracterizando apenas uma cura clínica.

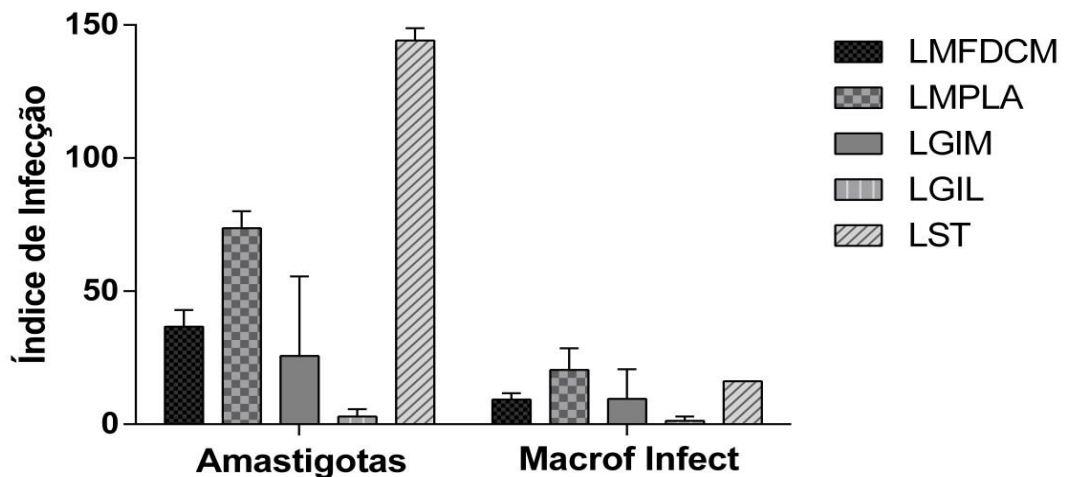


Figura 31. Índices da abundância relativa de amastigotas e do percentual de macrófagos infectados (carga parasitária) visualizados e quantificados por microscopia óptica (1000x) nas impressões em lâminas dos tecidos proveniente dos locais de lesão de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania amazonensis*.

O Estudo com a *L. ferrea* demonstra ser bastante promissor, indicando o interesse em ser continuado com o aprimoramento no desenvolvimento de um fitoterápico seguro. Sugere-se uma futura associação tópica com uma das medicações preconizadas pelo Ministério da Saúde, como o Glucantime[®]. Avaliação de estudo sinérgico está sendo uma alternativa na terapia de doenças, como a leishmaniose, onde o estudo de Rodrigues (2012), avaliou o tratamento frente a hamsters infectados com *L. braziliensis*, estudo este que mostrou grande eficácia na combinação de antimoniato pentavalente com o gel incorporado com paromomicina, possibilitando a redução da concentração da medicação padrão. Assim, este estudo com a microemulsão incorporada com a fração DCM de *L. ferrea* poderia potencializar a terapêutica e a possível redução na concentração medicamentosa, consecutivamente minimizando as reações adversas em pacientes acometidos pela leishmaniose tegumentar e o tempo do tratamento.

CONCLUSÃO

- Foram obtidas 12 subfrações da fração DCM a partir do extrato metanólico de *Libidibia ferrea*;
- A partir dos ensaios *in vitro* foi possível demonstrar que a subfração 8 apresentou o melhor resultado para atividade antileishmania contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*, além de não apresentar citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos de cultivo primário;
- A fração DCM de *Libidibia ferrea* incorporada na microemulsão demonstrou controle no desenvolvimento da lesão no período de 30 dias de experimentos com redução da carga parasitária comparando-se ao grupo controle. Vale salientar, que não houve diferença estatística frente ao tratamento padrão recomendado pelo Ministério da Saúde;
- O fruto de *Libidibia ferrea* demonstra ser um potencial candidato ao uso tópico no tratamento local das lesões ocasionadas pela leishmaniose cutânea. A fração DCM poderia ser usada em associação a outras drogas parenterais, avaliando seu efeito sinérgico e aprimorando o esquema terapêutico a ser aplicado nessa enfermidade;
- O Tratamento intralesional com Glucantime® em animais de experimentação suscetíveis a infecção por *Leishmania amazonensis*, demonstrou eficácia de acordo com a indicação feita pelo Ministério de Saúde para indivíduos humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. A. et al. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

ALCHALABI, K.; GUTTERRIDGE, W.E. Presence and properties of thymidylate synthetase in trypanosomatids. **Biochem Biophys Acta**, v. 481, p. 71-79. 1977.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7, p. 35671. 2012.

AMOROZO, M.C.M. Uso de diversidade de plantas medicinais em santo Antonio do leverger, MT, Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002.

ARAUJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 751-754, 1998.

AUNTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2001.

BATUBARA, I.; MITSUNAGA, T.; OHASHI, H. Brazilian from *Caesalpinia sappan* wood as an antiacne agent. **The Japan Wood Research Society**, v. 56, p. 77-81, 2009.

BERMAN, J. Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Current Opinion in Infections Diseases**, v. 11, p. 707-710, 1998.

BERMAN, J.D.; WADDELL, D.; HANSON, B.D. Biochemical Mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 1985.

BOECK, P.; FALCAO, C.A.B.; LEAL, P.C.; YUNES, R.A.; FILHO, V.C.; TORRES-SANTOS, E.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues –ith increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BRASIL. Pentoxifilina no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Mucosa. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. 2015.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2. ed. Brasília : Editora do Ministério da Saúde. 2017.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química nova**, v.35, n.9, p.1827-1840, 2012.

CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 6, n.2, p. 261-279, 2001.

CAMACHO, M.D.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; KIRBY, G.C.; WARHURT, D.C.; SOLIS, P.N. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 203-210, 2001.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 373-382, 2016.

CARVALHO, J.C.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.; BASTOS, J.K. DOS SANTOS, F.D.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and antiinflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CASTRO, J.F. **A relação entre patentes farmacêuticas, doenças negligenciadas e o programa público brasileiro de produção e distribuição de medicamentos**. 2012. 136 f. Dissertação (Mestrado em Sociologia) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

CAVALHEIRO, M.C.; FARIAS, D.F.; FERNANDES, G.S.; NUNES, E.P.; CAVALCANTI, F.S.; VASCONCELOS, I.M.; MELO, V.M.M.; CARVALHO, A.F.U. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 586-591, 2009.

CHASE, M. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

CHRISTENSEN, S.B.; MING, C.; ANDERSEN, L.; HJORNE, U.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. An antileishmanial chalcone from chinese licorice roots. **Planta Medical**, v. 60, p. 121-123, 1994.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; GRAFOVA, I.; NAIFF, M. F.; AVELLA, M.; GENTILE, G.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. Topical treatment of experimental cutaneous leishmaniasis in Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) with formulations containing pentamidine. **Acta Amazonica**, v. 47, n.1, p. 39-46, 2016.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C.D. **Atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* de *Libidibia ferrea* e estudo de formulações tópicas para o tratamento da forma cutânea da Leishmaniose**. 2015. 199 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2015.

CORTEZ, A. C. **Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos fitoquímicos de *Libidibia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Libidibiaceae) para *Leishmania spp.* e *Trichophyton spp.*** 2004. 86 f. Dissertação

(Mestrado em Patologia Tropical), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2004.

COSTA, J.M.L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, p. 3-17. 2005.

COSTA-FILHO, A. V.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.

DANTAS, T. N. C. et al. Development of a new propolis microemulsion system for topical applications. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 368-375, junho/julho, 2010.

DELORENZI, J.C.; FREIRE-DE-LIMA, L.; GATTASS, C.R.; COSTA, D.A.; HE, L.; KUEHNE, M.E.; SARAIVA, E.M.B. *In vitro* activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2111-2115, 2002.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 230p. 1996.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química nova**, v. 36, n. 10, 1552-1556, 2013.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, 5:276. 2012.

ELSHAFEEY, A.H.; HAMZA, Y.E.; AMIN, S.Y.; ZIA, H. *In vitro* transdermal permeation of fenoterol hydrobromide. **Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 2, p. 125-132, 2012.

ESLAMI, Z.; TANNER, C.E. Time course and intensity of infection *in vitro* in the resident peritoneal macrophages of resistant and susceptible mice exposed to different doses of *Leishmania donovani* pro-mastigotes. **International Journal Parasitol**, v. 24, p. 743-747, 1994.

FALCÃO, N. M. S. **Avaliação da atividade biológica de extratos vegetais contra *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) e análise de frações semi-purificadas de *Libidibia ferrea* Martius (Fabales: Libidibiaceae)**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas. 2010.

FERREIRA, C.C.; MAROCHIO, G.G.; PARTATA, A.K. Estudo sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana com Enfoque na Farmacoterapia. **Revista Científica do ITPAC**, Araguaína, v. 5, n. 4. 2012.

FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 199-202, 2002.

FERREIRA, M.R.A.; SOARES, L.A.L. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.) L.P. Queiroz: A review of the biological actives and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 2, p. 140-150. 2015.

FIGUEIREDO, K.A.; MENDES, R.M.B.; CARVALHO, A.L.M.; FREITAS, R.M. Microemulsões como sistemas de liberação de fármacos para a via transdérmica: uma prospecção tecnológica. **Revista de Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 4, p. 36-46, 2013.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J.D.F.; CANTO-CARVALHEIRO, M.M.; MENNA-BARRETO, R.F.S.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. Oral efficacy of apigenin against cutaneous leishmaniasis: involvement of reactive oxygen species and autophagy as a mechanism of action. **Neglected Tropical Diseases**, 10.1371, 2016.

FORMARIZ, T.P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina**. 2008. 228 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2008.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Relationship between structural features and *in vitro* release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. **Colloids and Surfaces B-Bionterfaces**, v. 60, p. 28-35, 2007.

FORMARIZ, T.P.; WANCZINSKI, B.J.; JÚNIOR-SILVA, A.A.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 16, n. 1, p. 44-57, 2004.

FRANKE, E.D.; WIGNALL, F.S.; CRUZ, M.E.; ROSALES, E.; TOVAR, A.A.; LUCAS, C.M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J.D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Ann Intern Med**, v. 113, n. 12, p. 934-940. 1990.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; MCLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; COOK, M.B.; QUENZER, V.K.; FERGUSON, R.M.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate alamar blue assay. **J Clin Microbiol**, n. 36, p. 362-366. 1998.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; FERREIRA, C.S.; COSTA, M.A.P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumina antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 224-230, 2004.

GALE, E.F.; FOLKES, J.P. Actions of pentamidine on the metabolism of staphylococcus aureus. **BiochemBiophys Acta**, v. 144, p. 467-470. 1967.

GALLO, R.L. Transdermal drug delivery: Development issues and research initiatives. **Archives of Dermatology**, v. 125, n.10, p. 1449, 1989.

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

GONZALES, F.G.; BARROS, S.B.M.; BACCHI, E.M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: IX Semana da Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 40: 79, 2004.

GORDON, S.; UNKELESS, J.C.; COHN, Z.A. Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: evidences for a two stage process. **Journal of experimental medicine**, n. 140 v. 4, p. 995-1010, 1974.

GRIMALDI, G.J.; TESH, R.B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop. Med. Hyg.** v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

HOAR, T.P.; SCHULMAN, J.H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 152, p. 102-103, 1943.

IOSET, J. R. Natural Products for Neglected Diseases: a review. **Current Organic Chemistry**, v. 12, p. 643-666, 2008.

ISAZA, D.M.; ARBOLEDA, M.; RESTREPO, M.; McCANN, S.H.E.; BARKER, D.C. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.** v. 96, p. 165-168, 2002.

JAFFE, C.L.; GRIMALDI, J.G.; MCMAHON-PRATT, D. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: morel, C.M- (ed), Genes and Antigens of Parasites. **A Laboratory Manual.** 2ed. Fundação Oswaldo Cruz, p. 47-91, 1984.

JESUS, J.R. **Avaliação Sorológica de anticorpos para Leishmania spp. através da reação de imunofluorescência indireta em população canina da região da Lomba do Pinheiro, cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, a partir de casos autóctones humanos de leishmaniose tegumentar.** 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 576 p. 1999.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 75-79, 1999.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteróides from *Holarrhena curtisii*. **Journal Natural Products**, v. 61, p. 1332-1336, 1998.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 76, p. 131-138, 2000.

KENNEDY, M.L.; LLAMOS, G.G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BAZZOCCHI, I.L.; JIMÉNEZ, I.A. Terpenoids from *Maytenus* species and assessment of their reserval activity against a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 2291-2298, 2011.

LAINSON, R. Our presente knowledge of the ecology and control of Leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.18, n.1, p. 47-56, 1985.

LAINSON, R., SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press; 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, 273: 595-600, 1978.

LAWRENCE, M.J. Surfactant systems: microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, n. 3, p. 257-269, 1994.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; RONIGBERG, B.M.; LIEEDALE, G.F.; LEOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VÁVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the PROTOZOA. **Journal of Protozoology**, n. 27, p. 37-58, 1980.

LIMA, H.C. Fabaceae. In: Forzza, R.C. (org): **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v. 2, p. 989-1102, 2010.

LIPODOLVA, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nat Rev Gen**, n. 7, p. 294-305, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. Ed. Nova Odessa: Plantarum, 384p. 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudo multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHAES, A.V.; MORAES, M.A.P.; RAICK, A.N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J.M.L.; CUBA, C.C.; MARSDEN, P.D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis*, padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev. Inst. Trop. São Paulo**. v. 28, n. 4, p. 253-262, 1986.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D&Z Computação gráfica, Leitura & Arte, 2004.

MARGULIS-GOSMEN, K.; MAGDASSI, S. Organic nanoparticles from microemulsions: Formation and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p. 290-296, 2012.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F.; SCHUBACH, A.O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, p. 39-56. 2010.

MCCLEMENTS, D.J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729. 2012.

MESHNICK, S.R.; CERAMI, A. Host parasite interface: biochemistry. **Tropical and Geographic Medicine**, p. 119-124. 1984.

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807. 2011.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A.K. Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences**, v. 63, n. 20, p. 1823-1834, 1998.

MOTA, L.A.A.; MIRANDA, R.R. Dermatologic and otorhinolaryngologic manifestations in Leishmaniasis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 5, n. 3, p. 376-381. 2011.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Seminar**. v. 77, p. 366-1561, 2005.

NAGLE, A.S.; KHARE, S.; KUMAR, A.B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C.J.N.; CHENNAMENENI, N.K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F.S.; GELB, M.H.; MOLTENI, V. Recent developments in drug Discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11305-11347, 2014.

NAIFF-JUNIOR, R.D.; PINHEIRO, F.G.; NAIFF, M.F.; SOUZA, I.S.; CASTRO, L.M.; MENEZES, M.P.; FRANCO, A.M.R. Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**. v.38, n. 2, p. 103-114, 2009.

NAKAMURA, ES.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, J.F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. **Journal Ethnopharmacol**, V. 81, n. 1, p. 135-37. 2002.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VICTOR, R.W.A. 2016. **Parasitologia Humana**. 13. ed. São Paulo. Atheneu Rio, 264 p. 2016.

NEVES, L.O.; GADELHA, E.P.N.; GUERRA, J.A.O.; TALHARI, S.; TALHARI, A.C.; JUNIOR, R.M.S.; FERREIRA, L.C.L. Estudo clínico randomizado comparado antimoniato de meglumina, Pentamidina e Anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v. 86, n. 6, p. 1092-1101. 2011.

NICOLLE, G.L. Culture du parasite du Boutond'Orient. C.R. **Acad. Sci.**, v. 146, p. 842-843. 1908.

NOGUEIRA, F.M.; SOTTO, M.N.; CUCÉ, L.C. American tegumentarleishmaniasis: langerhans cells in Montenegro skin test. **Rev. Inst. Trop. S. Paulo**. V.50, n.5, p. 283-286, 2008.

NOVY, F.G.; MACNEAL, W.J. On the cultivation of *Trypanosomabrucei*. **J. Infect. Dis.** v. 1, p. 1-30. 1904.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.I.; KIDO, M.; KAKUMOTO, K.; IKEDA, S.; MATSUURA, N.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; LINUMA, M.; AKAO, Y. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Martius exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Lett**, v. 48, p. 8290-8292, 2007.

OKETCH-RABAH, H.A.; LEMMICH, E.; DOSSAJI, S.F.; THEANDER, T.G.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; KHARAZMI, A.; CHRISTENSEN, S.B. Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 458-461, 1997.

OKUR, N. S.; APAYDIN, S.; YAVASOGLU, N. U. K.; YAVASOGLU, A. H. Y. KARASULU, H. Y. Evaluation os skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 416, p. 136-144, 2011.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado. **Infarma**, v. 1, p. 73-79, 2001.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CERA, L. F. R. Microemulsões II: aplicações de liberação de fármacos. **Infarma**, v. 14, n. 7-8, p. 76-80, 2002.

OLIVEIRA, A.G. **Efeitos cinéticos e mecanismos de micelas e microemulsões nas reações de decomposição de a-aminofenil penicilinas e cefalosporinas**. 1997. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, A.N.; AMARAL, I.L.; RAMOS, M.B.P.; NOBRE, A.D.; COUTO, L.B. SAHDO, R.M. Composição e diversidade florístico-estrutural de um hectare de floresta densa de terra firme na Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 627-642, 2008.

OPAS – Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde – OMS. Informe Epidemiológico das Américas, n. 3, julho de 2015.

PAULA, C. C. **Investigação da presença de *Leishmania* em lesões cutâneas cicatrizadas e pele sadia de pacientes com leishmaniose tegumentar americana clinicamente curados.** Dissertação pelo Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010. 83 p.

PIGOTT, D.M.; GOLDING, N.; MESSINA, J.P.; BATTLE, K.E.; DUDA, K.A.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J.S.; FREIFELD, C.C.; MEKARU, S.R.; MADOFF, L.C.; GEORGE, D.B.; MYERS, M.F.; HAY, S.I. Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960-2012. **Scientific Data**, 1:140036, 2014.

PINHEIRO, F.G.; LUZ, S.L.B.; FRANCO, A.M.R. Infecção natural por tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) em *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) em áreas de leishmaniose tegumentar americana no Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 1, p. 165-172. 2008.

QUINTELLA, L. P. **Diagnósticos diferenciais histopatológicos das lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar americana.** Tese de Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010. 80 p.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RASOANAIVO, P.; WRIGHT, C. W.; WILLCOX, M. L.; GILBERT, B. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malária: synergy and positive interactions. *Malar J*, 10, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n.4, p. 550-555, 2003.

REDDY, M.; GILL, S.S.; KALKAR, S.R.; WU, W.; ANDERSON, P.J.; ROCHON, P.A. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases. **Clinicians's Corner**, v. 298, n. 16, p. 1911-1924, 2007.

REZENDE, J.M. **Gaspar Viannia, mártir da ciência de benfeitor da humanidade.** À sombra do plátano: crônicas de história da medicina. São Paulo: Editora Unifesp, p. 359-362, 2009.

RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, 2000.

ROBERTS, C.W.; MCLEOD, R.; RICE, D.W.; GINGER, M.; CHANCE, M.L.; GOAD, L.J. Fatty acid and sterol metabolism: potencial antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 129-142. 2003.

RODRIGUES, L. F. **Avaliação da atividade *in vivo* do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.** Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, 2012. 91 p.

RODRIGUEZ, S. S.; FIDALGO, L. M.; CANCIO, N. C.; ALVAREZ, A.M.M.; HERNANDEZ, Y. L.; DIOGO, N. M.; BOURZAC, J. F. I.; MARTIN, O. P.; MARCEL, A. M.; TREVIJANO, J. A. E. G.; PEREZ, M. A. C. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* in vitro and in vivo. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 166-173, 2015.

ROLIM, F.N.A. **Desenvolvimento de sistemas emulsionados contendo óleo de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*).** 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2016.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**. V. 2, p. 1261-1401, 1903.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol**, v. 2, p. 845-858, 2002.

SAMPAIO, F.C.; PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O.; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, M.A.R. *In vitro* antimicrobial of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal Ethnopharmacol**, v. 124, p. 289-294, 2009.

SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today**, 9: 255-258, 1993.

SCHULMAN, J.H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L.M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **Chemical Physics**, v. 63, p. 1677-1680, 1959.

SILVA J. A. et al. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1389-1393, 2009.

SILVA, L.C.N.; JÚNIOR, C.A.S.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrine*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpamoniliformis* fruits. **Food Chem. Toxicol.** V. 49, p. 2222-2228, 2011.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 20 Janeiro 2017.

SINTOV, A. C.; LEY, H. V.; BOTNER, S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v.148, p.168-176, 2010.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 173-183, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and Immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. **J. Comp. Path**, v. 130, p. 7-12. 2004.

SOUZA, L.A.G. **Leguminosas da Amazônia**. Jucá – *Caesalpinia ferrea* C. Mart. Manaus: Editora do INPA, 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. Nova Odessa: Plantarum. 2012.

SUBEDI, R.K.; OH, S.; CHUM, M.K.; CHOI, H.K. Recent advances in transdermal drug delivery. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 33, n. 3, p. 339-351, 2010.

SVIRSKIS, D.; SEYFODDIN, A.; CHALABI, S.; KIM, J.H.; LANGFORD, C.; PAINTER, S.; AL-KASSAS, R. Development of mucoadhesive floating hollow beads of acyclovir with gastroretentive properties. **Pharmaceutical Development and Technology**, p. 1-6, 2013.

TALHARI, S.; ARIAS, J.A.; CUNHA, M.G.S.; NAIFF, R.B.; NAIFF, M.F.; FREITAS, R.A.; BARRET, T. Leishmaniose no Estado do Amazonas – Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, n. 6, p. 433-438. 1998.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; TATH, S.; VILARINHO, A.; MORTARA, R.A.; DE ANDRADE, H.F. Targeting *Leishmania chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal Antimicrobiology Chemotherapy**, v. 54, p. 60-68, 2004.

TIRNAKSIZ, F.; KAYIS, A.; CELEBI, N.; ADISEN, E.; EREL, A. Preparation and evaluation of topical microemulsion system containing metronidazole for remission in rosacea. **Chemical Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 60, n. 5, p. 583-592, 2012.

TIWARY, A.K.; SAPRA, B.; JAIN, S. Innovations in transdermal drug delivery: formulations and techniques. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 1, n. 1, p. 23-36, 2007.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v.80, n.4, p.421-428, 2005.

VASCONCELOS, C.F.B.; MARANHÃO, H.M.L.; BATISTA, T.M.; CARNEIRO, E.M.; FERREIRA, F.; COSTA, J.; SOARES, L.A.L.; SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P.; WANDERLEY, A.G. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533-1541, 2011.

VEERAREDDY, P.R.; VOBALABOINA, V.; NAHID, A. Formulation and evaluation of oil-in-water emulsions of piperine in visceral leishmaniasis. **Pharmazie**, v. 59, p. 194-197, 2004.

VIANNA, G.O. **Anais do 7º Congresso de Medicina e Cirurgia**, p. 426-428. 1912.

WARING, M.J. The effects on antimicrobial agents on ribonucleic acid polymerase. **Molecular Pharmacology**, v. 1, p. 1-13, 1965.

WHO - World Health Organization - The world medicines situation 2011. **Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva. p. 434, 2011.

ZHU, W.; YU, A.; WANG, W.; DONG, R.; WU, J.; ZHAI, G. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 184-190, 2008.

ANEXOS



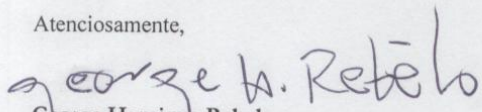
PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

RECOMENDAÇÃO FINAL

INDICAÇÃO: Aprovado

DATA DE LIBERAÇÃO DO PARECER: 10.09.2015

Atenciosamente,


George Henrique Rebelo
Presidente CEUA-INPA
PO n. 079/2015