



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA



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

**Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales:
Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea**

BRUNO BEZERRA JENSEN

Manaus/Amazonas

Outubro, 2020

BRUNO BEZERRA JENSEN

Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica, área de concentração em Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco, PhD

Co-orientadora: Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi, PhD

Manaus/Amazonas

Outubro, 2020

Ficha Catalográfica

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

J54a Jensen, Bruno Bezerra
Avaliação da fração diclorometano de *Leishmania ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea / Bruno Bezerra Jensen. 2020
148 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientadora: Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Ensaio in vitro. 2. Ensaio in vivo. 3. Tratamento alternativo. 4. Tecnologia farmacêutica. 5. Produtos naturais. I. Franco, Antonia Maria Ramos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

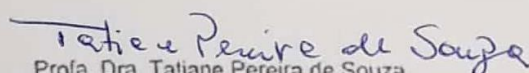
"Avaliação da fração diclorometano de *Leishmania ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea".

DISCENTE: BRUNO BEZERRA JENSEN

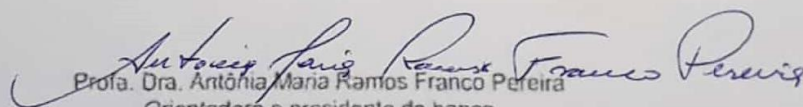
PARECER:

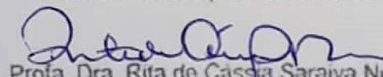
Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

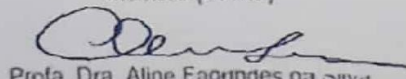
Manaus - AM, 02/10/2020.

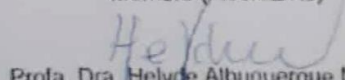

Prof. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Coordenadora do PPGIF

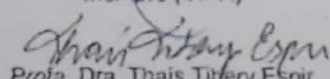
A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Prof. Dra. Antônia Maria Ramos Franco Pereira
Orientadora e presidente da banca


Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Membro (UFAM)


Prof. Dra. Aline Fagundes da Silva
Membro (Fiocruz/RJ)


Prof. Dra. Helyde Albuquerque Marinho
Membro (INPA)


Prof. Dra. Thais Tillery Espir
Membro (UFAM)

AGRADECIMENTOS

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

À minha família por toda base e incentivo. Especialmente, à minha mãe (Claudia Santos) e irmã (Aghata Jensen) por toda compreensão e apoio, que foram fundamentais durante esse período de pós-graduação;

À minha orientadora Antonia Franco pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa no Laboratório de Leishmaniose desde a Iniciação Científica, motivando-me durante esses quase nove anos e mostrando-se um exemplo de Pesquisadora, adepta aos princípios éticos e comprometida excepcionalmente com a Ciência;

À minha Co-orientadora Katia Solange, por todo o conhecimento repassado e discussões altamente valorosas quanto à área das formulações farmacêuticas (Sistema Microemulsionados), que foi primordial nesse estudo;

À Dr^a. Claudia Comandolli-Wyrepkowski, que desde a graduação me ensinou a amar a Ciência e sempre buscar respostas aos porquês científicos. Mostrando assim, a importância de um professor motivador na vida de um aluno e que o binômio Professor/Aluno, pode transcender para uma grade amizade;

À Dr^a Francimeire Pinheiro pela amizade e ajuda essencial em todos os momentos requisitados;

Aos meus alunos de Iniciação Científica: Caio Coutinho, Pamela Emily e Amanda Silva pelo auxílio na parte experimental e por ter me proporcionado a oportunidade de formar escola;

À amiga Erika Oliveira pela grande amizade e compartilhamento de momentos de aflição durante o período no Laboratório, muitas vezes precisando do apoio mútuo, para que pudéssemos alcançar essa etapa final. Estendendo esses agradecimentos aos colegas Paula e Sávio;

Ao Professor Dr. Fernando Marques pela grande amizade e auxílio na análise histopatológica, por meio da nossa parceria consolidada desde 2015;

À Dra. Maria da Paz Lima por ter me recebido em seu Laboratório de Produtos Naturais do INPA e colaborado muitíssimo com as orientações na área de química de produtos naturais. Assim, como aos colegas de Laboratório, Henrique, Jeniffer, Jéssica, Paulo e Priscila;

À Professora Dr^a. Tatiane Pereira e ao Doutorando Fabrício Rolim por me acompanharem e permitido o uso dos equipamentos para caracterização da microemulsão;

Ao Dr. Felipe Moura por todo auxílio com os equipamentos e as análises de Cromatografia Líquida de alta eficiência;

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

À Dra. Maricleide Naiff pelas sábias palavras proferidas em momentos difíceis.

Aos técnicos Ana Cleide, Lourival Maciel, Magno Muniz e Rose Campos pelo auxílio durante as etapas experimentais;

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, por todo apoio e acessibilidade nos momentos precisos;

Aos professores do Programa de Pós-graduação que me instigaram a buscar cada vez mais conhecimento e desenvolver projetos inovadores;

Ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica por ter consolidado o meu conhecimento nessa área de desenvolvimento de medicamentos alternativos para as Doenças Negligenciadas;

À Banca Examinadora por terem aceitado o convite de participar da defesa desta Tese;

À FAPEAM pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho;

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

“ Palavras são, na minha nada humilde opinião,
nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de formar
grandes sofrimentos e também de remediá-los. ”

(Alvo Dumbledore)

JENSEN, Bruno Bezerra. **Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea.** 2020. 148 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

RESUMO

Dentre as doenças tropicais negligenciadas, a Leishmaniose tegumentar é uma das que merecem mais atenção, por ocorrer em mais de 88 países, com cerca de 20 mil novos casos por ano no mundo. A aplicação e indicação terapêutica descrita pelo Ministério da Saúde muitas vezes pode não refletir uma realidade regional, dificuldades são observadas desde a via de administração invasiva e as inúmeras reações adversas, contribuindo assim, para a baixa adesão ao tratamento. Logo, a busca por alternativas terapêuticas é necessária, sendo que uma delas é a fonte natural das plantas medicinais, que são utilizadas desde o primórdio da humanidade com finalidade de combater diferentes enfermidades. Dentre as diversas espécies vegetais com potencial farmacológico, uma delas é a *Libidibia ferrea*, popularmente conhecida como jucá, com comprovadas atividades biológicas, inclusive antileishmania. Suas frações ativas podem ser incorporadas ao sistema microemulsionado para aumentar eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea (LC). Este é considerado um ótimo veículo de transporte de diferentes classes medicamentosas, por sua estabilidade, controle na distribuição de fármacos e ser bastante permeável, inclusive possibilitando a sua administração pela via tópica. Desse modo, o objetivo desse trabalho é desenvolver microemulsões contendo a fração Diclorometano (DCM) de *L. ferrea* e avaliar o seu efeito em hamsters infectados com *L. amazonensis*, além de estudar a sua composição química e testar a atividade antileishmania *in vitro* e citotoxicidade das substâncias isoladas, contribuindo para um tratamento mais eficiente da LC, com efeitos indesejados reduzidos e administração indolor. A fração DCM foi obtida a partir do fracionamento do extrato metanólico de *L. ferrea*. Cerca de 300 mg (Concentração final da Fração DCM na microemulsão) foram incorporados à microemulsão, que foi submetida à caracterização físico-química pelo diâmetro médio das gotículas, índice de polidispersividade, potencial zeta, índice de refração e pH, antes da aplicação nos animais. Após os 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e fragmentos das lesões foram coletadas para determinar a carga parasitária e aspecto histopatológico. Outra parte da fração obtida foi submetida a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o isolamento e a identificação das substâncias foi feita por análises de Ressonância Magnética Nuclear. As amostras de frações e substâncias isoladas foram avaliadas para atividade antileishmania contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e o perfil citotóxico em macrófagos de linhagem J774 e peritoneais. Os resultados obtidos indicaram que a microemulsão manteve-se estável e promissora no tratamento da LC em modelo animal, não havendo diferença estatística entre os grupos tratados com a microemulsão e o medicamento padrão (Glucantime®). Da fração Diclorometano foram isoladas três substâncias, sendo identificados o metil-galato e um derivado do ácido fenilpropanoico. As substâncias mostraram atividade antileishmania contra as formas promastigotas (entre 71,5 à 17,4 µg.mL⁻¹ no período de 72h) e sem perfil citotóxico. Portanto, esses resultados permitiram identificar as substâncias majoritárias, que inclusive mostram-se ativas e ao utilizar a fração DCM de *L. ferrea* incorporada na microemulsão, devido a possível ação sinérgica, mostrou efetividade no tratamento tópico, indicando uma nova proposta para o protocolo terapêutico, de forma complementar à farmacoterapia padrão da LC.

Palavras-chave: Ensaio *in vitro*; Ensaio *in vivo*; Tratamento alternativo; Tecnologia farmacêutica; Produtos naturais.

JENSEN, Bruno Bezerra. **Evaluation of the dichloromethane fraction of *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae) in studies of cutaneous leishmaniasis.** 2020. 148 f. Thesis (Doutorate in Pharmaceutical Innovation) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2020.

ABSTRACT

Among neglected tropical diseases, cutaneous Leishmaniasis is one that deserves more attention, as it occurs in more than 88 countries, with about 20 thousand new cases per year in the world. The application and therapeutic indication described by the Ministry of Health can often not reflect a regional reality, difficulties are observed from the invasive route of administration and the numerous adverse reactions, thus contributing to low adherence to treatment. Therefore, the search for therapeutic alternatives is necessary, one of which is the natural source of medicinal plants, which have been used since the dawn of humanity in order to combat different diseases. Among the several plant species with pharmacological potential, one of them is *Libidibia ferrea*, popularly known as jucá, with proven biological activities, including antileishmania. Its active fractions can be incorporated into the microemulsified system to increase efficacy in the treatment of cutaneous leishmaniasis (LC). This is considered an excellent vehicle for transporting different drug classes, due to its stability, control in the distribution of drugs and being very permeable, even allowing its administration by topical route. Thus, the objective of this work is to develop microemulsions containing the Dichloromethane (DCM) fraction of *L. ferrea* and evaluate its effect on hamsters infected with *L. amazonensis*, in addition to studying its chemical composition and testing the antileishmania activity in vitro and cytotoxicity of isolated substances, contributing to a more efficient treatment of LC, with reduced unwanted effects and painless administration. The DCM fraction was obtained from the fractionation of the methanolic extract of *L. ferrea*. Approximately 300 mg (Final concentration of the DCM fraction in the microemulsion) was incorporated into the microemulsion, which was subjected to physico-chemical characterization by the average droplet diameter, polydispersity index, zeta potential, refractive index and pH, before application to animals. After 30 days of treatment, the animals were euthanized and fragments of the lesions were collected to determine the parasitic burden and histopathological aspect. Another part of the obtained fraction was subjected to High Efficiency Liquid Chromatography for the isolation and the identification of the substances was done by Nuclear Magnetic Resonance analyzes. The samples of fractions and isolated substances were evaluated for antileishmania activity against the promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* and the cytotoxic profile in macrophages of lineage J774 and peritoneal. The results obtained indicated that the microemulsion remained stable and promising in the treatment of LC in an animal model, with no statistical difference between the groups treated with the microemulsion and the standard medication (Glucantime®). From the Dichloromethane fraction, three substances were isolated, with methyl gallate and a derivative of phenylpropanoic acid being identified. The substances showed antileishmania activity against promastigote forms (between 71.5 to 17.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the 72h period) and without a cytotoxic profile. Therefore, these results allowed the identification of the major substances, which even show themselves to be active and when using the DCM fraction of *L. ferrea* incorporated in the microemulsion, due to possible synergistic action, showed effectiveness in the topical treatment, indicating a new proposal for the therapeutic protocol, complementary to standard LC pharmacotherapy.

Keywords: *In vitro* assay; *In vivo* testing; Alternative treatment; Pharmaceutical technology; Natural products.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Ilustração da progressão do portfólio de doenças com abordagem dinâmica de P&D.....	20
Figura 2. Formas promastigota (a) e amastigota (b) de <i>Leishmania</i> sp.	21
Figura 3. Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> sp.....	22
Figura 4. Formas Clínicas das lesões de Leishmaniose. (a) Lesão cutânea. (b) Lesão mucosa. (c) Lesão cutânea difusa.....	24
Figura 5. Incidência mundial da Leishmaniose cutânea no ano de 2018.	25
Figura 6. Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por ano confirmado, entre os anos de 2013 a 2018, nos estados da Região Norte.....	27
Figura 7. Estrutura química dos fármacos empregados no tratamento da Leishmaniose cutânea.	31
Figura 8. Estrutura química da apigenina.....	38
Figura 9. <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz. (A) Frutificação da Espécie vegetal; (B) Fruto maduro; (C) Fruto triturado e sementes removidas..	40
Figura 10. Gotículas de microemulsão e nanoemulsão..	47

METODOLOGIA GERAL

Figura 11. Fluxograma da trajetória metodológica do estudo.....	54
Figura 12. Fluxograma geral da preparação dos extratos obtidos de epicarpo de <i>Libidibia ferrea</i>	55
Figura 13. Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico de epicarpo da <i>Libidibia ferrea</i>	56

CAPÍTULO I

Figure 1. Macroscopic clinical aspect of skin lesions in *Mesocricetus auratus* infected with *Leishmania amazonensis* from the initial period to the end of treatment. **MFDCM** – Topical treatment with microemulsion incorporated with the DCM fraction from *Libidibia ferrea*. **MPLA** – Topical treatment with placebo microemulsion. **LGIM** – Intramuscular treatment with Glucantime®. **LGIL** – Intralesional treatment with

Glucantime®. **LST** – Negative control, absence of treatment. **SLST** – animals without infection.....66

Figure 2. Clinical evolution of the volume of the lesions in *Mesocricetus auratus* infected on the snout with *Leishmania amazonensis*, during localized treatment.

MFDCM – Topical treatment with microemulsion incorporated with the DCM fraction from *Libidibia ferrea*. **MPLA** – Topical treatment with placebo microemulsion. **LGIM** – Intramuscular treatment with Glucantime®. **LGIL** – Intralesional treatment with Glucantime®. **LST** – Negative control, absence of treatment. **SLST** – animals without infection.....67

Figure 3. Photomicrography of the skin of the snout of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania amazonensis* showing inflammatory infiltrate in the tissue by acute and chronic nonspecific inflammatory cells (H&E 100x). A) animal treated with microemulsion with an active fraction of *Libidibia ferrea* (MFDCM) 50 mg.day⁻¹ with topical application; B) animal treated with microemulsion placebo (MPLA) with topical application; C) animal treated with Glucantime® 20 mg (Sb⁺⁵).Kg.day⁻¹ intralesional application (LGIL); D) animal treated with Glucantime® 20 mg (Sb⁺⁵).Kg.day⁻¹ intramuscular application (LGIM); E) treatment-free negative control (LST); F) infection-free control (SLST).....68

Figure 4. Score of viable parasites visualized in NNN culture medium (Novy-McNeal-Nicolle) seven days after sowing fragments of the lesions of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania amazonensis* from the experimental groups. Score as follows: 0 = absence; 1 = 1 to 10 parasites/field; 2 = 10 to 100 parasites/field and 3 = >100 parasites/field.....69

Figure 5. Indices of the relative abundance of amastigotes and the percentage of infected macrophages (parasitic load) visualized and quantified by optical microscopy (1000x) in the imprint smears of tissues on slides from the lesions of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania amazonensis*.....70

CAPÍTULO II

Figura 1. Cromatograma obtido por HPLC/Semi-preparativa para amostra Fração diclorometano (FDCM) do extrato metanólico de *Libidibia ferrea*.....88

Figura 2. Estrutura química do Metil-galato (LFD-1).....87

Figura 3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Metil-galato (LFD-1).	90
Figura 4. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Metil-galato (LFD-1).	91
Figura 5. Mapa de correlações de HSQC editado do Metil-galato (LFD-1).	92
Figura 6. Mapa de correlações de HMBC do Metil-galato (LFD-1).	93
Figura 7. Estrutura química do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).	93
Figura 8. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).	96
Figura 9. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).	97
Figura 10. Mapa de correlações de HSQC editado do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).	98
Figura 11. Mapa de correlações de HMBC do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).	99
Figura 12. Atividade antileishmania das amostras de <i>Libidibia ferrea</i> frente a promastigotas <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> (MHO/BR/2009/IM5584). ..	101
Figura 13. Atividade citotóxica das amostras testadas em macrófagos de linhagem J774 incubados a 37°C por até 72 horas, avaliados pela viabilidade celular.	104
Figura 14. Atividade citotóxica da fração DCM e substâncias isoladas em macrófagos de cultivo primário (murino) incubados a 37 °C por 72 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica Alamar Blue®.	105
Figura 15. Atividade das Subfrações frente a formas amastigotas (<i>Leishmania amazonensis</i>) interiorizadas em macrófagos de cultivo primário (murino).	106
Figura 16. Efeito da atividade das subfrações de <i>Libidibia ferrea</i> contra amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em macrófagos de cultivo primário (murinos). ..	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies do gênero <i>Leishmania</i> responsáveis pela Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.	23
Tabela 2 – Notificações de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana entre os anos de 2013 a 2018, nas regiões do Brasil.	26
Tabela 3 – Relação da eficácia e custo dos medicamentos padrões para a Leishmaniose Tegumentar.	35
Tabela 4 – Classificação taxonômica da <i>Libidibia ferrea</i>	39
Tabela 5 – Relação das substâncias isoladas das partes vegetais da <i>Libidibia ferrea</i> (Ca – Casca; Fr – Fruto; Fo – Folha; Ga – Galhos; Se – Sementes).	42
Tabela 6 – Escala de Granulometria das Emulsões.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP** – Adenosina Difosfato
- AM** – Antimoniato de Meglumina
- ANOVA** – Análise de Variância
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- CEUA** – Comitê de Ética e Experimentação Animal
- CI₅₀** – Concentração Inibitória para 50%
- DCs** – Células dendríticas
- DCM** - Diclorometano
- DNDi** – Drugs for Neglected Diseases initiative
- DTNs** – Doenças Tropicais Negligenciadas
- FDCM** – Fração Diclorometano
- GTP** – Guanina Trifosfato
- IL** – intralesional
- IM** – intramuscular
- L. amazonensis*** – *Leishmania amazonensis*
- L. ferrea*** – *Leishmania ferrea*
- L. guyanensis*** – *Leishmania guyanensis*
- 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
- OPAS** – Organização Pan-Americana da Saúde
- RPMI 1640** – Roswell Park Memorial Institute medium 1640
- SBF** – Soro Fetal Bovino
- Sb^{III}** – Antimônio Trivalente
- Sb^V** – Antimônio Pentavalente
- SFM** – Sistema Fagocítico Mononuclear
- SINAN** – Sistema de Informação de Agravos e Notificações
- WHO** – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 LEISHMANIOSES: UMA DOENÇA TROPICAL NEGLIGENCIADA	19
2.1.1 O gênero <i>Leishmania</i>	21
2.1.2 Ciclo Biológico da <i>Leishmania sp</i>	22
2.1.3 Aspecto Clínico da Leishmaniose Tegumentar	23
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	24
2.2.2 Epidemiologia Mundial.....	24
2.2.3 Epidemiologia no Brasil	25
2.2.4 Epidemiologia no Amazonas	27
2.3 DIAGNÓSTICO	28
2.4 TRATAMENTO CONVENCIONAL.....	30
2.5 TRATAMENTO ALTERNATIVO: COMBINAÇÃO FARMACOTERAPÊUTICA	35
2.6 TRATAMENTO ALTERNATIVO: PRODUTOS NATURAIS	37
2.7 <i>Libidibia ferrea</i> COMO POTENCIAL TERAPÊUTICO.....	38
2.8 NANOMEDICINA: SISTEMA MICROEMULSIONADO	46
3. OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	51
4. METODOLOGIA GERAL	53
4.1 INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS NO PROJETO.....	53
4.2 DIVISÃO DAS ETAPAS DA TESE.....	53
4.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL DE <i>Libidibia ferrea</i>	54
4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>Libidibia ferrea</i>	55
4.5 PARTIÇÃO DO EXTRATO	56
4.6 CURVA DE CRESCIMENTO DE FORMAS DE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>	56
4.7 MEDICAMENTOS UTILIZADOS COMO CONTROLES <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	57
4.7.1 Padrões de ensaios <i>in vitro</i>	57
4.7.2 Padrões de ensaios <i>in vivo</i>	57

4.8 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS	57
5. CAPÍTULO 1	59
6. CAPÍTULO 2	79
7. DISCUSSÃO GERAL.....	113
8. CONCLUSÃO GERAL.....	116
9. PERSPECTIVAS.....	117
REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS	142

1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose tegumentar (LT) é classificada como uma doença tropical negligenciada, ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial por meio do repasto sanguíneo do inseto flebótomo fêmea (BRASIL, 2017; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). O quadro clínico pode ser determinado pela espécie infectante, conforme a relação do parasito com seu hospedeiro, que pode resultar em formas mais brandas da doença, como a forma cutânea localizada, à mais graves, como mucocutânea ou difusa (MOTA; MIRANDA, 2011; SCOTT; NOVAIS, 2016; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Essa doença apresenta registro em mais de 88 países, presente nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania), com uma incidência estimada em até 1,2 milhões de casos por ano, tornando-se assim um problema de saúde pública (ALVAR *et al.*, 2012). Em 2018, cerca de 192 mil casos de leishmaniose cutânea foram reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), número este distribuído em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Iraque, Paquistão e República Árabe da Síria (WHO, 2020). Só o Brasil, no período de 2008 a 2018, ocorreram mais de 230 mil casos de LT, predominantemente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (COSTA, 2005; SINAN/SVS/MS, 2019).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) compõem o protocolo terapêutico há mais de meio século como primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, logo após substituir a forma mais tóxica, o tártaro emético (CARVALHO *et al.*, 2019). Segundo o Ministério da Saúde, deve-se considerar a espécie da *Leishmania* infectante e a situação epidemiológica, recomendando assim, para os pacientes infectados por *L. braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*, o antimoniato de meglumina pelas vias parenterais (Endovenoso/EV ou intramuscular/IM), com o ciclo de 20 dias consecutivos de aplicação. Nos casos de pacientes oriundos de áreas onde há predomínio de *L. guyanensis* a primeira escolha para o tratamento é o isetionato de pentamidina EV ou IM, de três a dez doses (BRASIL, 2017).

Contudo, estas farmacoterapias apresentam uma série de problemas, como a via de administração invasiva, longo tempo de aplicação e manifestação de efeitos adversos, que contribuem para o abandono do tratamento e induzindo a resistência do parasito e reduzindo a eficácia do tratamento. As reações mais comuns variam de

graus leves à grave, como, mialgia, vômitos, hipotensão, cardiotoxicidade, insuficiência renal aguda e nefrotoxicidade (BRASIL, 2017; FERREIRA; MAROCHIO; CARVALHO, 2012).

A escassez de um tratamento mais acessível tem exigido o desenvolvimento de novos medicamentos mais eficazes, seguros e disponíveis aos doentes em qualquer região, e uma dessas alternativas é o uso das plantas medicinais, recurso este, acompanhando a humanidade desde os primórdios, devido a presença de metabólitos secundários em abundância, que podem ser utilizados para fins terapêuticos (HARDY *et al.*, 2012; MISHRA; TIWARI, 2011).

A OMS vem considerando como prioridade a busca de novos fármacos através 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, sendo plantas na grande maioria (CALIXTO *et al.*, 2001; WHO, 2011). Nas últimas décadas, cerca de 69% dos novos fármacos para o tratamento de doenças infecciosas são derivados ou baseados em produtos naturais (NAGLE *et al.*, 2014).

Neste contexto, uma espécie vegetal de grande interesse terapêutico é a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea*, árvore nativa no Brasil, conhecida popularmente como Jucá ou Pau-ferro, que apresenta ampla distribuição e propriedades econômicas e também farmacológicas (FERREIRA; SOARES, 2015; SOUZA, 2007). Estudos de atividades biológicas e farmacológicas de extratos obtidos de *L. ferrea* tem demonstrado potencial anti-inflamatório (FALCÃO *et al.*, 2019), antimicrobiano, antifúngico, antiviral (LOPES *et al.*, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2009), hipoglicemiante (VASCONCELOS *et al.*, 2011), antitumoral (FREITAS *et al.*, 2012), cicatrizante e antioxidante (CARVALHO *et al.*, 2016; NAWWAR *et al.*, 2015). Já os estudos químicos com esta espécie têm demonstrado a presença de compostos fenólicos com possíveis aplicações farmacológicas, como as chalconas e os polifenóis (ARAÚJO *et al.*, 2014; NAKAMURA *et al.*, 2002; NOZAKI *et al.*, 2007).

Outro efeito terapêutico já comprovado dessa planta é a atividade antileishmania, detectada pelos estudos preliminares de Comandolli-Wyrepkowski (2015), por meio de testes biológicos *in vitro* com extrato metanólico e, posteriormente, com frações hexânica, diclorometânica, n-butanólica e com acetato de etila da *L. ferrea*, onde a fração DCM mostrou melhor resultado contra as espécies *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Sendo avaliado em seguida, o efeito de uma

formulação tópica com essa fração mais promissora, resultando no controle das lesões de animais infectados com *L. amazonensis*.

Esses resultados corroboram para a escolha da via de administração transdérmica para o tratamento da leishmaniose cutânea (LC), por oferecerem vantagens em relação as vias parenteral e enteral, devido a via cutânea melhorar a adesão do paciente à farmacoterapia, por não ser invasiva, não apresentar metabolismo de primeira passagem e pode possibilitar a liberação do fármaco por um período mais prolongado (GALLO, 1989; SUBEDI *et al.*, 2010; TRAN, 2013).

A aplicação da nanotecnologia, com a finalidade de liberação modificada de princípios ativos, está sendo cada vez mais adotada nas últimas décadas, principalmente pela possibilidade de desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas com tecnologia em escala nanométrica, facilitando assim a penetração e potencializando o efeito (RAGELLE *et al.*, 2017). Uma das possíveis formulações é a microemulsão, um sistema nanoestruturado inovador para o âmbito farmacológico, e que é considerada uma alternativa para diferentes classes terapêuticas, como, anti-inflamatórios não estereoidais, anestésicos, antimicrobianos, antivirais e até para derivados de plantas medicinais (FIGUEIREDO *et al.*, 2013; LAWRENCE; REES, 2012; SAHU *et al.*, 2015; TIRNAKSIZ *et al.*, 2012).

Desse modo, o presente projeto tem por objetivo desenvolver um tratamento alternativo experimental para a LC, caracterizando microemulsões contendo a fração DCM de *L. ferrea*, avaliando-as por meio da aplicação via transdérmica em hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. amazonensis* e de aprofundar o conhecimento das estruturas químicas dessa fração, testando-as isoladamente em ensaios *in vitro* com a espécie *L. amazonensis* e averiguar a sua citotoxicidade. Com a finalidade de elaborar uma formulação fitoterápica com a proposta de sua inclusão no protocolo terapêutico da leishmaniose cutânea.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSES: UMA DOENÇA TROPICAL NEGLIGENCIADA

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças que afetam principalmente a população de países tropicais e de baixa a média renda (WHO, 2010). As áreas predominantes dessas doenças estão entre países da África, Ásia, América Latina e Oceania (HERRICKS *et al.*, 2017). Cerca de um bilhão de pessoas são atingidas por pelo menos uma das DTNs distribuídas pelo mundo, e os desastres naturais e situações conflituosas podem contribuir para que elas perpetuem (OMS, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), considera as DTNs um problema de saúde pública a nível mundial. No mundo pelo menos 18 enfermidades são consideradas negligenciadas, classificadas em: infecções por protozoários (Leishmanioses - Tegumentar e Visceral - , Doença de Chagas e Doença do Sono - Tripanossomíase humana africana), infecções bacterianas (Hanseníase, Tracoma, Úlcera de Buruli, Treponematoses endêmicas e Cólera), infecções por helmintos (Helmintíase transmitida pelo solo, Esquistossomose, Oncocercose, Filariose Linfática, Trematodeos de origem alimentar, Equinococose, Dracunculose e Cisticercose) e infecções virais, como Dengue e Raiva (OMS, 2007).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma das DTNs de grande relevância devido ao grande número de pessoas infectadas e complexidade dos níveis da 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* (BRASIL, 2017; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Essa doença ganha destaque no *ranking* das enfermidades que se caracterizam como problema de saúde pública, principalmente por acometer em torno de 12 milhões de pessoas distribuídos nos cinco continentes, muitas vezes encontram-se no estado de extrema pobreza, caracterizando-as no grupo de alta vulnerabilidade. Outro fator primordial é o recebimento de reduzidos investimentos para o desenvolvimento de pesquisas afins, o que acaba por não despertar o interesse da Indústria farmacêutica para fins lucrativos (ALVAR *et al.*, 2012; BRASIL, 2017; CASTRO, 2012; REDDY *et al.*, 2007).

Os números referentes à pesquisa e desenvolvimento (P&D) de drogas destinadas ao tratamento das DTNs, no período de 1975 e 1999, mostram que somente 13 novas drogas foram aprovadas, o que representa cerca de 0,9% dos medicamentos aprovados naquela época, reflexo do descaso da Indústria Farmacêutica (PECOUL; TROUILLER; PINEL, 1999).

De acordo com estudos realizados pelo Instituto George para a Saúde Internacional, cerca de 9% dos recursos destinados para P&D na área de doenças negligenciadas são procedentes de instituições privadas, como as Indústrias Farmacêuticas. A maior parte do investimento para essa área advém de instituições públicas (70%) e filantrópicas (21%) [POKHREL *et al.*, 2011].

Esse cenário começou a mudar a partir de 2003, com a criação da iniciativa Medicamentosa para Doenças Negligenciadas (DNDi), com enfoque nas necessidades específicas de P&D. Em 2014, foi desenvolvido o plano de negócios para o período de 2015 a 2023, apontando o objetivo principal no desenvolvimento de medicamentos para doenças negligenciadas, e as Leishmanioses ganham destaque no portfólio estratégico [Figura 1] (DNDi, 2015).

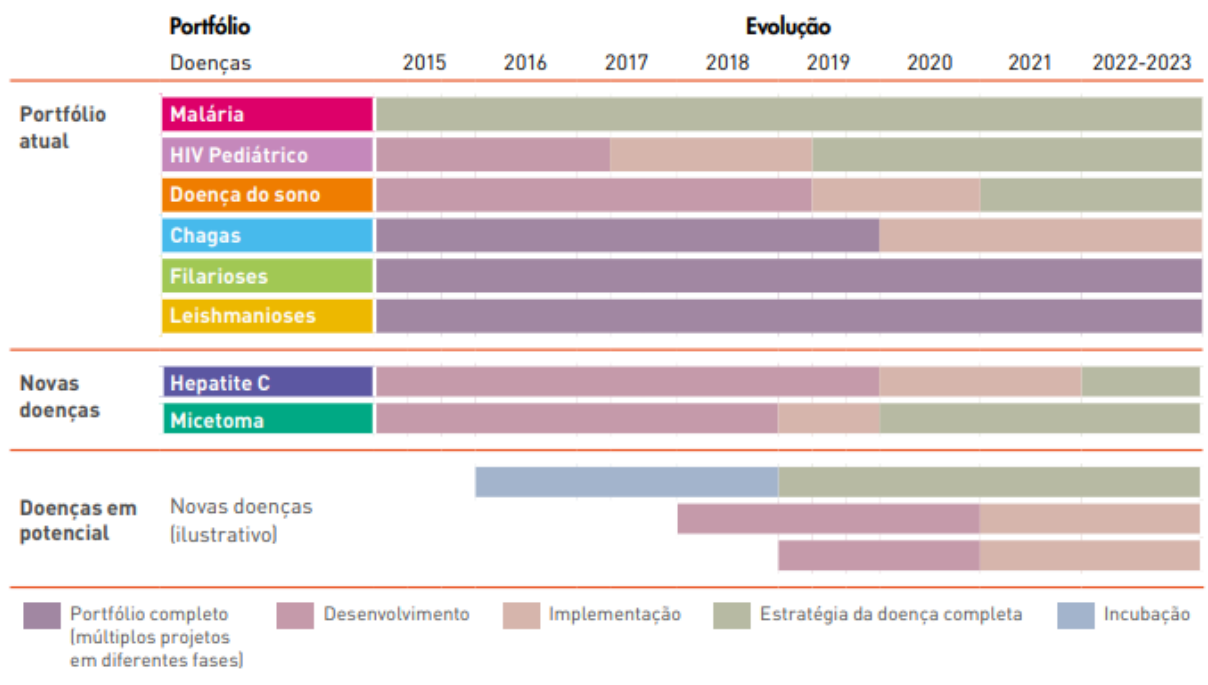


Figura 1. Ilustração da progressão do portfólio de doenças com abordagem dinâmica de P&D.

(Fonte: DNDi 2015).

2.1.1 O gênero *Leishmania*

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). Segundo Lainson (2010), este protozoário apresenta a seguinte posição sistemática:

Reino: **Protozoa**, 1818

Filo: **Euglenozoa** Cavalier-Smith, 1998

Classe: **Cinetoplastia** Honigberg, 1963

Ordem: **Trypanosomatida** Kent, 1880

Família: **Trypanosomatidae** Doflein, 1901

Gênero: ***Leishmania*** Ross, 1903

Subgênero: ***Leishmania*** Ross, 1903

Subgênero: ***Viannia*** Lainson & Shaw, 1987

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 ovalada (ausente de flagelo livre) intereozizada nas células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados [Figura 2] (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; LAINSON, 1985).

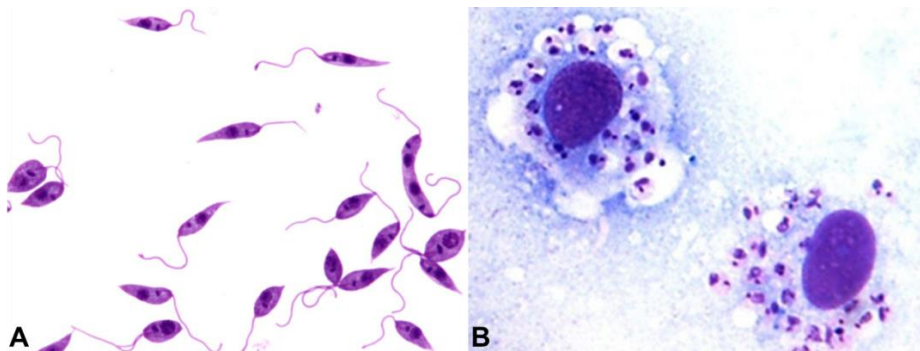


Figura 2. Formas promastigota (a) e amastigota (b) de *Leishmania* sp.

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

2.1.2 Ciclo Biológico da *Leishmania* sp

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 (RITTIG; BOGDAN, 2000; SCHLEIN, 1993).

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, os flebótomos fêmeas 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 3] (LAINSON; SHAW, 1978; LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

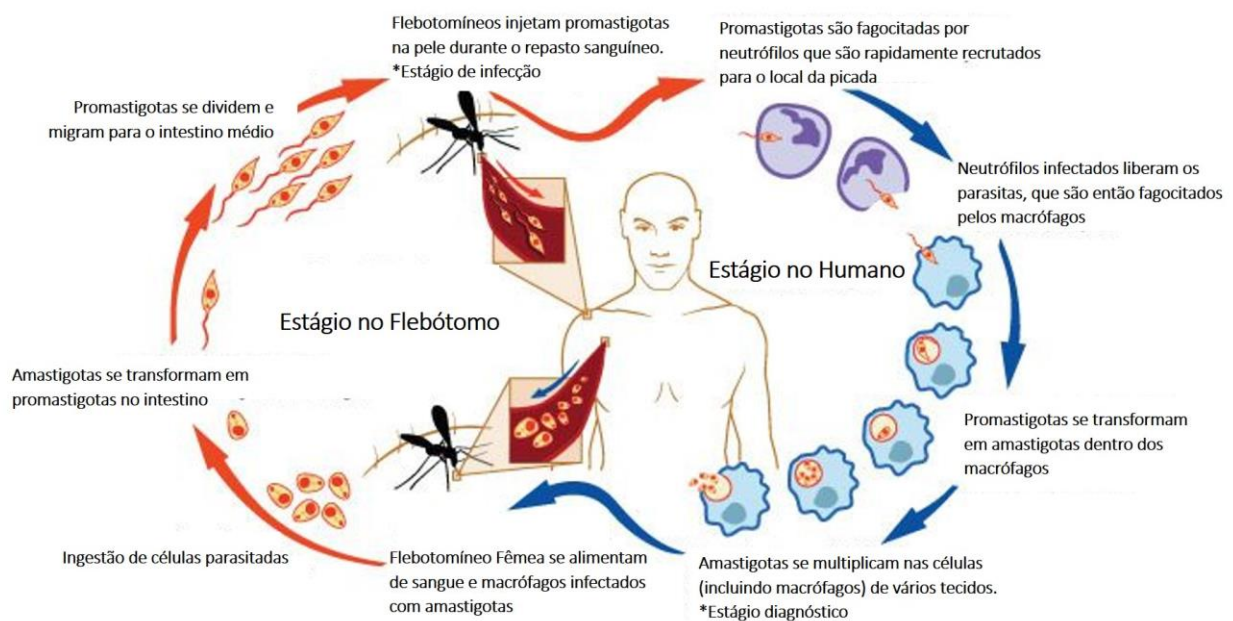


Figura 3. Ciclo de vida do parasita *Leishmania* sp. Fonte: Modificado Pinterest.

2.1.3 Aspecto Clínico da Leishmaniose Tegumentar

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 1] (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; VALE; FURTADO, 2005).

Tabela 1 – 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).

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 (LMC) 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 4] (MOTA; MIRANDA, 2011; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LC é a forma mais comum em pacientes acometidos e também a mais branda entre os tipos de Leishmaniose tegumentar. Ela é caracterizada por lesões com bordas elevadas, definidas, arredondadas e tecido interno granuloso, geralmente indolor. Normalmente, essas lesões aparecem em regiões mais expostas do corpo, como membros inferiores, membros superiores e face, levando em consideração que

são locais mais fáceis para a picada do flebotômíneo. Essa forma clínica pode desencadear uma cura espontânea, deixando cicatrizes atróficas (BRASIL, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2016).



Figura 4. Formas Clínicas das lesões de Leishmaniose. (a) Lesão cutânea. (b) Lesão mucosa. (c) Lesão cutânea difusa. Fonte: CARVALHO, 2002; PINHEIRO, 2006.

A espécie *Leishmania braziliensis* é a principal responsável por manifestar a forma clínica LMC. As lesões são caracterizadas pela destruição do tecido, envolvendo mucosas e cartilagens, podendo atingir laringe e faringe (AMATO *et al.*, 2009). Logo, é considerada a forma mais grave da doença, podendo figurar entre 5 a 20% das manifestações tegumentares, principalmente no Novo Mundo (EKIZ *et al.*, 2017).

Já a manifestação clínica LCD é rara, mas classifica-se como grave. Os pacientes apresentam nódulos não ulcerados espalhados pelo corpo. A proliferação das lesões ocorre lentamente, cobrindo quase todo o corpo do paciente, com exceção das axilas, couro cabeludo, prega inguinal, palmas das mãos e solas dos pés. A evolução clínica da LCD está relacionada ao comprometimento do sistema imunológico do indivíduo (COSTA *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-FIGUEROA *et al.*, 2016).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

2.2.2 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 (ALVAR *et al.*, 2012; JESUS, 2006; LAINSON;

SHAW, 1987). Em 2018, cerca de 192.173 dos 244.005 casos de Leishmaniose cutânea foram reportados pela OMS, onde a maioria deles ocorreram em sete países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Iraque, Paquistão e República Árabe da Síria (WHO, 2020).

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 (OPAS, 2015). Quanto aos dados de Leishmaniose cutânea de forma isolada, em 2018 a OMS registrou mais de 20 mil casos incidentes no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão [Figura 5] (WHO, 2020).

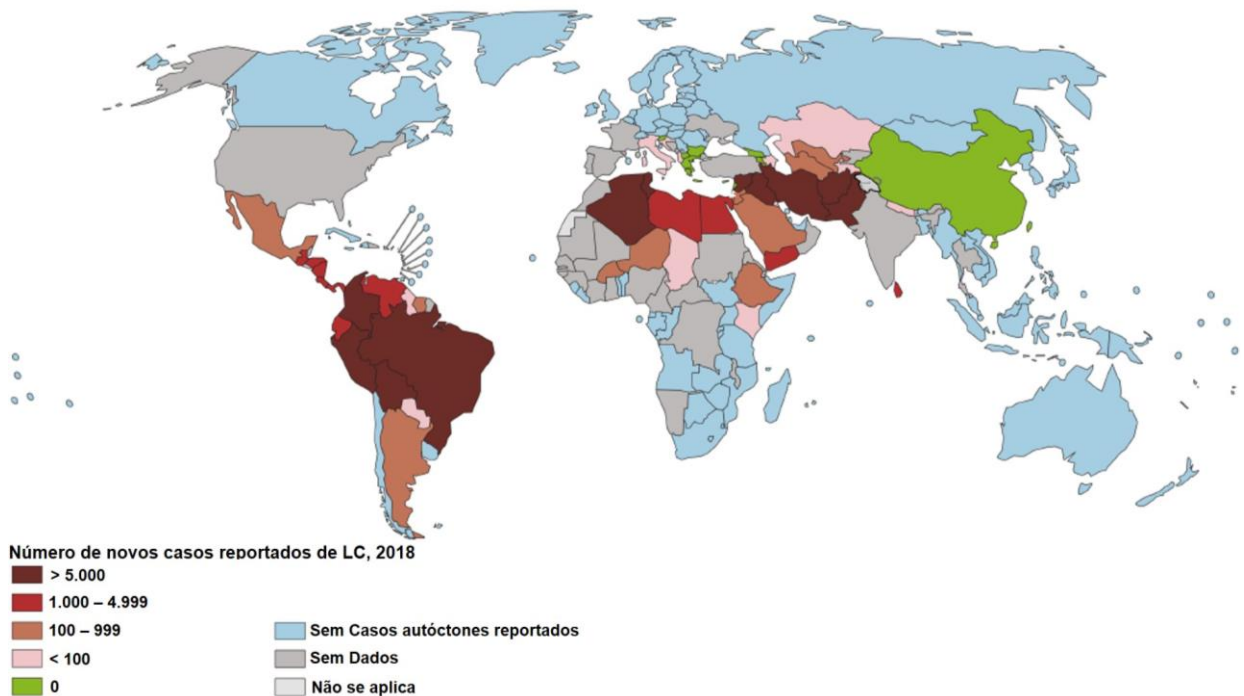


Figura 5. Incidência mundial da Leishmaniose cutânea no ano de 2018.

Fonte: OMS, 2020. https://www.who.int/leishmaniasis/burden/GHO_CL_2018.pdf?ua=1. Acesso em 30/03/2020.

2.2.3 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 2008 a 2018 ocorreram 230.794 casos no país, 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, 2017; NEGRÃO; FERREIRA, 2014; SINAN/SVS/MS, 2019). Essa endemia representa grave problema da saúde pública e destaca-se em três regiões no Brasil, região Norte, Centro-Oeste e Nordeste (COSTA, 2005).

No período de 2013 a 2018 a LTA apresentou uma média anual de 18.937 casos novos no país, com o coeficiente de detecção de 8,6 casos por 100.000 habitantes em 2018 (SINAN/SVS/MS, 2019). As regiões com maior número de casos novos são a região Norte e Nordeste, apresentando 8.515 e 4.415 respectivamente, em 2018. Além dessas regiões, o Centro-Oeste e Sudeste também merecem destaque, conforme apresentado na Tabela 2. A interação do homem com o meio ambiente é muitas vezes determinante na rede de causalidades múltipla dessa doença (GRIMALDI *et al.*, 1989).

Tabela 2 – Notificações de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana entre os anos de 2013 a 2018, nas regiões do Brasil.

Região/Ano	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
TOTAL	19.753	22.031	20.975	13.948	18.963	17.950	113.620
Região Norte	9.101	11.194	9.653	5.870	8.835	8.515	53.168
Região Nordeste	5.775	5.429	5.591	3.771	4.926	4.415	29.907
Região Sudeste	1.377	1.705	1.995	1.676	2.114	2.255	11.122
Região Sul	344	420	543	318	293	257	2.175
Região Centro-Oeste	3.156	3.283	3.193	2.313	2.795	2.508	17.248

Fonte: SINAN/SVS/MS, 2019.

2.2.4 Epidemiologia no Amazonas

No Estado do Amazonas, o número de notificações de Leishmaniose tegumentar é bastante significativo. No período de 2008 à 2018, foram notificados 19.274 casos junto ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Amazonas, valores esses que possivelmente estejam relacionados à abertura de novas estradas, aos treinamentos militares na selva e à instalação de novos núcleos residenciais em áreas onde, previamente, existia densa floresta tropical (PINHEIRO *et al.*, 2008; SINAN/SVS/MS, 2019; TALHARI *et al.*, 1988). 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 6).

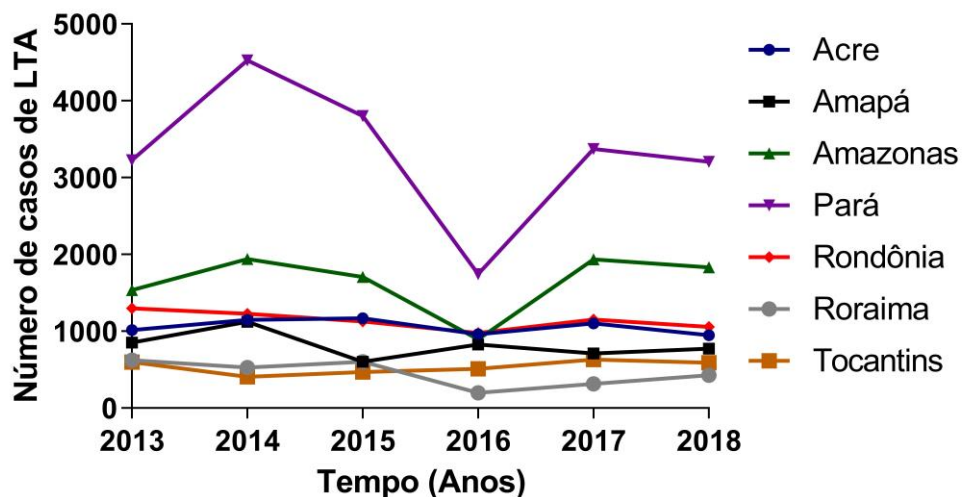


Figura 6. Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por ano confirmado, entre os anos de 2013 a 2018, nos estados da Região Norte. Fonte: SINAN/SVS/MS, 2019.

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 (BENÍCIO *et al.*, 2015). Algumas informações quanto a casos humanos isolados de *L. lainsoni* (BRASIL, 2017) e *L. shawi* (comunicação pessoal, Guerra, 2016) já foram descritos no Estado, sem confirmação quanto a serem casos autóctones.

No Amazonas, o município de Manaus registra o maior número de casos, seguido do município de Rio Preto da Eva. Em 2018, foram notificados 706 casos de

Leishmaniose tegumentar em Manaus e 370 casos em Rio Preto da Eva (SINAN/SVS/MS, 2019).

2.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LTA abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (como pesquisa parasitológica ou imunológica), e 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 então necessário o auxílio de outros métodos de diagnóstico para a confirmação (NAIFF-JUNIOR *et al.*, 2009).

O diagnóstico parasitológico é o método que vai detectar com maior 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, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003; NEVES, 2016). 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, 2017).

No método de cultivo para isolamento de *Leishmania*, os parasitas crescem relativamente bem em diversos meios de cultivo à temperatura entre 24 e 26 °C e o meio mais empregado para esse 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, caso não haja ainda crescimento, a cultura deve ser mantida pelo período de um mês, antes da liberação do resultado negativo (BRASIL, 2017).

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 (BRASIL, 2017; GONTIJO; CRAVALHO, 2003; NEVES, 2016).

O diagnóstico histopatológico é uma ferramenta clássica. É dado a partir da obtenção do fragmento de pele (biópsia) nas bordas das lesões, onde a carga parasitária é mais expressiva. Em seguida, 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 granulomas e 5- Reação exsudativa e tuberculoide; mas é no encontro de amastigotas que se pode definir ou sugerir o diagnóstico (BRASIL, 2017; MAGALHAES, 1986).

Uma alternativa para o aumento da sensibilidade do diagnóstico de lesões recentes e crônicas, é a aplicação das técnicas de imunocitoquímica e imunohistoquímica, com níveis comparáveis aos testes moleculares (DUARTE; ROCHEL, 2006). Este recurso contribui com o desfecho do resultado, já que as análises histopatológicas podem representar desafios no diagnóstico por suas semelhanças com outras enfermidades (AOUN *et al.*, 2014).

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 (GONTIJO; CARVALHO, 2003; ISAZA *et al.*, 2002).

Apesar de não haver nenhum procedimento laboratorial considerado padrão-ouro para o diagnóstico da LT, essa técnica molecular apresenta alta sensibilidade, cerca de 92 e 98%, sendo capaz de detectar quantidades relativamente baixas de DNA do parasita (POURMOHAMMADI *et al.*, 2010). 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, facilitando a identificação da espécie do parasito. Entretanto, é uma técnica de laboratório de difícil uso na rotina, devido ao

custo, necessitando de um termociclador especial, reagentes diferenciados e profissionais capacitados (BRASIL, 2017; MURRAY *et al.*, 2005).

No diagnóstico imunológico podem-se destacar duas técnicas bastante utilizadas para diagnosticar a LTA. A Intradermorreação de Montenegro (IDRM), teste de primeira fase dos exames imunológicos, é 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. Na segunda fase, prossegue-se com os testes sorológicos para detectar anticorpos antileishmania no soro dos pacientes (BRITO *et al.*, 2009; 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).

2.4 TRATAMENTO CONVENCIONAL

A farmacoterapia da Leishmaniose tegumentar apresenta inúmeros desafios que são inerentes à complexidade das formas clínicas, via de administração invasiva e inúmeras reações adversas. Além disso, essa doença não possui vacinas ou fármacos como medidas profiláticas (CHARLTON *et al.*, 2017; FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Os antimonials pentavalentes foram os primeiros fármacos adotados como terapia das leishmanioses, e em seguida o uso da anfotericina B, pentamidina, pentoxifilina e miltefosina (Figura 7), que ainda estão dentro do protocolo terapêutico indicado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

O tratamento para Leishmaniose foi introduzido 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 (CARVALHO *et al.*, 2019; REZENDE, 2009; VIANNA, 1912).

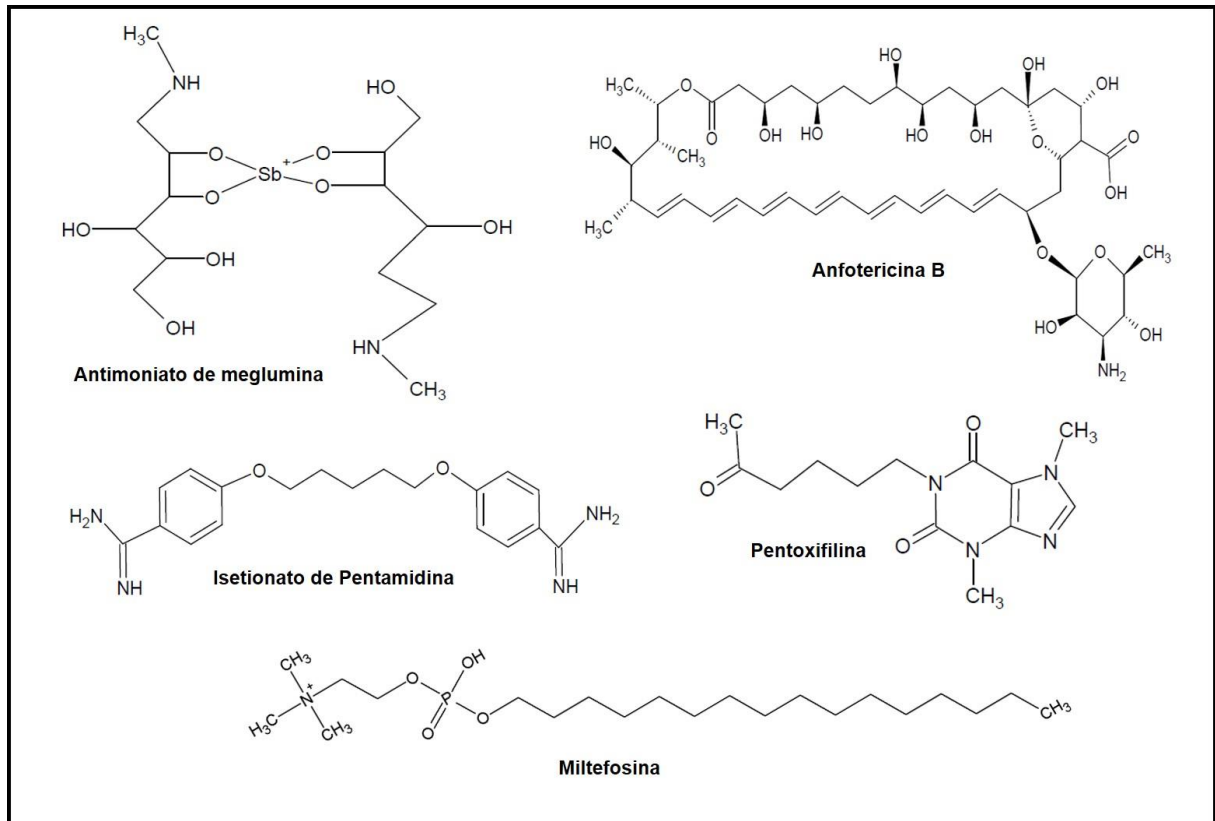


Figura 7. Estrutura química dos fármacos empregados no tratamento da Leishmaniose cutânea.

Fonte: ChemDraw®, 2020.

O antimoniato de meglumina, conformação do antimoniato pentavalente, é utilizado até os dias atuais para a leishmaniose como uma das drogas de primeira escolha padronizada no Brasil. Contudo, o protocolo terapêutico passou por alterações, considerando hoje em dia a região, as espécies de *Leishmania* circulante e a resposta ao tratamento. Logo, a escolha do antimoniato ou anfotericina B lipossomal se aplica para quase todas espécies circulantes no país, exceto pacientes acometidos com *Leishmania guyanensis*, onde será indicada a pentamidina (BRASIL, 2017).

O antimoniato pentavalente é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônio e da N-metil-glucamina (obtida previamente a partir da aminaçãõ redutora da glicose em presença de metilamina), sendo assim, hidrossolúvel e pouco solúvel em compostos orgânicos (RATH *et al.*, 2003). O mecanismo de ação dessa droga ainda

é pouco elucidado, no entanto, o mais aceito envolve interferência na bioenergética da forma amastigota de *Leishmania*. Tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de redução na produção de ATP (adenosina trifosfato) e GTP [guanina trifosfato] (BERMAN, 1998).

Sugere-se que o antimônio pentavalentes (Sb^V) comporte-se como pró-fármaco, sendo convertido ao antimônio trivalente (Sb^{III}), sendo possível explicar a partir da reação de óxido-redução, onde a Glutathione reduzida induz a redução de Sb^V , 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 desencadear ainda inúmeros efeitos colaterais, como toxicidades cardíaca, pancreática, renal, artralguas, mialgias e dores abdominais (SILVA, 2012). Esse medicamento é contraindicado, por exemplo, para gestantes e no uso concomitante de beta-bloqueadores ou antiarrítmicos. A hepatotoxicidade também é frequente e pode ocorrer em até 50% dos pacientes tratados (FRANKE *et al.*, 1990; MARZOCHI, 2010).

Há mais de 20 anos vem sendo discutido a possibilidade de tratar os pacientes com Leishmaniose tegumentar por meio de baixas doses de antimoniato de meglumina, para favorecer a redução dos efeitos colaterais, dor no local da injeção e maior adesão dos pacientes ao tratamento (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1996). Esses benefícios podem ser observados no trabalho de Oliveira-Neto e Mattos (2006), administrando nos enfermos uma única ampola desse medicamento pela via IM, em intervalos de um dia até a epitelização completa das úlceras e a ausência de qualquer cicatriz eritematosa, períodos estes, com durabilidade de 3 à 10 semanas de aplicação e após seis semanas do tratamento, foram retratados com a dose de 15 mg Sb^V /Kg/dia por 21 dias, mostrando a cura clínica dos pacientes.

Contudo, para os pacientes com contraindicação da administração desse fármaco por via sistêmica, a alternativa terapêutica usual é a administração pela via intralesional (IL), inclusive como descrito nas diretrizes da OPAS desde 2013, recomendando assim, o uso do antimoniato pentavalente a cada 3-7 dias para lesões menores que 3 cm e não localizadas em superfícies articulares ou faciais (OPAS, 2013). O estudo de Arboleda *et al.* (2019) mostrou uma série de casos bem sucedidos ao administrar o antimoniato de meglumina pela via IL. Em cada sessão foi infundido de 1 à 5 mL do medicamento, dependendo do tamanho da lesão, com uma média de

4,36 doses nos intervalos de 4 aos 9 dias, onde onze dos doze pacientes com LC tratados apresentaram cura completa.

A anfotericina B é um antibiótico polieno que interage com ergosterol da membrana celular, promovendo alteração da permeabilidade celular e do balanço iônico, causando a morte celular (ROBETS, 2003; TIUMAN *et al.*, 2011). 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 B pode ser encontrada também na forma lipossomal, 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 ser empregada no tratamento da Leishmaniose tegumentar quando as outras indicações terapêuticas não obtiverem sucesso ou forem contraindicadas (BRASIL, 2017).

O isetionato de pentamidina 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 (BRASIL, 2017; SILVA, 2012). Segundo o trabalho de Neves (2011), a pentamidina apresentou eficácia similar ao antimoniato pentavalente para o tratamento de Leishmaniose tegumentar, para espécie *L. guyanensis*, e tem vantagem de ser utilizada por tempo mais curto e apresentar menos efeitos adversos.

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

A pentoxifilina vem a ser um fármaco da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas. Embora seja o único medicamento de via oral

recomendado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da Leishmaniose tegumentar, o seu uso se dá em combinação com o antimoniato de meglumina, uma vez que não possui indicação como monofarmacoterapia. Esse fármaco 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, reduzindo a toxicidade do antimônio pentavalente, contribuindo com o desfecho de cura em menor tempo quando comparado ao tratamento convencional e evitando o segundo ciclo da terapia com o medicamento de primeira escolha (BRASIL, 2017; MACHADO *et al.*, 2007).

A administração de altas dosagens podem desencadear distúrbios gastrintestinais, náusea, vômito, arritmia cardíaca, entre outros. A sua contraindicação é para pacientes menores de 12 anos, grávidas, lactentes, distúrbios hemorrágicos, entre outros. Apesar de apresentar estudos escassos sobre a sua aplicação, 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 antimonial para o tratamento da Leishmaniose tegumentar mucosa no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS (BRASIL, 2015; BRASIL, 2017).

Outro medicamento que vem apresentando relevância para o tratamento da Leishmaniose tegumentar é a miltefosina, desenvolvida inicialmente como agente antineoplásico (ALMEIDA; SANTOS, 2011). Este fármaco também é administrado pela via oral e é usado na Índia para o tratamento da Leishmaniose visceral (SOTO *et al.*, 2004). O estudo de Chrusciak-Talhari *et al.* (2011) mostrou a eficácia da miltefosina contra *L. guyanensis*, resultando eficácia na cura superior ao antimônio.

É estimulado o uso da miltefosina combinada com outros medicamentos, para otimizar o efeito terapêutico. O uso desse fármaco associado com a pentamidina intralesional já apresentou uma taxa de cura de 92% para *L. braziliensis* na Bolívia (SOTO *et al.*, 2018). Contudo, o mecanismo de ação não é bem esclarecido, mas pode estar relacionado com a interferência no metabolismo de fosfolípidos, na transdução de sinal, na homeostase de cálcio e na síntese de RNA, induzindo à morte celular (ALONSO *et al.*, 2019; COSTA-FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008).

Embora os medicamentos preconizados pelo Ministério da saúde mostrem eficácia relativa para o tratamento da Leishmaniose tegumentar, o seu custo é bem expressivo e, às vezes, dificulta o acesso para os enfermos. Muitos precisam buscar

o recurso do Sistema Único de Saúde, onde esses medicamentos convencionais estão na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME [Tabela 3] (ANVISA, 2020; NAGLE *et al.*, 2014). Esses fatores estimulam a busca de alternativas terapêuticas para um tratamento da leishmaniose com melhor eficácia e custo mais acessível.

Tabela 3 – Relação da eficácia e custo dos medicamentos padrões para a Leishmaniose Tegumentar.

Droga Padrão	Eficácia	Custo
Anfotericina B	>95%	R\$ 20,21 ^F
Anfotericina B lipossomal	~100%	R\$ 504,79 ^F
Isetionato de pentamidina	70 – 80%	**
Antimoniato de meglumina	35 – 95%	R\$ 290,38 ^C
Pentoxifilina	*	R\$ 35,59 ^C

* Estudo avalia associação com drogas padrões; ** Medicamento não presente na lista de compra de medicamentos. ^F Valor por Frasco; ^C Valor por Caixa. Fonte: Modificado NAGLE *et al.*, 2014; Brasil, 2017; ANVISA, 2020.

2.5 TRATAMENTO ALTERNATIVO: COMBINAÇÃO FARMACOTERAPÊUTICA

O recurso da associação de fármacos vem ganhando espaço no tratamento de doenças, principalmente por aumentar a taxa de sucesso quanto ao aspecto clínico (SUN; SANDERSON; ZHENG, 2016). Esse fator já havia sido observado por exemplo, para o caso de pacientes com infecções graves, utilizando a associação de diferentes antibióticos ou agentes antifúngicos (ZILBERBERG *et al.*, 2014). Existem várias vantagens para a escolha da terapia combinada, como ação sinérgica dos fármacos que provoca a redução das doses das substâncias. Em seguida, a diminuição ou atraso do surgimento de resistência a um dos medicamentos. E por meio da associação desses princípios ativos é possível alcançar mais de um alvo de ação (CSERMELY *et al.*, 2005).

Essa alternativa da combinação medicamentosa tem sido indicada para o tratamento de várias outras doenças infecciosas, como a malária, tuberculose, *Acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) e recentemente para as Leishmanioses, devido a diferença de classes químicas que poderão atuar sobre alvos distintos no parasita (TRICONI *et al.*, 2014). Um grande exemplo é o trabalho de Musa *et al.*

(2012), que mostrou resultados positivos ao administrar stiboglucanato de sódio associado a paromomicina em pacientes com Leishmaniose visceral, mostrando mais eficácia com período mais curto de tratamento (17 dias), comparado com os pacientes que foram tratados somente com o stiboglucanato de sódio, fazendo-se necessário um período mais longo de aplicação, de cerca de 30 dias.

Outro trabalho que corrobora com estes resultados é o de Omollo *et al.* (2011), que testaram, em pacientes com Leishmaniose visceral, a combinação de stiboglucanato de sódio mais anfotericina B lipossomal, miltefosina mais anfotericina B lipossomal e monoterapia com miltefosina. Os tratamentos associados foram mais eficazes do que o fármaco isolado.

Também existem estudos de tratamentos associados em pacientes com Leishmaniose cutânea, como o de Bashir *et al.* (2019), onde aplicaram a combinação de itraconazol por via oral e administração pela via intralesional de antimoniato de meglumina. Contudo, os resultados não foram tão promissores, por não demonstrarem benefício ao comparar com os pacientes que receberam somente a aplicação de antimoniato de meglumina pela mesma via de administração.

Dentre os estudos preliminares com animais de experimentação, o uso da anfotericina B pela via intraperitoneal associado com tamoxifeno em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* resultaram na redução das lesões em 55% e diminuição da carga parasitária em 75% (TRICONI *et al.*, 2014). Vale destacar os experimentos de administração via tópica, como, o teste da formulação lipossomal com anfotericina B mais miltefosina, mostrando-se eficiente em BALB/c infectados com *L. mexicana*. Após as aplicações, a carga parasitária foi reduzida e houve a recuperação das lesões, resultado este promissor por ser um tratamento não invasivo e indolor (DAR *et al.*, 2020).

Recentemente vem sendo estimulada a avaliação do potencial antileishmania por meio da combinação de fármacos com produtos naturais, como a associação da anfotericina B com óleo essencial de própolis, mostrando-se bastante eficiente pela sua ação sinérgica, quando comparado com o tratamento convencional da anfotericina B em monoterapia (JIHENE *et al.*, 2020). Outro estudo que mostrou potencial antiparasitário é o da avaliação da anfotericina B associada ao extrato de folhas de *Moringa oleifera* otimizando a sua atividade terapêutica (HAMMI *et al.*, 2019).

2.6 TRATAMENTO ALTERNATIVO: PRODUTOS NATURAIS

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos é tão antigo quanto a existência da espécie humana, e até nos dias atuais é um recurso alternativo para muitas comunidades e grupos étnicos (HARDY *et al.*, 2012). 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 “Farmacopeia” natural, vivenciadas pelas mesmas e constituída por informações empíricas diversificadas. 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 isolados os metabólitos secundários que apresentam atividade farmacológica, pode-se progredir para um medicamento, pois estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais, a maioria destas de plantas (CALIXTO, 2001; WHO, 2011).

Os produtos naturais e derivados de plantas medicinais têm sido de grande interesse na busca de novos medicamentos com atividade antileishmaniana. 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 em produtos naturais (NAGLE *et al.*, 2014).

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

Um estudo bastante promissor para terapia da Leishmaniose tegumentar é o que envolve a apigenina (Figura 8), uma flavona (flavonoide) encontrada 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). Sugestivamente por se tratar de um flavonoide, grupo de grande importância dentre os produtos naturais presentes em várias famílias vegetais, de interesse fitoterapêutico, devido apresentar inúmeras atividades farmacológicas (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

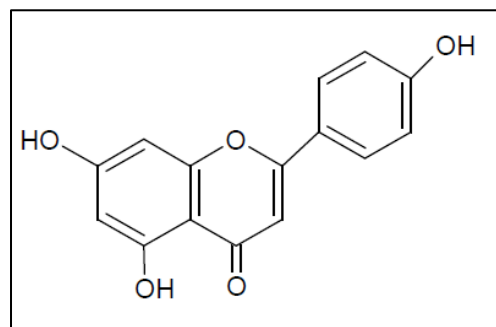


Figura 8. Estrutura química da apigenina. Fonte: JENSEN, 2020. Chemdraw®.

A família Fabaceae compreende uma diversidade de substâncias ativas, não só da classe dos flavonoides, como também de alcaloides, terpenoides e esteroides, que são exemplos de outras classes fitoquímicas na qual estão presentes em muitos exemplares dessa família (ROCHA-SILVA *et al.*, 2007). Desse modo, é conhecida como uma das famílias vegetais de interesse na área de produtos naturais, por disponibilizar diferentes princípios ativos para aplicação na medicina.

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. férrea, 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 [Tabela 4] (CHASE *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2010):

Tabela 4 – Classificação taxonômica da *Libidibia ferrea*.

Nome científico	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz var. <i>ferrea</i>
Sinonímia	<i>Caesalpinia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotilidoneae)
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Caesalpinioideae (Caesalpinioideae, leguminose)
Espécie	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart ex. Tul. L.P. Queiroz)

Fonte: Modificado QUEIROZ, 2009.

Essa espécie vegetal pertence à família botânica Fabaceae, de grande importância pelo seu número de espécies, cerca de 19.325 espécies em mais de 720 gêneros (SOUZA; BASTOS; ROCHA, 2009; SOUZA; LORENZI, 2012). Sendo a única família vegetal com os gêneros classificados tradicionalmente em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae (IGNOATO, 2012). Somente no Brasil, existe o registro de pelo menos 200 gêneros e 2700 espécies, correspondendo à 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 indeiscentes de cor marrom escuro, tipo legume, com sementes escuras (Figura 9). Possui classificação arbórea, com altura de 10 a 15 metros, e tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro (SOUZA; LORENZI, 2002). As folhas da árvore podem medir de 7 a 20 cm, cobertas com pelos amarelados e curtos. Quanto aos frutos possuem dimensões em torno de 8,3 x 1,8 x 0,8 cm, de coloração esverdeada, quando imaturos, e as sementes possuem o tamanho médio de 0,9 x 0,5 x 0,5 cm, com coloração variando de verde claro a amarelo (FERREIRA; SOARES, 2015).



Figura 9. *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz. (A) Frutificação da Espécie vegetal; (B) Fruto maduro; (C) Fruto triturado e sementes removidas. Fonte: JENSEN (2018).

Essa planta apresenta inúmeros fins terapêuticos. Por exemplo, as suas partes vegetativas, como, folhas, cascas, semente, raízes e pedaços de madeira podem ser utilizadas no tratamento de diversas infecções (DI STASI, 1996). Além disso, é uma das plantas medicinais de interesse para o Sistema de Saúde Brasileiro, presente no Programa de pesquisas de plantas medicinais com propriedades terapêutica alternativa e complementar, com indicação para ação analgésica, antipirética, anti-inflamatória e/ou antiespasmódica (BRASIL, 2006).

Cavalheiro et al. (2009) demonstraram que o extrato aquoso das sementes apresentou atividades celulásica, anticoagulante e larvicida contra *Aedes aegypti*. O trabalho de Fernandes et al. (2016) corroborou com esse resultado, mostrando também atividade repelente, porém, em moscas da família Calliphoridae ao utilizar extrato alcoólico do fruto dessa planta. Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico 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 (CARVALHO et al., 2016; FREITAS et al., 2012; MAIA; 2004; NAKAMURA 2002). O extrato metanólico (80%) dos frutos

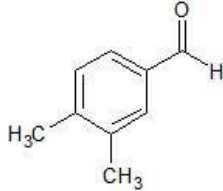
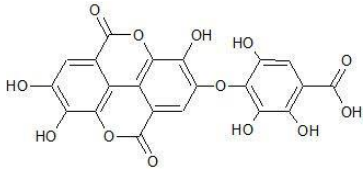
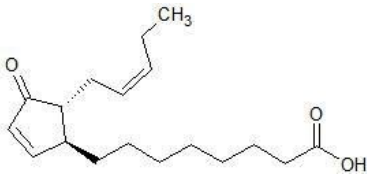
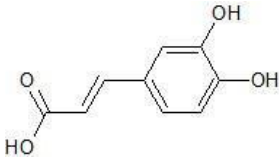
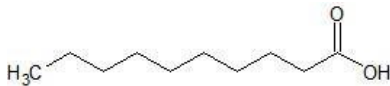
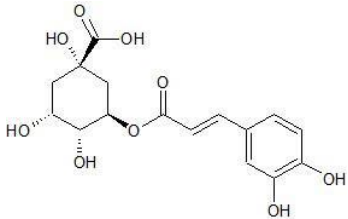
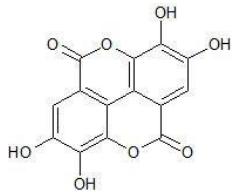
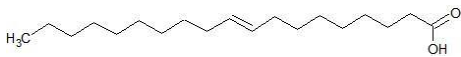
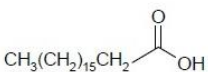
obtido através da maceração durante 72 h foi testado frente às cepas de *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. oralise*, *Lactobacillus casei*, apresentando uma concentração inibitória mínima que variou de 25 a 100 µg/mL (SAMPAIO *et al.*, 2009).

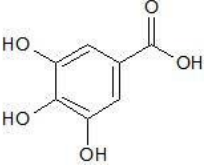
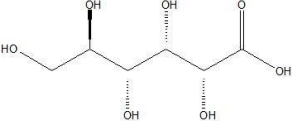
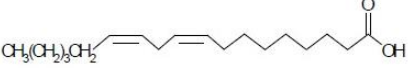
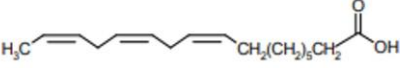
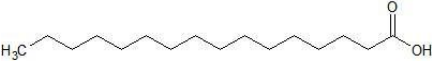
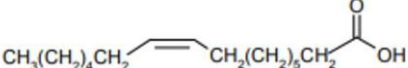
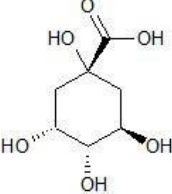
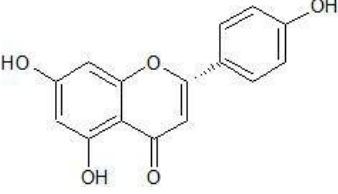
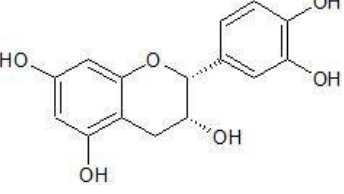
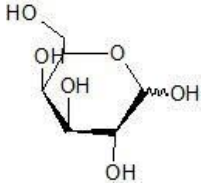
O extrato etanólico desses frutos apresentou forte atividade antioxidante no teste *in vitro* e demonstrou uma correlação significativa e linear entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante pelo ensaio de fosfomolidênio, bem como a atividade de eliminação do radical superóxido (SILVA *et al.*, 2011). O estudo de Falcão *et al.* (2019) mostrou atividade anti-inflamatória, ao utilizar o extrato aquoso de *L. ferrea* (marcado com ácido elágico e ácido gálico), administrado por via oral em ratos com inflamação articular, resultando na inibição da inflamação sinovial após o tratamento.

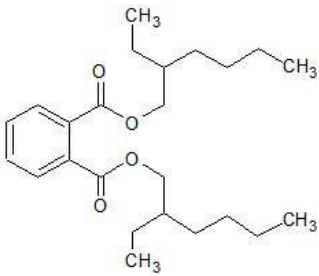
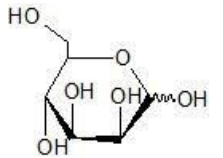
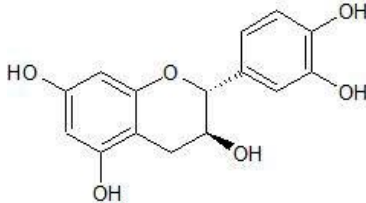
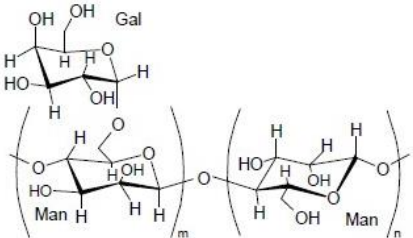
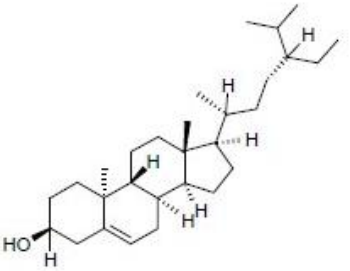
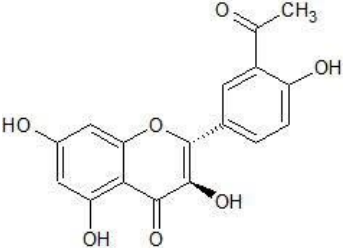
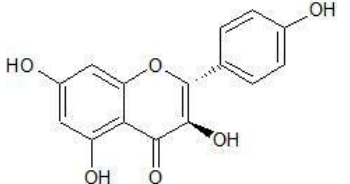
Outro resultado preliminar bastante promissor é de Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), ao testar extratos hexânicos (Hex) e metanólicos (MeOH) de várias partes da espécie vegetal para avaliar a ação antileishmania por meio do ensaio *in vitro* com *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. O extrato metanólico do fruto de *L. ferrea* mostrou maior atividade contra a *L. amazonensis*. Um hidrogel formulado com esse extrato foi aplicado em Hamsters infectados com *L. amazonensis*, possibilitando assim, o controle da evolução das lesões dos animais e redução da carga parasitária.

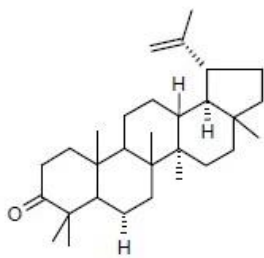
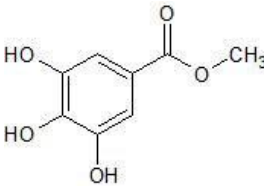
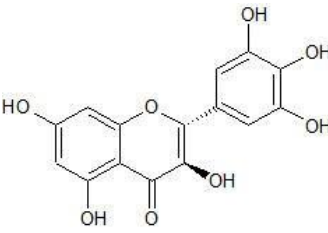
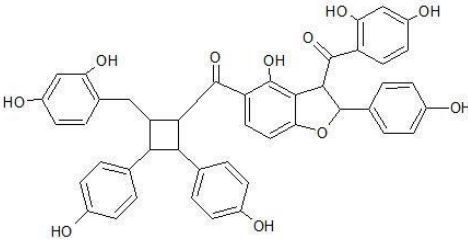
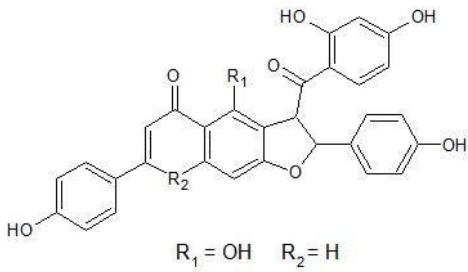
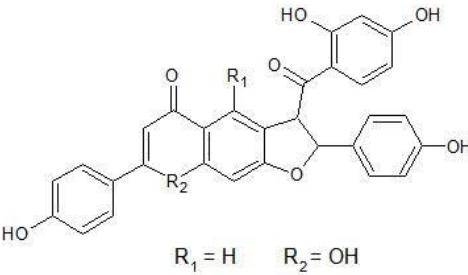
A partir dos estudos que avaliaram as atividades medicinais, pode-se afirmar que a *L. ferrea* é uma planta rica em metabólitos secundários, majoritariamente os compostos fenólicos (CUNHA *et al.*, 2017). Logo, diante do levantamento, mostra-se que várias substâncias são responsáveis por essas atividades biológicas ao utilizar diferentes partes dessa espécie vegetal, como, a casca, o epicarpo (fruto), folhas, galhos e sementes, tornando-se assim, uma linha de pesquisa atrativa para bioprospecção de substâncias químicas, isolando-as e avaliando sua atividade farmacológica para contribuir para o desenvolvimento de futuros fitoterápicos de aplicação em diferentes doenças. Alguns trabalhos já vêm contribuindo para determinação desse arsenal fitoquímico oriundo de distintas partes da *L. ferrea* (Tabela 5).

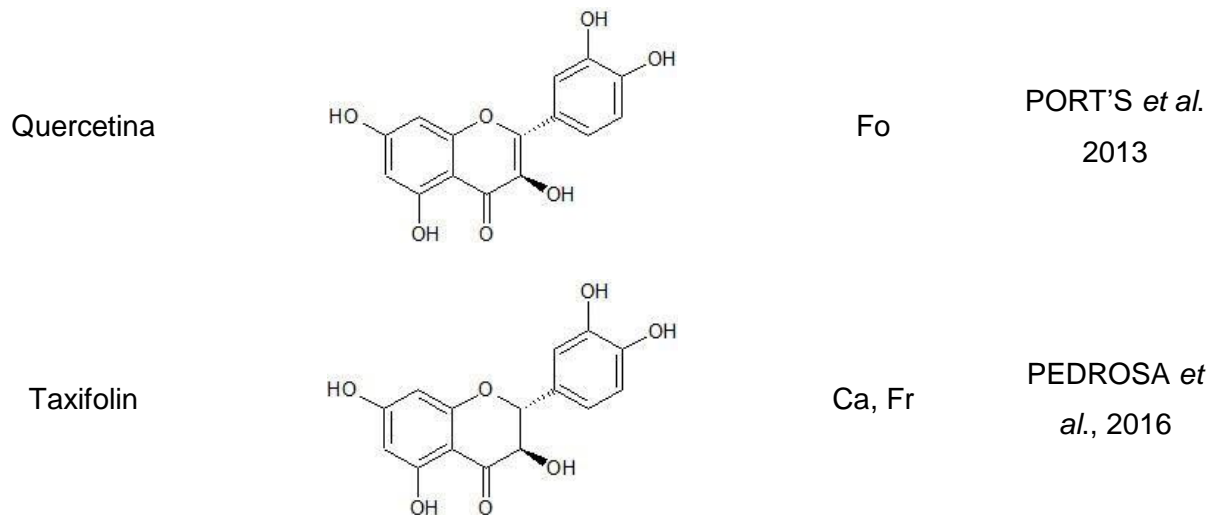
Tabela 5 – Relação das substâncias isoladas das partes vegetais da *L. ferrea* (Ca – Casca; Fr – Fruto; Fo – Folha; Ga – Galhos; Se – Sementes).

Substância	Estrutura	Parte vegetal	Referência
3,4-dimetilbenzaldeído		Fr	DIAS <i>et al.</i> , 2013
Ácido 2-(2,3,6-tri-hidroxi-4-carboxifenil) elágico		Fr	UEDA <i>et al.</i> , 2004
Ácido 12-oxo-fitodienoico		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Ácido cafeico		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Ácido caprico		Se	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
Ácido clorogênico		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Ácido elágico		Fr, Ga	UEDA <i>et al.</i> , 2004
Ácido elaídico		Fr	DIAS <i>et al.</i> , 2013
Ácido esteárico		Fr, Se	DIAS <i>et al.</i> , 2013

Ácido gálico		Ca, Fo, Fr, Ga	ARAÚJO <i>et al.</i> , 2014
Ácido glucônico		Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Ácido linoleico		Fr, Se	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
Ácido linolênico		Se	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
Ácido palmítico		Fr, Se	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
Ácido palmitolênico		Se	SAWADA <i>et al.</i> , 2014
Ácido quinínico		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Apigenina		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Catequina		Ca, Ga	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2011
D-galactose		Se	LOPES <i>et al.</i> , 2013

di-2-etil-hexilftalato		Fr	DIAS <i>et al.</i> , 2013
D-manose		Se	LOPES <i>et al.</i> , 2013
Epicatequina		Ca, Ga	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2011
Galactomanano		Fr	SOUZA <i>et al.</i> , 2010
Gama-sitosterol		Fr	DIAS <i>et al.</i> , 2013
Isorhamnetin		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Kaempferol		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016

Lupenona		Fr	DIAS <i>et al.</i> , 2013
Metil-galato		Fr	SILVA <i>et al.</i> , 2013
Miricetina		Ca, Fr	PEDROSA <i>et al.</i> , 2016
Pauferrol A		Ca, Ga	NOZAKI <i>et al.</i> , 2007
Pauferrol B	 <p data-bbox="687 1496 858 1534">$R_1 = OH \quad R_2 = H$</p>	Ca, Ga	OHIRA <i>et al.</i> , 2013
Pauferrol C	 <p data-bbox="687 1800 858 1839">$R_1 = H \quad R_2 = OH$</p>	Ca, Ga	OHIRA <i>et al.</i> , 2013



Fonte: Modificado FERREIRA; SOARES, 2015; JENSEN, 2020, Chemdraw®.

Outra vantagem dessa planta é a ausência de efeitos tóxicos observados no estudo toxicológico, por meio da administração aguda e subaguda do extrato aquoso do fruto e da casca do jucá, em ratos e suínos, onde seus exames laboratoriais não mostraram indícios de efeitos tóxicos (QUEIROZ-NETO *et al.*, 1991). Dessa forma, este fator é bastante promissor quanto ao aspecto terapêutico, porque durante o estudo das substâncias candidatas aos protótipos de novos fármacos, é de suma importância que além da comprovação de sua eficácia, se comprove a segurança ao administrá-las em pacientes (BORGES, 2013).

2.8 NANOMEDICINA: SISTEMA MICROEMULSIONADO

A Nanomedicina é uma ciência interdisciplinar com a finalidade de aplicar a nanotecnologia na medicina, utilizando compostos nanoestruturados de 1 a 1.000 nanômetros (nm), voltados para o diagnóstico e o tratamento de doenças (GU *et al.*, 2013; HAFNER *et al.*, 2014). O estudo desses sistemas tem sido realizado principalmente para direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA *et al.*, 2007). Dentre os nanossistemas com essa finalidade, destaca-se os lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões e microemulsões (SILVA, 2004).

O marco inicial da produção de uma 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; STOECKENIUS; PRINCE, 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 com tamanho menor que 100 nm. Comparada com a nanoemulsão, a microemulsão possui uma escala de gotícula bem menor (Figura 10), e as substâncias ativas podem ser veiculadas quando são solubilizadas na fase oleosa ou aquosa (CARVALHO *et al.*, 2016; LAWRENCE, 1994; OLIVEIRA; SCARPA, 2001; OLIVEIRA; SCARPA; CERA, 2002; ZHU *et al.*, 2008).

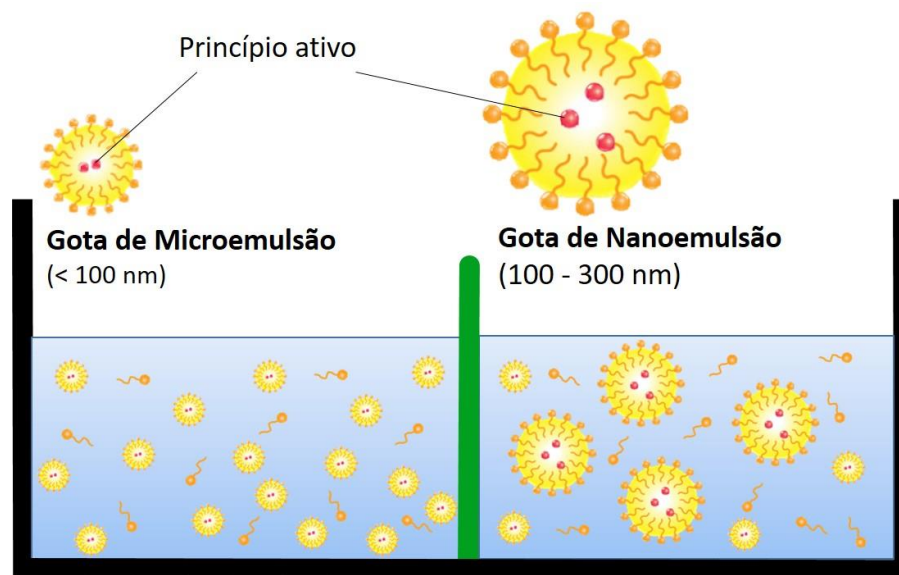



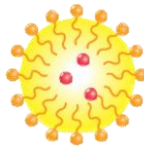

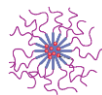

Figura 10. Gotículas de microemulsão e nanoemulsão. Fonte: Modificado HAFNER *et al.* 2014.

Os tensoativos permitem um aumento na permeabilidade de membrana celular, o que colabora para a absorção do fármaco e a biodisponibilidade (FORMARIZ *et al.*, 2007; SINTOV; SHAPIRO, 2004). Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e o co-tensoativo (LAWRENCE, 1994; OLIVEIRA, 1997).

As microemulsões são nanoestruturas que podem apresentar aspectos visualmente diferentes dos outros sistemas emulsionados, uma vez que as emulsões clássicas são brancas, de aspecto leitoso e opaco, representadas por sistemas de

elevada viscosidade, cujos processos de instabilidade tendem a levar à separação de fases. O sistema microemulsionado é um líquido com boa fluidez, baixa viscosidade, e é opticamente transparente ou translúcido em virtude do reduzido diâmetro das gotículas [Tabela 6] (FORMARIZ, 2004). Estudos com esses nanoestruturados têm sido relevantes na área das Ciências Farmacêuticas, possibilitando alternativas terapêuticas modernas, farmacologicamente mais eficientes e com redução de reações adversas (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Tabela 6 – 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; HAFNER *et al.* 2014.

Os sistemas microemulsionados vêm sendo objeto de várias patentes em todo o mundo, sendo que a China e os Estados Unidos da América são os maiores detentores de patentes envolvendo microemulsões para uso transdérmico, com finalidade de incorporação de diferentes classes terapêuticas de fármacos, como, antiinflamatório não estereoidal (AINE), anestésicos, imunossupressor,

antiparkinsoniano, anti-hormonal, antimicrobiano e até mesmo derivados de plantas (FIGUEIREDO *et al.*, 2013).

Logo, essas microemulsões possuem potencial terapêutico para o tratamento de diferentes doenças, como por exemplo, na terapia do câncer. Chen *et al.* (2019) testaram o ácido cafeico carregado em uma microemulsão contra células cancerígenas de cólon e de mama, reduzindo assim, a atividade proliferativa celular após o ensaio *in vitro*, mas antes da intervenção no câncer, deve-se avaliar o efeito em ensaio clínico. Outra finalidade, é para o prolongamento do efeito da lidocaína incorporada em microemulsão, possibilitando maior tempo de anestesia ao local de aplicação pela via transdérmica, atividade identificada após os testes em coelhos (MAULVI *et al.*, 2020).

O melhoramento da solubilidade de fármacos também pode ser atribuído ao sistema microemulsionado, como o trabalho de Fonseca, Bhide e Joshi (2019), ao avaliar um gel à base de microemulsão com etoricoxibe, um anti-inflamatório não esteroide, sendo possível o seu emprego para melhorar a solubilidade e a permeabilidade da pele. Outro estudo que corrobora com esses dados é o de Hu *et al.* (2019), que testa um hidrogel microemulsionado no carregamento de 3,5,4'-trimetoxi-trans-estilbeno pela via tópica em coelhos, modelo para a osteoartrite. Após o tratamento, houve redução significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e melhor regeneração macroscópica de cartilagem.

A atividade antifúngica também já foi relatada, ao utilizar uma microemulsão contendo clotrimazol e itraconazol para liberação transdérmica no tratamento da esporotricose, mostrando atividades inibitórias potentes e melhora da permeação, sugerindo então, a sua aplicação como veículo promissor para o tratamento transdérmico da esporotricose (FERREIRA *et al.*, 2020).

O recurso das microemulsões também pode ser adotado para melhorar a estabilidade de formulações contendo extrato vegetal, como o trabalho de Parveen *et al.* (2019), que desenvolveram uma microemulsão contendo extrato de *Lycopersicon esculentum*, resultando em um sistema estável diante de várias condições simuladas em laboratório. O trabalho de Ghorbanzadeh *et al.* (2019), também mostrou melhor estabilidade do hidrogel à base de microemulsão com óleo de gergelim, indicada para prevenção dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta na pele ao testarem em porquinhos da Índia.

Outro estudo desse sistema com produtos naturais, é o da piperina, substância derivada de *Piper nigrum* (pimenta-preta) que foi empregada em uma microemulsão, que desempenhou resultado bastante promissor no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*. Os animais mostraram 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 cutânea, já que possui a capacidade de carrear a droga ou a substância ativa de forma eficaz.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química e o potencial terapêutico da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Martius exTul.) LP Queiroz (Fabales: Fabaceae) em estudos Pré-clínicos da Leishmaniose cutânea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Capítulo 1: Clinical and histopathological evaluation of an experimental topical treatment for cutaneous leishmaniasis:

- Desenvolver e caracterizar a microemulsão com a fração diclorometano (FDCM) do extrato metanólico do fruto de *Libidibia ferrea*;
- Estudar o efeito do tratamento tópico com as formulações contendo fração DCM em animais de experimentação (*Mesocricetus auratus*) infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Avaliar a carga parasitária e os achados histopatológicos nos animais de experimentação após o tratamento com a microemulsão tópica e aplicação do Antimoniato de meglumina por vias parenterais.

Capítulo 2: Estudo da atividade *in vitro* das substâncias isoladas de *Libidibia ferrea* em *Leishmania amazonensis* e Citotoxicidade:

- Isolar os metabólitos presentes na fração DCM obtida do extrato metanólico dos frutos de *Libidibia ferrea*;
- Identificar as estruturas das substâncias isoladas, através de análises de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas;

- Avaliar a eficácia das substâncias isoladas da fração DCM da *Libidibia ferrea* quanto à atividade contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias mais ativas de *Libidibia ferrea* frente aos macrófagos de linhagem J774 e cultivo primário para a determinação do índice de seletividade.

4. METODOLOGIA GERAL

4.1 INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS NO PROJETO

Este projeto trata-se de uma pesquisa experimental na área de tratamento para Leishmaniose cutânea, uma das Doenças Tropicais Negligenciadas e foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pela Dr^a. Antônia Maria Ramos Franco;
- Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pela Dr^a. Maria da Paz Lima;
- Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, coordenado pelo Me. Leonardo Brandão Matos;
- Laboratório de Inovação e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenado pela Dr^a. Tatiane Pereira de Souza;
- Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Química Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenado pela Dra. Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldj;
- Laboratório de Histologia Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, coordenado pelo Dr. José Fernando Marques Barcellos;
- Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob a colaboração do Dr. Felipe Moura Araújo da Silva.

4.2 DIVISÃO DAS ETAPAS DA TESE

Os resultados apresentados na tese foram divididos em dois capítulos, de acordo com os objetivos específicos e o progresso dos resultados das etapas experimentais, trajetória metodológica esta, descrita no fluxograma (Figura 11). Após a elaboração dos capítulos, na etapa final do projeto está apresentado uma discussão

geral do estudo. Em anexo, estão presentes os termos legais para o desenvolvimento deste projeto.

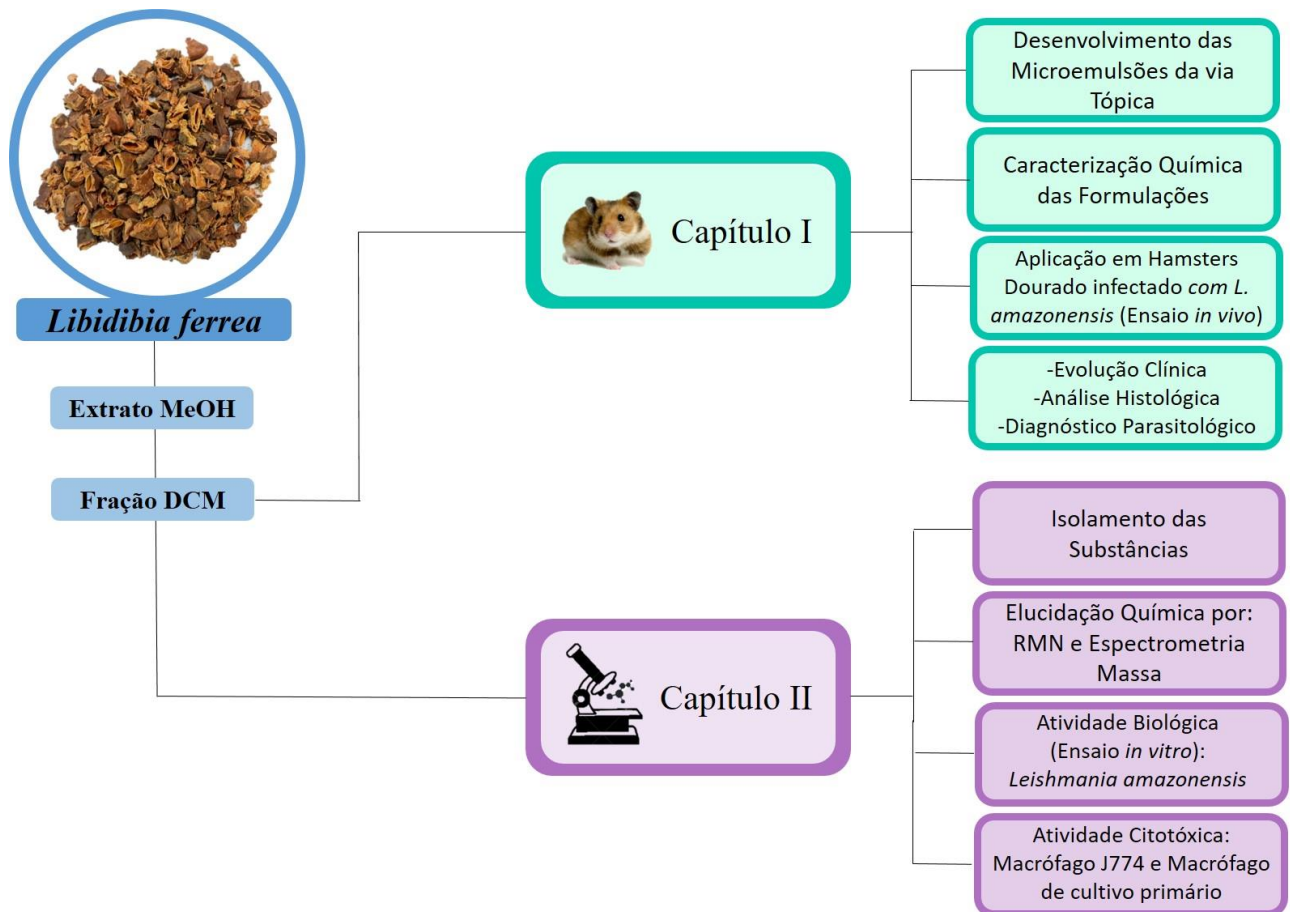


Figura 11. Fluxograma da trajetória metodológica do estudo.

4.3 COLETA DO MATERIAL VEGETAL DE *Libidibia ferrea*

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. As coletas foram realizadas no mês de junho e julho de 2018, período este de frutificação de um exemplar adulto.

Exsicatas foram preparadas previamente 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 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA sob o registro 246150.

4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS 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 faca tipo *willey*. Após a pulverização, os materiais foram extraídos com Hexano (VETEC) e metanol (VETEC).

A extração do material foi efetuada por maceração em frasco tipo mariote, com extrações sucessivas em solventes de polaridade crescente, por um período de 7 dias em cada solvente. O esquema geral para a preparação de todos os extratos está ilustrado na figura 12. O volume de cada solvente utilizado variou conforme a quantidade de material vegetal, mantendo a proporção de 200 mL de solvente para cada 100 g de material pulverizado, em cada extração. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (YAMATO).

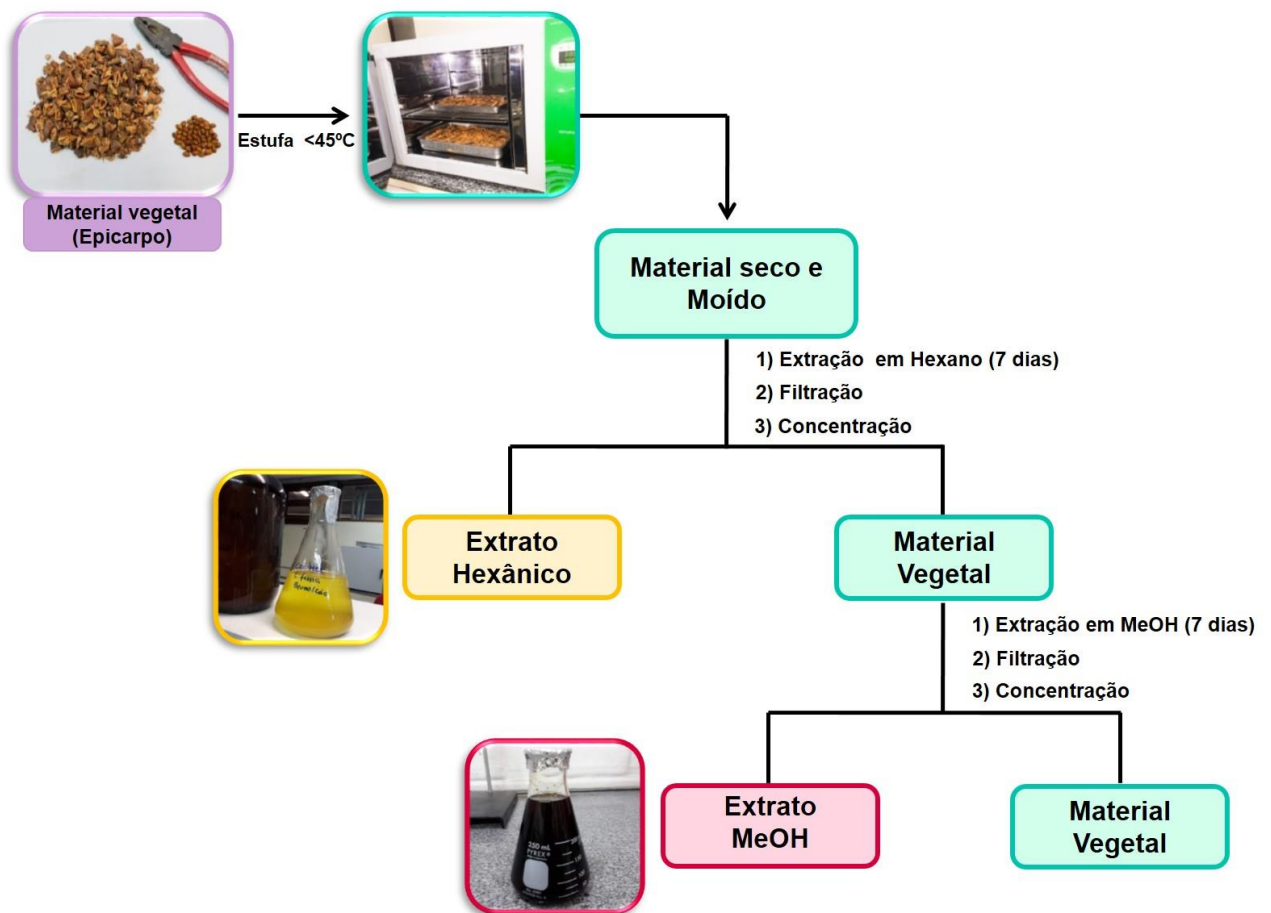


Figura 12. Fluxograma geral da preparação dos extratos obtidos de epicarpo de *Libidibia ferrea*.

4.5 PARTIÇÃO 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 13). Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para a avaliação da atividade antileishmania. As frações foram concentradas em rotaevaporador (YAMATO).

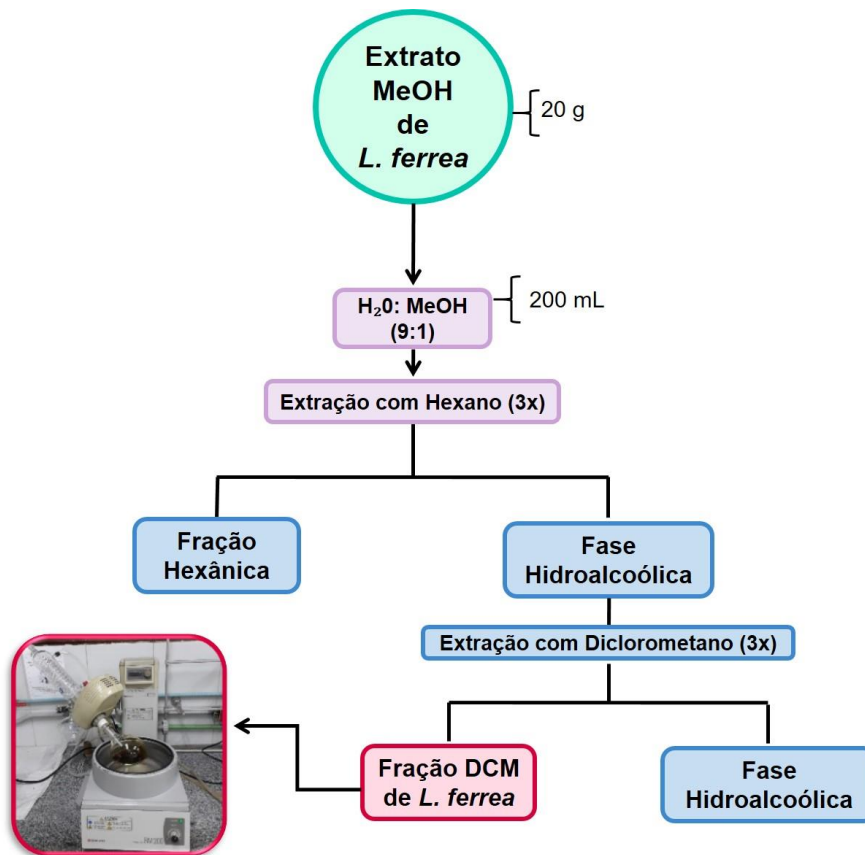


Figura 13. Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico de epicarpo da *Libidibia ferrea*.

4.6 CURVA DE CRESCIMENTO DE FORMAS DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania*

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, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) foram cultivados (forma Promastigota das espécies estudadas) a partir de uma concentração de 10^6 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 10^4 . 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® 8.0.

4.7 MEDICAMENTOS UTILIZADOS COMO CONTROLES *IN VITRO* E *IN VIVO*

4.7.1 Padrões de ensaios *in vitro*

Isetionato de pentamidina (Pentacarinat®) foi utilizado nas concentrações de diluição de 10 à $0,0625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Antimoniato de meglumina (Glucantime®) foi utilizado nas concentrações de 60 à $3,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.7.2 Padrões de ensaios *in vivo*

Antimoniato de meglumina (Glucantime®) foi utilizado como padrão de controle positivo nos ensaios biológicos *in vivo*. Foi utilizado a concentração $20 \text{ mg/Sb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$ pelas vias de administração intramuscular (IM) e intralesional (IL), conforme indicado pelo Manual do Ministério da Saúde (BRASIL 2017).

4.8 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS

O modelo biológico experimental para o estudo foram hamster dourado (*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 correspondendo aos resultados do primeiro capítulo e o número de protocolo 003/2020 para o segundo capítulo.

5. CAPÍTULO 1

Clinical and histopathological evaluation of an experimental topical treatment for cutaneous leishmaniasis

Bruno Bezerra Jensen^{1,2}, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski², Caio Coutinho de Souza², Maria da Paz Lima³, José Fernando Marques Barcellos⁴, Tatiane Pereira de Souza¹, Fabrício Nonato Araújo Rolim¹, Francimeire Gomes Pinheiro², Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos¹, Antonia Maria Ramos Franco²

¹ Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

² Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

³ Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

⁴ Laboratório de Histologia Funcional, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

ABSTRACT

BACKGROUND: The pharmacotherapy of cutaneous leishmaniasis is invasive and presents several adverse reactions, and is thus an incentive for the development of a more effective therapeutic alternative.

OBJECTIVES: Develop and evaluate the effect of a microemulsion with a DCM fraction of *Libidibia ferrea* extract in an experimental model of golden hamsters infected with *Leishmania amazonensis* as a possible alternative treatment for cutaneous leishmaniasis.

METHODS: Two microemulsions were developed, one with the active plant fraction (MFDCM) and a placebo (MPLA). The microemulsions was characterized by mean droplet diameter, polydispersiveness index, zeta potential, refractive index and pH. The topical action of the MFDCM was evaluated in an experimental animal model (*Mesocricetus auratus*), which was infected with *Leishmania amazonensis* and compared with the placebo microemulsion (MPLA) and using Glucantime® (intramuscular and intralesional). The treatment lasted for 30 days and clinical, histopathological and parasitological parameters were evaluated.

FINDINGS: The MFDCM formulation was effective in controlling the evolution of lesions (with an increase in volume of only 25%, compared to a 383% increase for the group without treatment) and presented a moderate inflammatory profile.

MAIN CONCLUSIONS: The topical formulation proved to be as effective as treatment with Glucantime® and showed a significant reduction in parasite load.

Keywords: neglected diseases; pharmaceutical technology; treatment; *in vivo* assay; *Leishmania amazonensis*

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, whose vectorial transmission is through the blood meal of the female phlebotomine sand flies ^(1,2). Cases are regularly registered in 88 countries at a rate of 1.2 million cases per year, thus classifying it as a public health problem ⁽³⁾. Of the 244.005 cases of cutaneous leishmaniasis recorded in 2018, 192.173 were reported by WHO (World Health Organization), and the majority of them occurred in seven countries; Afghanistan, Algeria, Brazil, Iran, Iraq, Pakistan and the Syrian Arab Republic ⁽⁴⁾.

The first therapeutic resource for the treatment of this disease dates from 1912, and was made with tartar emetic, however, it presented severe toxic effects to patients. It was only in 1920 that pentavalent antimony (Sb^{+5}) was introduced; a drug used as the first choice for most infected patients, thus becoming the first drug for leishmaniasis ^(5, 6). In the cases of patients from areas where *Leishmania guyanensis* predominates, the first choice for treatment is pentamidine isothionate. Amphotericin B is recommended when there is no indication for the first two therapeutic substances ⁽⁷⁾.

Nevertheless, these drugs present numerous problems, such as the route of administration (parenteral route), the long period of application and the manifestation of side effects, which, either individually or as a whole, can contribute to the abandonment of treatment and, consequently, resistance of the parasite to the treatment and a reduction in the effectiveness of treatment. The most common reactions are mild to severe, such as myalgia, vomiting, hypotension, acute renal failure and nephrotoxicity ^(7, 8, 9).

The scarcity of more accessible therapeutic options requires the development of new drugs that are safer, more effective and more accessible to patients in any region. One of these alternatives is the use of medicinal plants, which produce a wide variety of secondary metabolites that can be exploited for medicinal purposes ⁽¹⁰⁾. The WHO considers the pharmacological investigation of medicinal plants for the treatment of diseases a priority, since it is estimated that approximately 40% of the drugs currently available on the market were developed directly or indirectly from natural sources, mainly of plant origin ^(11, 12).

Libidibia ferrea (Mart. ex Tul.) var. *ferrea*, which is a native tree in Brazil and is popularly known as “jucá” or “pau-ferro”, has pharmacological properties and is widely-distributed ⁽¹³⁾. Chemical and pharmacological studies of extracts obtained from *L. ferrea* have demonstrated its anti-inflammatory and antioxidant activity ⁽¹⁴⁾, antitumor ⁽¹⁵⁾ antimicrobial and antifungal ⁽¹⁶⁾, hypoglycemic ⁽¹⁷⁾ and wound healing properties ⁽¹⁸⁾.

In the study by Comandolli-Wyrepkowski *et al.* ⁽¹⁹⁾, biological tests were performed *in vitro* and *in vivo* with extracts from different parts of the plant, and the methanolic extract of the fruit of *L. ferrea* showed better antileishmanial activity against promastigote and amastigote forms of *Le. amazonensis* and presented a low cytotoxicity index. The *in vivo* result demonstrated a capacity to control the evolution of lesions by topical application of the tested formulation. However, vehicle optimization is necessary to improve skin permeation by the pharmaceutical formulation and improve this herbal medicine.

The application of nanotechnology in the development of pharmaceutical vehicles has been growing at a rapid pace in recent decades. Microemulsions are promising drug release

systems, since they are spontaneously formed and thermodynamically stable, and widely used for the solubilization and delivery of different therapeutic classes, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs, anesthetics, derivatives of medicinal plants, antimicrobials and antivirals (20, 21, 22, 23, 24).

Thus, the present study aims to develop and characterize a topical microemulsion containing a fraction of the methanolic extract of the fruit of *L. ferrea* and evaluate its *in vivo* antileishmanial potential using hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Le. amazonensis*, in an attempt to develop a therapeutically effective formulation which is also more accessible for use in the treatment of American cutaneous leishmaniasis (ACL).

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Fractionation

Samples of the fruit of *Libidibia ferrea* were obtained in Manaus, Amazonas state, Brazil (3° 4'34 "S 60° 0'11" W). An exsiccate of the plant species was made, which was deposited in the Herbarium of the National Institute of Amazonian Research (INPA) and identified under the number 246150. The fruits were sorted and, after removal of the seeds, dried in a forced circulation oven, at a temperature of 40 °C. After drying, they were sprayed and extracted with the solvents hexane and methanol ⁽¹⁹⁾.

The dichloromethane fraction (DCM) of the *L. ferrea* extract was obtained using liquid-liquid partition. We used 20 g of the methanolic extract solubilized in 200 mL of H₂O:MeOH (9:1) and did three extractions with each of the solvents used in the partition (hexane and dichloromethane). This procedure allowed a preliminary separation of the chemical constituents for the evaluation of antileishmanial activity using the DCM fraction. The fraction was concentrated using a rotary evaporator (Yamamoto[®]).

Preparation of the Microemulsified Formulations

The microemulsions (ME) were developed based on isopropyl alcohol, Tween[®] 20, distilled water, oleic acid and the DCM fraction of *L. ferrea* at 2%, and were stirred by magnetic stirring for about 2 minutes, until the complete mixture of the components in a homogeneous, transparent and single phase system. Two microemulsions were prepared: a microemulsion with the DCM fraction of *L. ferrea* (MFDCM) and a placebo microemulsion without the extract (MPLA). The MFDCM formulation is in the process of being patented and is registered with

the National Institute of Industrial Property - INPI, under the process number BR 10 2019 000809 1.

Characterization of the Microemulsion

The mean size of the droplets, the polydispersion index (PDI) and the zeta potential (ζ mV) of the droplets of the microemulsion were determined by means of light scattering (DLS) at 25 °C with a 659 nm wavelength light beam, using Zetasizer Malvern® equipment. The samples were prepared by diluting 20 μ L of microemulsion in 980 μ L of distilled water⁽²⁵⁾.

To measure the refractive index of the microemulsified formulations, an Abbe type refractometer, previously calibrated with distilled water, was used.

The determination of the pH of the microemulsion was performed in the formulations themselves, with the use of a calibrated pHmeter and presented a pH 4.0 – 7.0 at 25 °C.

***In vivo* Assay**

The animal model established for cutaneous leishmaniasis were 36 adult (over 90 days), male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), which weighed 150 g each. The animals were obtained from the INPA central vivarium, and were kept in polypropylene cages in conditions suitable for their maintenance, with diet and water *ad libitum* and free of pathogens. The project was approved by the Research Ethics Committee for Animal Use (CEUA/INPA), under the approval number 009/2015.

On day 0, hamsters were infected in the snout via subcutaneous inoculation of 100 μ L of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) [10^6 cel/mL parasite]. After inoculation, the animals were separated and grouped in labelled cages and kept in the vivarium at a controlled temperature (22–24 °C). Treatment began 20 days after infection and lasted for 30 consecutive days, during which the hamsters received applications of the test formulations. The animals were separated into six experimental groups of six animals as follows: Group I (MFDCM) was infected and topically treated with the microemulsion of the DCM fraction at a dose of 50 mg.day⁻¹; Group II (MPLA) was infected and topically treated with the placebo microemulsion; Group III (LGIM) was infected and treated with Glucantime® via intramuscular injections (IM) at a dose of 20 mg (Sb⁺⁵).Kg.day⁻¹; Group IV (LGIL) was infected and intralesionally treated (IL) with Glucantime® at a dose of 20 mg (Sb⁺⁵).Kg.day⁻¹; Group V (LST) was infected and left untreated (negative Control); and Group VI (SLST) was not infected and received no treatment.

Analyses and Clinical Parameters

Clinical evaluation was performed daily to measure the total volume of the lesions with the aid of a digital caliper (Zaas[®] Precision) in order to record the progression of lesions. The morphological aspects of the lesions were documented in photos to compare their evolution.

The animals were euthanized with Vetnil[®] (ketamine hydrochloride 10%) and Syntec[®] (Xylazine 2%), as recommended by the INPA Animal Research Ethics Committee.

After euthanasia, tissue sampling of the lesions was performed for the histological study. The samples were fixed in a buffered 10% formaldehyde solution. The fragments were processed for paraffin and stained with hematoxylin and eosin (HE) ⁽²⁶⁾. The slides obtained were read according to the histopathological description of Magalhães *et al.* ⁽²⁷⁾. The inflammatory dermal pattern and cell population were estimated histologically. The inflammatory infiltrate was measured in crosses as follows: (–) without inflammatory infiltrate; (+) isolated focus of inflammatory cells; (+ +) isolated or coalescent inflammatory infiltrate areas; (+ + +) diffuse inflammatory infiltrate areas ⁽²⁸⁾.

For viability of the parasites in culture medium, other lesion fragments were grown in biphasic culture medium NNN ^(29, 30) for seven days at 25 °C. The parasitic concentration was obtained by semi-quantitative count, considering the values: 0 –absence of parasites; 1 – from 1 to 10 parasites; 2 – between 10 to 100 parasites, and 3 – greater than 100 parasites per field.

To evaluate the parasite load, tissue samples from the area of the lesions were sectioned and used for smears by fixing on a slide (imprints). The slides were stained with Giemsa (Sigma). The density of parasitic macrophages and parasitic load (amastigotes) were estimated by recording images of 25 fields observed in optical microscopy under immersion oil (1000 X), according to the methodology in Wyrepkowski *et al.* ⁽¹⁹⁾, and quantitatively analyzed by Image J[®] software (NIH, Maryland, USA). The percentage ratio of parasites was obtained by the index

$$\% \text{ parasites} = \bar{X} \text{ amastigotes} \frac{100}{X_{max}}$$

Statistical Analysis



The GraphPad Prism software version 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) was used for statistical analysis. The analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests were used and 95% confidence intervals were considered significant.

RESULTS

Microemulsions were formed spontaneously by magnetic stirring of the components, without the need for heating. In relation to the macroscopic aspect, MPLA and MFDCM were monophasic, and translucent (i.e., with light yellow and dark brown coloration, respectively). The pH value found in the MPLA microemulsion was equal to 5.2 and, when the DCM fraction of *L. ferrea* was incorporated, the pH decreased to 4.7. The refractive index values of the microemulsions MPLA and MFDCM were 1.421 and 1.419, respectively (Table 1).

The MPLA formulation presented a mean droplet size of 2.7 nm, and 99.8% of the measured droplets were in the range of 1 to 5 nm, which generated a polydispersity index (PDI) of 0.4. Despite the incorporation of the DCM fraction, the MFDCM presented a mean droplet size of 2.3 nm, with 97.3% of the droplets in the range of 1 to 5 nm (Table 1). However, there was an increase to 0.9 in the PDI, which can be explained by the presence of droplets with 1100 to 1300 nm, but these correspond to less than 3% of the formulation.

Table 1 – Analysis of dispersed droplets of the placebo microemulsion (MPLA) and those incorporated with the dichloromethane fraction of *Libidibia ferrea* (MFDCM).

Parameter	MPLA	MFDCM
Macroscopic aspect		
	CLY	CDB
pH	5.2	4.7
Refraction index	1.421	1.419
Droplet size (nm)	2.7	2.3
Polydispersity index (PDI)	0.4	0.9

CLY = Clear, light yellow; CDB = Clear, dark brown.

To evaluate the therapeutic effect of topical microemulsions on the lesions of hamsters (*M. auratus*) infected with *Le. amazonensis*, clinical evolution was analysed during the experiment, evaluated the parasite load and performed histopathology of the tissue at the end of 30 days of treatment. Twenty days after the inoculation period, the animals presented a characteristic clinical aspect with histiocytic lesions (leishmaniotic histiocytoma), which is common in ACL (Figure 1).

Comparing the volume of the MFDCM formulation with the LGIM and LGIL groups, it was observed that there were no statistically significant differences. On the 10th day of treatment, the MFDCM group showed statistical significance in relation to the LMPLA group (placebo microemulsion), with $p < 0.05$ and, from the 11th day, the MFDCM showed statistical difference against the LST (negative control group) with $p < 0.001$. As for the comparison between groups LMPLA and LST, there were no statistical significances, which demonstrates that the placebo formulation does not interfere with therapy (Figure 2).

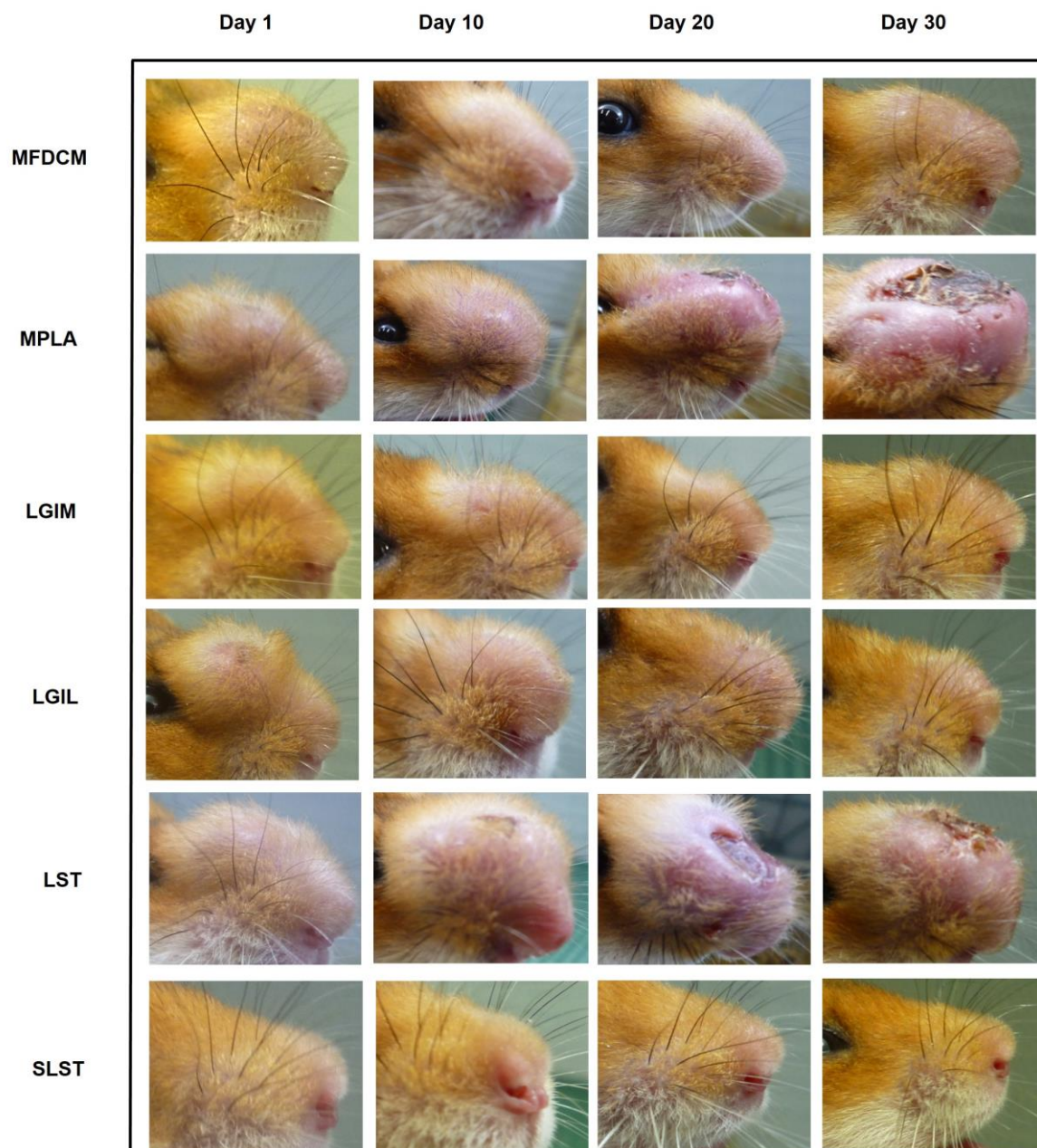


Figure 14. Macroscopic clinical aspect of skin lesions in *Mesocricetus auratus* infected with *Leishmania amazonensis* from the initial period to the end of treatment. **MFDCM** – Topical treatment with microemulsion incorporated with the DCM fraction from *Libidibia ferrea*. **MPLA** – Topical treatment with placebo

microemulsion. **LGIM** – Intramuscular treatment with Glucantime®. **LGIL** – Intralesional treatment with Glucantime®. **LST** – Negative control, absence of treatment. **SLST** – animals without infection.

The negative control group (LST) presented an exacerbated clinical aspect with a mean increase of 383% in the total volume of lesions compared to the first day until the end of treatment (Figure 2). The MFDCM group had their development of the lesion controlled during the experimental period (only a 25% increase after 30 days of treatment) and presented uniform and discrete nodular lesions (Figure 1). The MPLA group evolved clinically with ulcerated lesions of a volume from 1170 to 2100 mm³, similar to the LST group with the presence of ulcers, which ranged from 350 to 800 mm³.

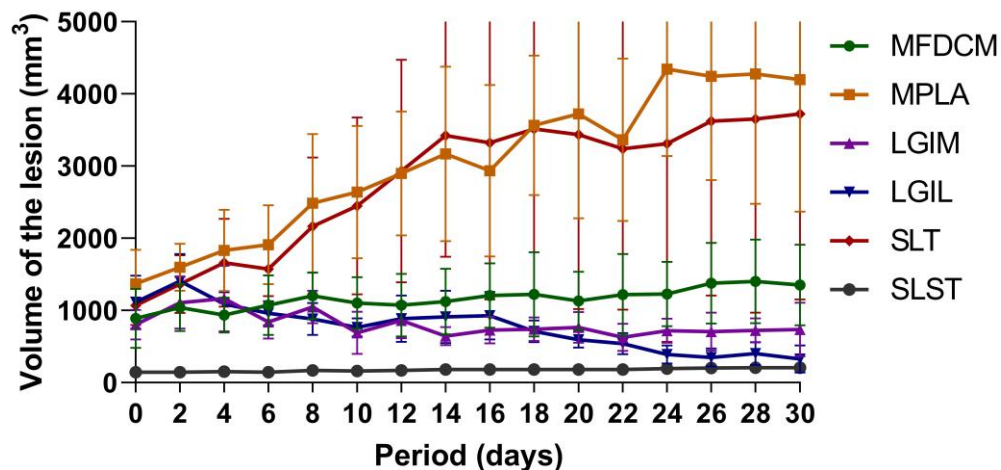


Figure 15. Clinical evolution of the volume of the lesions in *Mesocricetus auratus* infected on the snout with *Leishmania amazonensis*, during localized treatment. **MFDCM** – Topical treatment with microemulsion incorporated with the DCM fraction from *Libidibia ferrea*. **MPLA** – Topical treatment with placebo microemulsion. **LGIM** – Intramuscular treatment with Glucantime®. **LGIL** – Intralesional treatment with Glucantime®. **LST** – Negative control, absence of treatment. **SLST** – animals without infection.

The dermal inflammatory profile and cell populations were estimated by histological analysis of skin tissue sections of stained with hematoxylin and eosin (H&E). The animals from the MFDCM group showed moderate inflammatory infiltrate (+ +) deep in the dermis and histiocyte in the hypodermis (Figure 3A). The MPLA group also showed moderate inflammatory infiltrate (+ +), but a large number of histiocytes in the hypodermis (Figure 3B). The group treated intralesionally with Glucantime® (LGIL), despite presenting the best result in clinical evolution, in the histological aspect it presented an intense inflammatory infiltrate (+ +), a presence of polymorphonuclear cells and histiocyte (Figure 3C).

The intramuscular injection of Glucantime® (IGIM) showed mild inflammatory infiltrate (+) in the superficial layer of the dermis and a presence of histiocytes, and moderate inflammatory infiltrate (++) in the hypodermis (Figure 3D). The negative control group (LST) showed intense inflammatory infiltrate (+++), with 75% infiltration of the area, a presence of polymorphonuclear cells and histiocytes (Figure 3E). On the other hand, the control group without infection (SLST) showed no signs of inflammatory infiltrate and maintained a preserved histoarchitecture of the skin (Figure 3F).

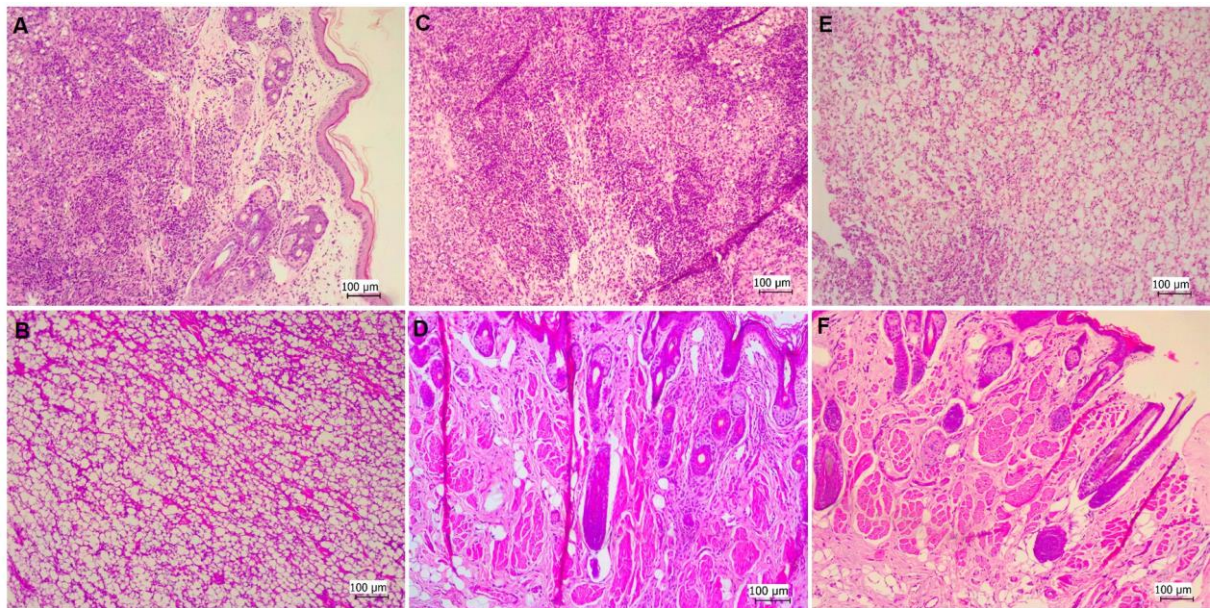


Figure 3. Photomicrography of the skin of the snout of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania amazonensis* showing inflammatory infiltrate in the tissue by acute and chronic nonspecific inflammatory cells (H&E 100x). A) animal treated with microemulsion with an active fraction of *Libidibia ferrea* (MFDCM) 50 mg.day⁻¹ with topical application; B) animal treated with microemulsion placebo (MPLA) with topical application; C) animal treated with Glucantime® 20 mg (Sb⁺⁵).Kg.day⁻¹ intralesional application (LGIL); D) animal treated with Glucantime® 20 mg (Sb⁺⁵).Kg.day⁻¹ intramuscular application (LGIM); E) treatment-free negative control (LST); F) infection-free control (SLST).

Parasitic viability was verified semi-quantitatively by isolation in NNN culture medium. The highest scores of viable flagellated parasites were observed for the LMPLA and LST groups (score = 3), after the 7-day incubation period. The MFDCM, LGIM and LGIL groups showed a score <2, proving the reduction of viable parasites (Figure 4).

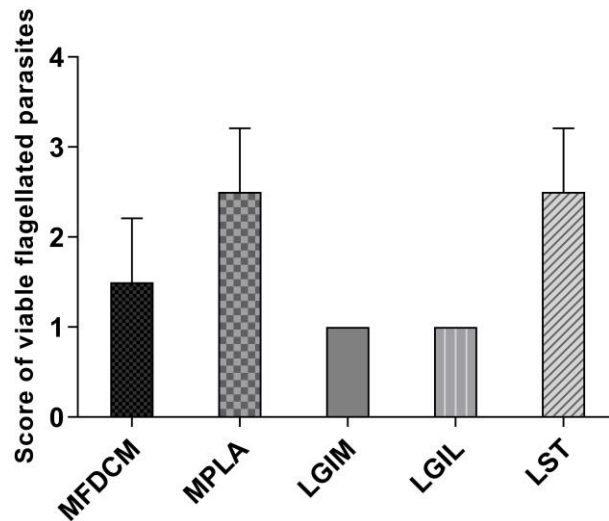


Figure 4. Score of viable parasites visualized in NNN culture medium (Novy-McNeal-Nicolle) seven days after sowing fragments of the lesions of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania amazonensis* from the experimental groups. Score as follows: 0 = absence; 1 = 1 to 10 parasites/field; 2 = 10 to 100 parasites/field and 3 = >100 parasites/field.

The evaluation of the parasite load was confirmed by the analysis of the fields containing biological material from the imprint smears on slides, which are parameters determined by the presence of the intracellular parasite and its relative abundance in regards to the different samples. The MFDCM group did not present statistical significance when compared with the LGIM and LGIL groups (Figure 5). When compared with the LST group, the MFDCM group has a high level of statistical significance, with $p < 0.001$. From these results, it is possible to observe the reduction of parasitic load.

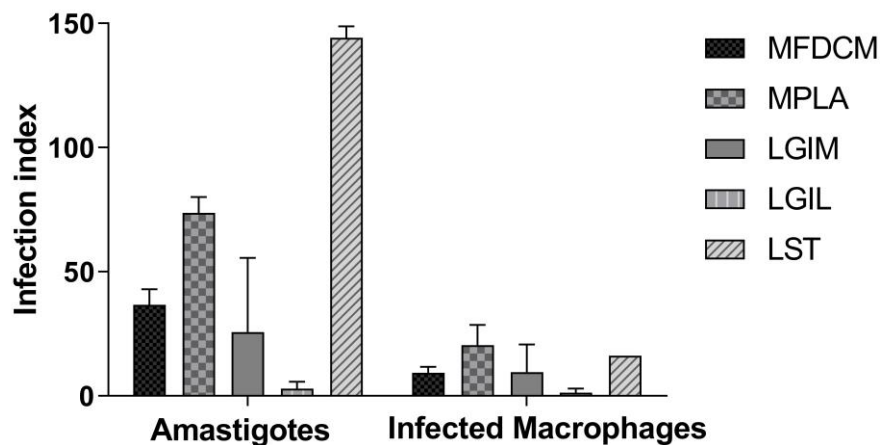


Figure 5. Indices of the relative abundance of amastigotes and the percentage of infected macrophages (parasitic load) visualized and quantified by optical microscopy (1000x) in the imprint smears of tissues on slides from the lesions of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania amazonensis*.

DISCUSSION

The therapeutic arsenal for treating tegumentary leishmaniasis is limited due to its invasive route of administration, in addition to numerous undesirable effects, and thus suggests a need for therapeutic alternatives, such as the use of natural products aligned with new pharmaceutical formulations^(7,10). Microemulsified systems are an interesting possibility for increasing the stability of formulations and controlling cutaneous release, which would therefore make the treatment of this disease more efficient and less painful⁽²⁴⁾. According to the results of the present study, a topical microemulsion with a DCM fraction obtained from *L. ferrea* showed a promising therapeutic effect.

The MFDCM and MPLA microemulsions were stable throughout the characterization study, according to the characteristics of the microemulsified formulations⁽²⁵⁾. The evaluation of the hydrogen potential (pH) is an important parameter that indicates the chemical stability of the formulation. Normally, a low pH value is proportional to the large amount of fatty acids in the systems⁽³¹⁾. The pH value found in the microemulsion with the DCM fraction of *L. ferrea* was less than 5.0. This factor is possibly due to the presence of certain phenolic groups already identified in this plant⁽¹⁹⁾. The pH values are very close to the skin compatibility range, which is 5.0 to 5.5⁽³²⁾. This compatibility was confirmed during the entire period of application of the formulations in the experimental animals, since no signs of skin irritability were observed.

The refractive index values of the two microemulsions indicated that the system can be classified as isotropic, i.e., it does not present birefringence. The inability to divert the incident light plane proves the transparency of the microemulsions ⁽³³⁾.

The polydispersity index (PDI) is used as a basis for the average size of the sample heterogeneity. The PDI value of this MPLA was 0.4, which is a common value in monodisperse samples; PDI values of < 0.5 and > 0.7 are common in a distribution of particles of different sizes ⁽³⁴⁾. As for the size of the droplets measured, it can be observed that the droplet sizes are compatible with microemulsified systems, since mean values are less than 100 nm ⁽³⁵⁾.

As for the zeta potential values, the larger the module, the greater the repulsion between the droplets, which, when they collide less, decrease the coalescence and increase the stability of the system ⁽³⁶⁾. Although the MPLA and MFDCM formulations presented low zeta potential values, -7.9 mV and -8.8 mV, respectively, this finding is not relevant, since a microemulsion, by definition, is a thermodynamically stable system ⁽³⁷⁾.

The clinical evolution of the morphological progression of lesions is an important parameter and lesions were monitored daily in this study, since, in cutaneous leishmaniasis, the evolution of histiocyte lesions can be observed in hamsters infected with *Leishmania* sp. in order to ascertain whether they remain nodular or become ulcerated lesions ⁽³⁸⁾. Furthermore, some animals can present lesions with abscesses, which indicates activation of the inflammatory process ⁽³⁹⁾.

The MFDCM formulation showed a very positive result, since there was no statistical difference when compared with the groups treated with Glucantime[®]. In addition, this microemulsion was administered topically and the treatments with the standard drug were systemic, which can trigger systemic adverse reactions ⁽⁴⁰⁾.

The LGIM and LGIL groups showed discrete nodular lesions with a significant reduction, where the former showed a reduction of approximately 20%. In contrast, the group with intralesional administration of Glucantime[®], despite being the most invasive route of administration, showed a 77% reduction in lesions.

According to the study by Comandolli-Wyrepkowski *et al.* ⁽¹⁹⁾, which was performed with hamsters infected with *Le. amazonensis* and submitted to topical treatment with a hydrogel containing the methanolic extract of *Libidibia ferrea*, the animals demonstrated control of the development of lesions, similar to our results with the MFDCM group.

The presence of polymorphonuclear cells, as observed in the LGIL group, may be related to an inflammatory response in order to try to eliminate *Leishmania* parasites ⁽⁴¹⁾. On the other hand, the intense inflammatory infiltrate plus the presence of polymorphonuclear cells

and histiocytes shown in the negative control group (LST) is a result similar to those found in the literature, since, in the histological perspective of skin biopsies of cutaneous leishmaniasis, patients tend to present dense chronic inflammatory infiltrate with or without parasite amastigotes⁽⁴²⁾.

Although the MFDCM, LGIM and LGIL groups showed a reduction in parasite load, none of the groups presented parasitological cure. Although, it should be taken into account that this is the best model of experimentation, nevertheless it is also more susceptible to a variety of intracellular pathogens⁽⁴³⁾.

The study with the MFDCM microemulsion proved to be very promising, suggesting even a future topical association to reduce the systemic dose of medications, such as Glucantime[®], which is recommended by the Brazilian Ministry of Health. Synergistic treatments are an alternative in the therapy of diseases such as Leishmaniasis, for example, Soto *et al.*⁽⁴⁴⁾ studied a combination therapy using pentamidine isethionate and miltefosine administered to patients with cutaneous leishmaniasis, and obtained positive results. Therefore, the use of the MFDCM formulation could potentiate antimony therapy and permit a reduction in the dose of the first-choice drug, thus minimizing the period of treatment and adverse reactions in patients affected by cutaneous leishmaniasis.

CONCLUSION

After 30 days of topical treatment, the animals treated with MFDCM microemulsion showed control in the evolution of lesions, a moderate inflammatory profile and a reduced parasite load when compared to animals in the negative control group (LST) or those that received only a placebo (MPLA). When compared to animals treated with Glucantime[®], either by intramuscular route (LGIM) or intralesional route (LGIL), there was no difference in therapeutic efficiency between them. Therefore, considering the combination therapies for diseases affected by pathogens, it is suggested that, in future studies, the synergistic action of the MFDCM formulation and *meglumine antimoniate* be evaluated, in order to optimize the therapeutic scheme and reduce doses, thus minimizing the number of adverse reactions during systemic treatment applied to patients with cutaneous leishmaniasis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM for financial support. We also thank Matthew Miller for the translation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

BBJ, CDCW, CCS, MPL and FGP participated in conducting the study and writing the manuscript. JFMB participated in the histopathological analysis. BBJ, TPS, FNAR and KSCRS participated in the development of formulation and characterization. AMRF, KSCRS and BBJ participated in the review and editing. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasite Vector*. 2012; 5 (1): 276. doi:10.1186/1756-3305-5-276.
2. Hotez PJ, Alvarado M, Basáñez MG, Bolliger I, Bourne R, Boussinesq M, Brooker SJ, Brown AS, Buckle G, Budke CM, Carabin H, Coffeng LE, Fèvre EM, Fürst T, Halasa YA, Jasrasaria R, Johns NE, Keiser J, King CH, Lozano R, Murdoch ME, O'Hanlon S, Pion S, Pullan RL, Ramaiah KD, Roberts T, Shepard DS, Smith JL, Stolk WA, Undurraga EA, Utzinger J, Wang M, Murray CJL, Naghavi M. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2014; 8 (7): e2865. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e35671.
4. WHO - World Health Organization, Leishmaniasis; 2020. Available from: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>.

5. Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesús MN, Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. *Quim. Nova.* 2003; 26 (4): 550-555. Doi:10.1590/S0100-40422003000400018.
6. Lima EB, Porto C, Motta JOC, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana. *An. Bras. Dermatol.* 2007; 82 (2): 111-124. doi:10.1590/S0365-05962007000200002.
7. Brasil. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília; 2017. 191pp.
8. Ferreira CC, Marochio GG, Partata AK. Estudo sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana com Enfoque na Farmacoterapia. *Rev Cient ITPAC.* 2012; 5 (4): 1-9.
9. Rugani JN, Gontijo CMF, Frézard F, Soares RP, do Monte-Neto RL. Antimony resistance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates from atypical lesions associates with increased ARM56/ARM58 transcripts and reduced drug uptake. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019; 114: e190111. Doi: 10.1590/0074-02760190111.
10. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med Chem.* 2011; 46 (10): 4769-4807.
11. Calixto JB, Scheidt C, Otuki M, Santos ARS. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin Emerg Dr.* 2001; 6 (2): 261-279.
12. World Health Organization, The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges; 2011. Available from: <http://digicollection.org/hss/documents/s18063en/s18063en.pdf>
13. Souza LAG. Leguminosas da Amazônia. Jucá – *Caesalpinia ferrea* C. Mart. Manaus, ed. INPA (2007).
14. Falcão TR, Araújo AAD, Soares LAL, Farias IBD, Silva WAVD, Ferreira MRA, Araújo Jr RF, Medeiros JS, Lopes MLDS, Guerra GCB. *Libidibia ferrea* fruit crude extract and

- fractions show anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive effect *in vivo* and increase cell viability *in vitro*. Evid Based Complementary Altern Med. 2019; 2019.
15. Freitas CC, Ximenes NCA, Aguiar JS, Nascimento SC, Lins TUL, Magalhães LR, Coelho LCBB, Carneiro-da-Cunha MG, Gonçalves-Silva T, Correia MTS. Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart.exTul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. Evid Based Complementary Altern Med. 2012; 2012.
 16. Sampaio FC, Pereira MSV, Dias CS, Costa VCO, Conde NCO, Buzalaf MAR. *In vitro* antimicrobial of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. J Ethnopharmacol. 2009; 124 (2): 289-294.
 17. Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Batista TM, Carneiro EM, Ferreira F, Costa J, Soares LAL, Sá MDC, Souza TP, Wanderley AG. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. J Ethnopharmacol. 2011; 137 (3): 1533-1541.
 18. Carvalho FG, Sampaio JPS, Araújo MMS, Pinto LSS, Rocha AJ. Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. Acta Sc Technol. 2016; 38 (2): 137-143.
 19. Comandolli-Wyrepkowski CD, Jensen BB, Grafova I, Santos PAD, Barros AMC, Soares FV, Barcellos JFM, Silva AF, Grafov, A, Franco AMR. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. Acta Amazon. 2017; 47 (4): 331-340.
 20. Aum PTP, Souza TN, Pereira YK, Aum G, Dantas, GTN, Neto AAD. New acid O/W microemulsion systems for application in carbonate acidizing. International J Adv Sci Res. 2016; 1: 182-196.
 21. Figueiredo KA, Mendes RMB, Carvalho ALM, Freitas RM. Microemulsões como sistemas de liberação de fármacos para a via transdérmica: uma prospecção tecnológica. Rev GEINTEC G. 2013; 3 (4) 036-046.

22. Svirskis D, Seyfoddin A, Chalabi S, Kim JH, Langford C, Painter S, Al-kassas R. Development of mucoadhesive floating hollow beads of acyclovir with gastroretentive properties. *Pharm Dev Technol*. 2014; 19 (15): 571-576.
23. Tirnaksiz F, Kayis A, Celebi N, Adisen E, Erel A. Preparation and evaluation of topical microemulsion system containing metronidazole for remission in rosacea. *Chem Pharm Bull*. 2012; 60 (5): 583-592.
24. Tiwary AK, Sapra B, Jain B. Innovations in transdermal drug delivery: formulations and techniques. *Recent Pat Drug Deliv Formu*. 2007; 1 (1): 23-36.
25. Ghorbanzadeha M, Farhadiana N, Golmohammadzadehb S, Karimic M, Ebrahimid M. Formulation, clinical and histopathological assessment of microemulsion based hydrogel for UV protection of skin. *Colloid Surface B*. 2019; 179: 393–404.
26. Bancroft JD, Stevens A. *Wiley-Liss Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone. New York/London/San Francisco/Tokyo.1996.
27. Magalhaes AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa AJML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*, padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Trop São Paulo*. 1986; 28 (4): 253-262.
28. 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*. 2004; 130 (1): 7-12.
29. Novy FG, Macneal WJ. On the cultivation of *Trypanosomabrucei*. *J Infect Dis*. 1904; 1 (1): 1-30.
30. Nicolle GL. Culture du parasite du Boutond'Orient. *C R Acad Sci*. 1908.

31. Bruxel F, Laux M, Wild MMLB, Fraga M, Koester LS, Teixeira HF. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quim Nova*. 2012; 35 (9): 1827-1840.
32. Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito ESTD. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quim Nova*. 2009; 32 (6): 1389-1393.
33. Rossi CGFT, Dantas TNC, Neto AAD, Maciel MAM. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. *Rev Ciênc Exat*. 2007; 26 (1-2): 45-66.
34. Mudalige T, Qu H, Haute DV, Ansar SM, Paredes A, Ingle T. Chapter 11 - Characterization of nanomaterials: Tools and challenges. *Nanomaterials for Food Applications*. Elsevier BV. (2019) 313–353.
35. Formariz TP, Wanczinski BJ, Júnior-Silva AA, Scarpa MV, Oliveira AG. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. *Infarma*. 2004; 16 (1): 44-57.
36. Aunton ME. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre, Artmed. 2001.
37. Okur NS, Apaydin S, Yavasoglu NUK, Yavasoglu AHY, Karasulu HY. Evaluation os skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. *Int J Pharm*. 2011; 416: 136-144.
38. Costa-Filho AV, Lucas IC, R. Sampaio RNR. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonenses*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(4): 424-427.
39. Quintella LP, Passos SRL, Miranda LHM, Cuzzi T, Barros TMBL, Francesconi-Do-Vale AC, Galhardo MCG, Madeira MF, Carvalho MHF, Schubach AO. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentar leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol*. 2012; 167 (4): 837-846.

40. Duque MCDO, Silva JJQ, Soares PAO, Magalhães RS, Horta APA, Paes LRB, Lyra MR, Pimentel MIF, Antonio LDF, Vasconcellos EDCF, Saheki MN, Marzochi MCDA, Valet-Rosalino CM, Schubach ADO. Comparison between systemic and intralesional meglumine antimoniate therapy in a primary health care unit. *Acta Trop.* 2019; 193: 176–182.
41. Herath CHP, Ratnatunga NVI, Waduge R, Ratnayake P, Ratnatunga CN, Ramadasa S. A histopathological study of cutaneous leishmaniasis in Sri Lanka. *Ceylon Med J.* 2010; 55 (4): 106–111.
42. Dias-Polak D, Geffen Y, Ben-Izhak O, Bergman R. The role of histopathology and immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis without discernible Leishman-Donovan bodies. *Am J Dermatopathol.* 2017; 39 (12): 890-895.
43. Tavares NM, Santos DM, Oliveira CID, Brodskyn CI. Estratégias de vacinação contra leishmaniose visceral e cutânea: lições 84 dos modelos experimentais. *Gaz méd Bahia.* 2009; 79 (3): 110-121.
44. Soto J, Soto P, Ajata A, Rivero D, Luque C, Tintaya C, Berman J. Miltefosine Combined with Intralesional Pentamidine for *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med.* 2018; 99 (5): 1153–1155.

6. CAPÍTULO 2

Estudo da atividade *in vitro* das substâncias isoladas de *Libidibia ferrea* em *Leishmania amazonensis* e Citotoxicidade

Bruno Bezerra Jensen^{1,2}, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski², Pamela Emilly Iwabuchi², Maria da Paz Lima³, Felipe Moura Araújo da Silva⁴, Angela Maria Comapa Barros¹, Emerson Lima¹, Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos¹, Antonia Maria Ramos Franco²

¹ Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

² Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

³ Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

⁴ Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, Central Analítica, Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

A busca pelo uso das plantas medicinais está inerente a grande diversidade de metabólicos secundários com finalidade terapêutica para várias doenças. Uma espécie vegetal com inúmeras substâncias candidatas ao desenvolvimento de um fitoterápico, é *Libidibia ferrea*, popularmente conhecida como jucá, nativa no Brasil, com distribuição majoritária nas regiões Norte e Nordeste. Os extratos de diferentes partes dessa planta já mostraram várias atividades biológicas, como, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e até mesmo antileishmania. Em trabalhos anteriores foi possível observar que aplicação da fração diclorometano (FDCM) da *L. ferrea* possui efeito promissor no tratamento da leishmaniose cutânea. Contudo, é de suma importância a exploração das substâncias bioativas e avaliar o efeito das mesmas de forma isoladas, para uma aplicação farmacológica. Sendo assim, o objetivo do estudo é isolar as substâncias majoritárias da FDCM e avaliar a sua atividade antileishmania e citotóxica com macrófagos de linhagem e peritoneais, possibilitando eleger um futuro fitofármaco. A fração DCM foi obtida a partir do extrato metanólico da *L. ferrea* e submetida ao isolamento por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A elucidação estrutural foi a partir dos espectros unidimensionais e bidimensionais de RMN. Em seguida, submetidas aos ensaios biológicos contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e perfil citotóxico com macrófagos de linhagem J774 e peritoneais, pelo método colorimétrico Alamar Blue®. Foram possíveis isolar três compostos, LFD-1, LFD-2 e LFD-3, sendo o composto LFD-1 e LFD-2 caracterizados como metil-galato e de um derivado do ácido fenilpropanoico. Após testadas em ensaio *in vitro* com *L. amazonensis*, foi constatado que a amostra LFD-3 mostrou-se mais ativa que as demais, com IC₅₀ igual a 17,4 µg.mL⁻¹ no período de 72 horas. E quanto a atividade citotóxica, nenhuma das amostras mostram perfil citotóxico. Diante desses resultados, foi possível identificar as substâncias majoritárias da fração DCM de *L. ferrea* e ambas as amostras mostraram atividade antileishmania, e vale ressaltar que uma das substâncias é inédita, sem relatos na literatura. Contudo, se faz necessário a continuação do estudo com a elucidação química do composto LFD-3.

Palavras-chave: bioprospecção; produtos naturais; leishmaniose cutânea; tratamento alternativo.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas que apresentam diferentes manifestações clínico-epidemiológicas e ampla distribuição mundial (MOTA; MIRANDA, 2011). É uma doença causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* sp, transmitida aos humanos através da picada da fêmea do flebotomíneo, também conhecido como mosquito palha (CAMARGOS, 2013). Tal enfermidade é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma doença negligenciada e questão de saúde pública (ROCHA, 2012).

Com relação à farmacoterapia preconizada pelo Ministério da Saúde para essa enfermidade, problemas graves relacionados ao efeito tóxico do tratamento convencional podem comprometer seriamente órgãos vitais. Portadores de cardiopatias são contraindicados a fazer o uso do antimonial pentavalente (Glucantime[®]), pacientes com insuficiência renal correm risco ao se tratar com anfotericina B, e ainda o Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) é contraindicada no caso de gestação e insuficiência hepática (BRASIL, 2017).

Além desse esquema de tratamento por definição de ordem de terapia, existe também a relação por espécies de *Leishmania* circulantes. Em casos de pacientes infectados por *Leishmania braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*, recomenda-se o Glucantime[®] como terapia de primeira escolha, já aqueles pacientes oriundos de áreas onde há predomínio de *Leishmania guyanensis*, a pentamidina é indicada como primeira escolha, enquanto que a anfotericina B torna-se segunda escolha no tratamento (BRASIL, 2017).

Em virtude das mais variadas reações adversas e devido ao longo tempo de tratamento, surge à necessidade da busca por novas alternativas terapêuticas mais baratas e que propiciem um melhor cenário da situação clínica e epidemiológica. Uma dessas alternativas é o uso de plantas medicinais que apresentam propriedades terapêuticas e que são utilizadas pelo homem desde os primórdios da humanidade para os mais diversos fins alimentícios e medicinais (HARDY *et al.*, 2012).

Uma espécie vegetal que apresenta uma gama de atividades farmacológicas é a *Libidibia ferrea*, popularmente conhecida como “Jucá” ou “pau-ferro”, em estudos anteriores demonstram um grande interesse terapêutico pelo fato desta espécie apresentar considerável potencial biológico (FERREIRA; SOARES, 2015). Já são conhecidas as atividades antioxidante e gastroprotetora (ROCHA *et al.*, 2016),

potencial neuroprotetor (CHAGAS-NETO, 2018), uso no tratamento de feridas, contusões, antidiarréicos, anticatarras e agente cicatrizante (COSTA *et al.*, 2016), agente hipoglicemiante (VASCONCELOS *et al.*, 2011) e anti-inflamatório (FALCÃO *et al.*, 2019).

Os trabalhos de Cortez (2004) e Falcão (2010) foram pioneiros na avaliação da inibição do crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* frente aos extratos obtidos de *Libidibia ferrea*. Assim como, o trabalho de Comandolli-Wyrepkowski (2015), que realizou testes biológicos *in vitro* com as frações Hexânica, Diclorometânica (DCM), Acetato de etila e n-butanóica, onde a fração DCM apresentou um melhor resultado antileishmania contra as formas das espécies supracitadas de *Leishmania* e em seguida o desenvolvimento de uma formulação para a aplicação em animais de experimentação.

Os resultados do capítulo anterior corroboraram com a atividade antileishmania ao testar a fração diclorometano de *L. ferrea* através de ensaio biológico *in vivo*. Onde os animais tratados com a formulação tópica com essa fração, mostraram controle na evolução das lesões e redução da carga parasitária, inclusive sem diferença estatística ao comparar com os animais tratados com o medicamento padrão.

Sendo assim, faz-se necessário a continuidade dessa pesquisa com o isolamento e elucidação das substâncias majoritárias da fração DCM obtida do extrato metanólico de *Libidibia ferrea* e avaliação da atividade antileishmania e citotoxicidade, para indicar a possibilidade de um possível candidato terapêutico alternativo para a leishmaniose cutânea, menos agressivo, com maior acessibilidade para todos os níveis socioeconômicos e otimizando a adesão do tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e Fracionamento

Os frutos de *Libidibia ferrea* foram coletados em Manaus, Amazonas, Brasil (3° 4'34 "S 60° 0'11" W). Em seguida, triados, removido as sementes e seco em um forno de circulação forçada, com a temperatura de 40 °C. Após a secagem foram pulverizados e extraídas com os solventes hexano e metanol (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017).

A fração Diclorometano (DCM) do extrato metanólico de *L. ferrea* foi obtida por meio de partição líquido-líquido. Foram utilizados 20 g do extrato metanólico solubilizado em 200 mL de H₂O:MeOH (9:1) e extraído três vezes com cada um dos solventes utilizados na partição (hexano e diclorometano). A fração DCM foi concentrada em rotaevaporador.

Isolamento e Elucidação Estrutural

O isolamento das substâncias foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. As análises em HPLC semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A₅, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV (280 e 240 nm), modulo de combinação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne. Cerca de 40 mg da fração DCM diluída em 100 µL foram analisados em sistema HPLC. Foi utilizada durante a análise uma coluna C18 (5 µm, 250 x 10 mm) da Phenomenex. Como fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B), com gradiente de eluição de 20-80% (B) em 25 minutos, seguido de 100% por mais 10 minutos, totalizando em 35 minutos (3,5 mL.min⁻¹).

Para a elucidação estrutural, as substâncias químicas foram analisadas por espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) unidimensionais (RMN de ¹H e ¹³C) e bidimensionais (HSQC e HMBC), obtidos por meio do espectrômetro da Bruker, Fourier-300 (300 MHz – ¹H e 75 MHz – ¹³C) da Central Analítica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Manutenção de *Leishmania*

Foi utilizada a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), mantidas no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde, INPA. As formas promastigotas de *L. amazonensis* para utilização no bioensaio *in vitro* foram mantidas e cultivadas em meio RPMI 1640 (Himedia) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi) em estufa a 25 °C, de acordo com Jaffe *et al.* (1984).

Ensaio de promastigotas *in vitro*

A atividade antileishmaniana das substâncias obtidas da fração DCM de *L. ferrea* foram avaliadas pela inibição do crescimento e mortalidade de *L. amazonensis*. Para a realização do bioensaio, as formas promastigotas na fase logarítmica tardia foram centrifugadas, lavadas em salina estéril, diluídas e quantificadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas para obter a concentração parasitária de 2×10^6 células/mL, de acordo com Fumarola *et al.* (2004).

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec®; 3% v/v) e em meio RPMI sem adição de SFBi e filtrados em membrane Millipore® 0,22 µm em ambiente estéril. As substâncias foram avaliadas nas concentrações de 7,8 a 125 µg.mL⁻¹. O controle negativo foi o DMSO (1% v/v) e os controles positivos foram Glucantime® (Antimoniato de meglumina), nas concentrações de 60 à 3,8 µg.mL⁻¹ e Pentacarinat® (Isotionato de pentamidina), nas concentrações de 10 µg.mL⁻¹ à 0,063 µg.mL⁻¹.

As atividades das amostras foram avaliadas por contagem de células viáveis após serem adicionadas em diferentes concentrações na presença de 2×10^6 promastigotas/mL e após incubação nos períodos de 24, 48 e 72 h, em estufa a 25 °C. O bioensaio foi realizado em triplicatas e a contagem dos parasitas foi realizada em hemocitômetro. A média do número de células vivas foi utilizada para análise da regressão linear e determinação dos valores da IC₅₀ (concentração inibitória para 50% dos parasitas). Este valor é um importante parâmetro de referência para determinar as amostras mais promissoras, isto é, as que possuem o menor IC₅₀.

Citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774

As células J774 foram cedidas pelo Dr. Paulo Nogueira da FIOCRUZ - Instituto Leônidas e Maria Deane. As células foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL em Câmara de Neubauer. Posteriormente, as células nessa concentração foram adicionadas na placa de 96 poços com RPMI +10% SFB a 37 °C com 5% CO₂ sendo incubadas por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas em triplicata com as substâncias FDCM, LFD-1, LFD-2 e LFD-3 de 125 a 7,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e, como controle positivo Pentacarinat[®] (10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), Glucantime[®] (60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e controle negativo (DMSO 1%) e células mais meio suplementado, posteriormente incubadas por 24, 48 e 72 horas. Decorrido esse tempo, foi adicionado 10 μL de Resazurina (reação de óxido/redução) sendo levadas novamente para incubação por 3h. Por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro. A citotoxicidade seguiu o protocolo adaptada de Nakayama *et al.* (1997).

Citotoxicidade em 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 003/2020 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).

Macrófagos foram incubados na presença da fração DCM de *L. ferrea* e substâncias isoladas (LFD-1, LFD-2 e LFD-3) em diferentes concentrações na placa de 96 poços em estufa a 37°C por 72 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[®] (Resazurina) 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.

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

Após a obtenção de macrófagos peritoneais murinos, essas células foram adicionadas em placas estéreis de 24 poços contendo lamínulas de vidro em cada poço. Em seguida, 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).

Os macrófagos infectados foram incubados na presença das amostras FDCM, LFD-1, LFD-2 e LFD-3 obtidas de *L. ferrea*. As mesmas foram adicionadas aos poços em diferentes concentrações. Após 48 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 100 macrófagos). A avaliação destes parâmetros foi realizada através de observação em microscópio óptico em 1000x de aumento.

Análise Estatística

A multiplicação das células parasitárias foi determinada pelas curvas sigmoidais, utilizando-se o *software* GraphPadPrism 8.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares. Para a análise estatística foi utilizado o teste de variância (ANOVA). O valor da IC₅₀ foi obtido por análise da regressão linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento disponível para a leishmaniose tegumentar nem sempre apresenta um resultado satisfatório e têm se mostrado um desafio expressivo, já que está aliado ao alto custo, via de administração parenteral e efeitos tóxicos. Sendo

assim, contribui para a baixa adesão do paciente ao protocolo terapêutico. Sem dúvida, a busca por novos compostos químicos com ação antileishmania é um dos desafios críticos na área de descoberta de medicamentos e é de interesse mundial (BRASIL, 2017; WINK, 2012).

Uma das alternativas é a utilização das plantas medicinais em exercício de uma atividade terapêutica, pois no âmbito histórico, inúmeras substâncias foram isoladas dessa fonte ou concedendo base para muitos produtos utilizados na rotina médica (ALMASSY *et al.*, 2005; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; SEN; CHATTERJEE, 2011). A *Libidibia ferrea* é uma planta com várias atividades biológicas comprovadas, inclusive indicação à atividade antileishmania, mostrada em estudos preliminares com os extratos e frações da *Libidibia ferrea* frente aos protozoários do gênero *Leishmania* por meio dos ensaios *in vitro* e *in vivo* (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017).

Os resultados do capítulo anterior, corroboraram com os dados supracitados, mostrando que a fração DCM de *L. ferrea* possui potencial terapêutico para o tratamento da leishmaniose cutânea. No presente estudo, após a coleta, triagem e moagem do material vegetal, foi obtido cerca de 4.723 g do epicarpo do jucá sem sementes pulverizado. Em seguida, submetido ao processo de maceração, resultando em 990 g do extrato metanólico (rendimento de 21 %). Cerca de 120 g desse extrato foi utilizado para a partição líquido-líquido, para obtenção de 510 mg (rendimento de 0,43 %) da fração diclorometano (FDCM).

Foram utilizados 120 mg da FDCM para o isolamento dos compostos, por meio da técnica Cromatográfica líquida de alta eficiência no modo semi-preparativa, obtendo as amostras LFD-1, LFD-2 e LFD-3. A partir da análise do Cromatograma obtido por HPLC/Semi-preparativa da amostra FDCM, observou-se 4 picos cromatográficos majoritários (Figura 1).

A LFD-1 foi identificada como um composto fenólico, Metil-galato (Figura 2) por meio dos espectros unidimensionais (RMN de ^1H e ^{13}C) e bidimensionais (HSQC e HMBC). O espectro de RMN ^1H mostrou um único sinal integrado para dois hidrogênios aromáticos em δ 7,05 (2H, sl) e de metoxila em δ 3,82 (s) (Figura 3). No espectro de RMN ^{13}C verificou-se os deslocamentos de carbonos aromáticos, carbonílico além de metoxila (Tabela 1 e Figura 4).

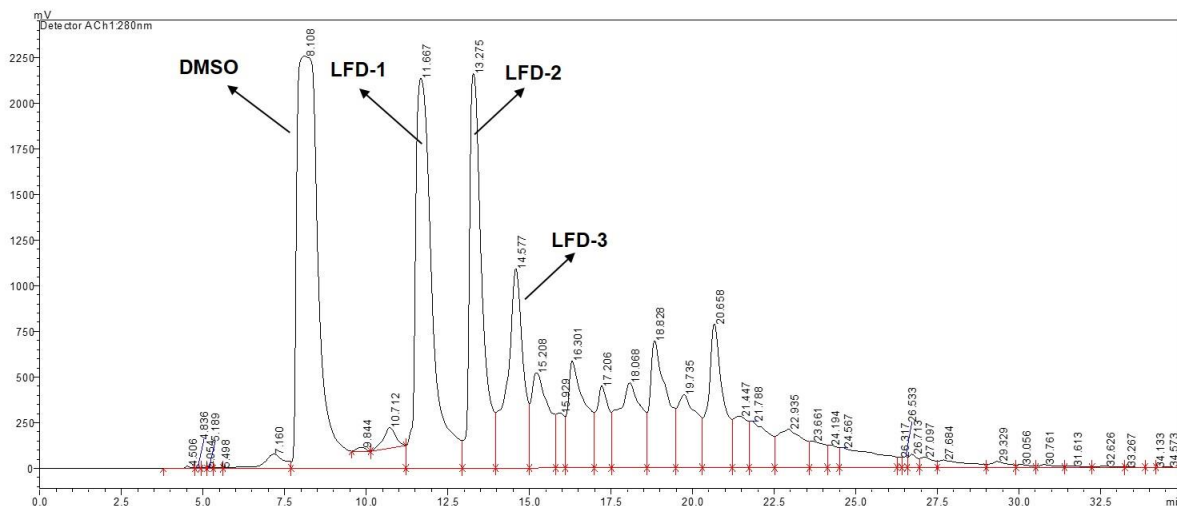


Figura 1. Cromatograma obtido por HPLC/Semi-preparativa para amostra Fração diclorometano (FDCM) do extrato metanólico de *Libidibia ferrea*.

O mapa de contorno HSQC (Figura 5) mostra as correlações entre o hidrogênio em δ 7,05 com os carbonos em δ 108,68 (C-2 e C-6) e entre o hidrogênio δ 3,82 com o carbono em δ 51,0 (OMe). Conforme a tabela 1 e Figura 6, os dados de HMBC mostraram as correlações entre o sinal do hidrogênio δ 7.05 com o deslocamento dos carbonos em δ 167,75 (C-7); 145,09 (C-5); 138,41 (C-4) e 108,68 (C-6) e entre o sinal de hidrogênio δ 3,82 com o deslocamento de carbono em δ 167,75 (C-7).

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos dessa amostra foram semelhantes ao trabalho de Kamatham, Kumar e Gudipalli (2015), confirmando a presença do Metil-galato (3,4,5-trihidroxibenzoato de metila). Essa substância é um éster do ácido gálico, um tanino comumente encontrado nos frutos da espécie vegetal *Libidibia ferrea* e possui atividade antitumoral comprovada (NAKAMURA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2013).

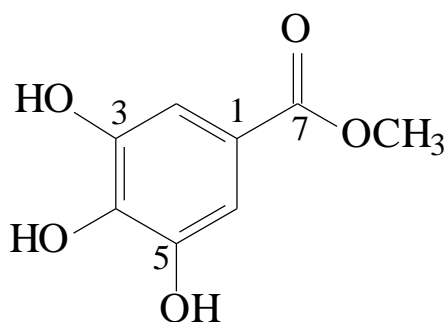


Figura 2. Estrutura química do Metil-galato (LFD-1).

Tabela 1 – Dados de RMN de H, C e HMBC da Metil-galato (LFD-1).

Posição	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	HMBC
1		119,99	
2	7,05 sl	108,68	167,75 (J-3); 145,09 (J-2); 138,41 (J-3) e 108,68 (J-3)
3		145,09	
4		138,41	
5		145,09	
6	7,05 sl	108,68	167,75 (J-3); 145,09 (J-2); 138,41 (J-3) e 108,68 (J-3)
7		167,75	
OMe	3,82 s	51,00	167,75 (J-3)

s - singleto; sl - singleto largo

A *L. ferrea* pertence a família Fabaceae, uma das maiores famílias vegetais que é responsável pela produção de metabólitos secundários em abundância, entre eles, os compostos fenólicos ganham destaque (CUNHA *et al.*, 2017). Esses compostos fenólicos caracterizam-se por possuírem pelo menos um anel aromático com substituições de um ou mais grupos hidroxilo e a sua estrutura pode variar de moléculas simples às moléculas de alto peso molecular (BALANGE; BENJAKUL, 2009; VAQUERO; ALBERTO; NADRA, 2007).

Essa classe fitoquímica apresenta diferentes atividades biológicas confirmadas, como, antioxidante, antiproliferativa, antitumoral, antidiabética, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória, portanto, mostrando-se uma planta de interesse para as Indústrias de Medicamentos e Cosméticos (ALVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; RADUNZ *et al.*, 2020; SARIKURKCU *et al.*, 2020; SELSELEH *et al.*, 2020; TAGHOUTI *et al.*, 2020). Entre os compostos fenólicos, a produção de taninos é muito comum, devido apresentarem propriedades primária em protegerem as plantas contra fungos e bactérias, além de herbívoros (SWAIN, 1979). Esses tipos de compostos também podem apresentar atividade antileishmania (DIAS *et al.*, 2020).

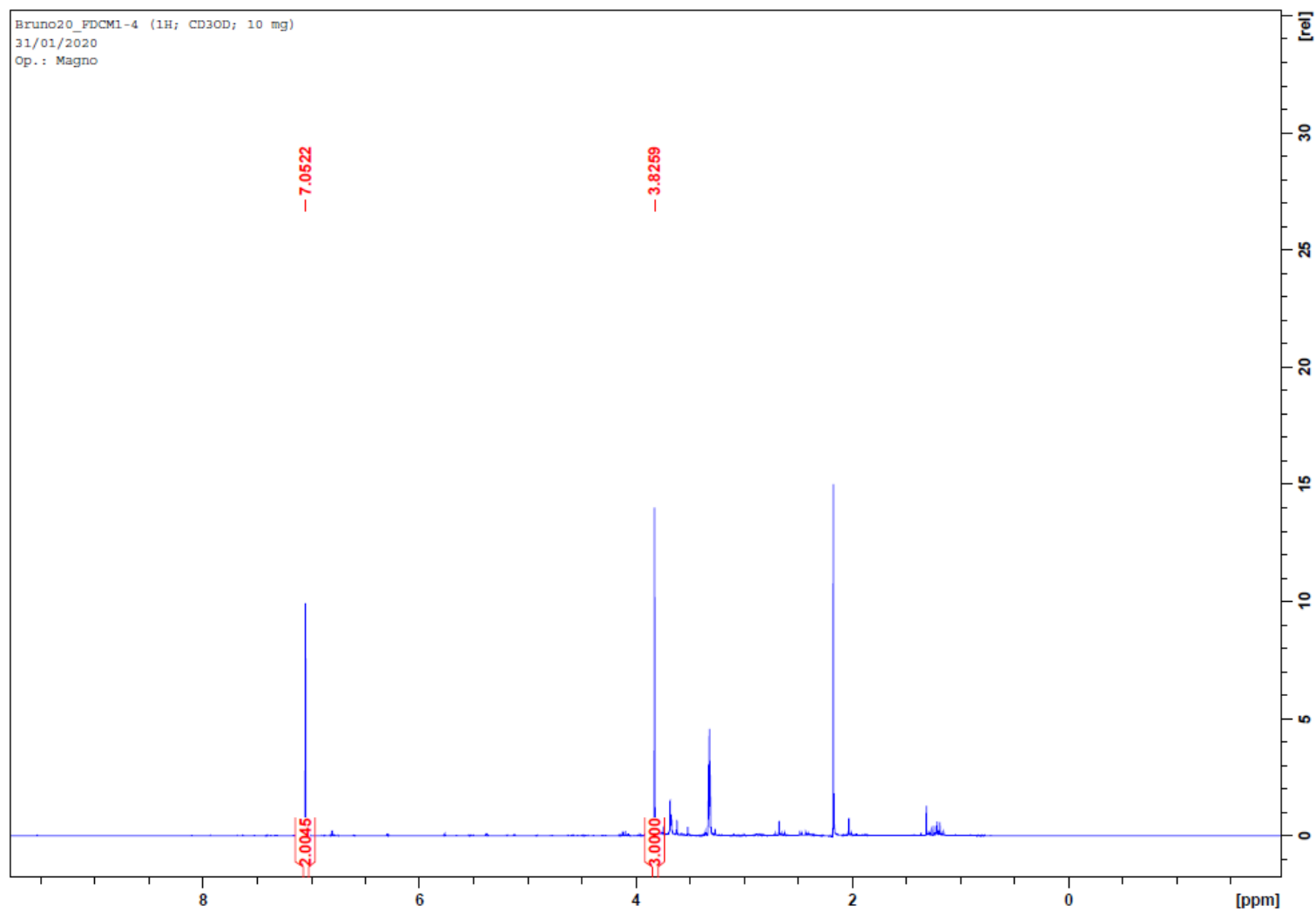


Figura 3. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do Metil-galato (LFD-1).

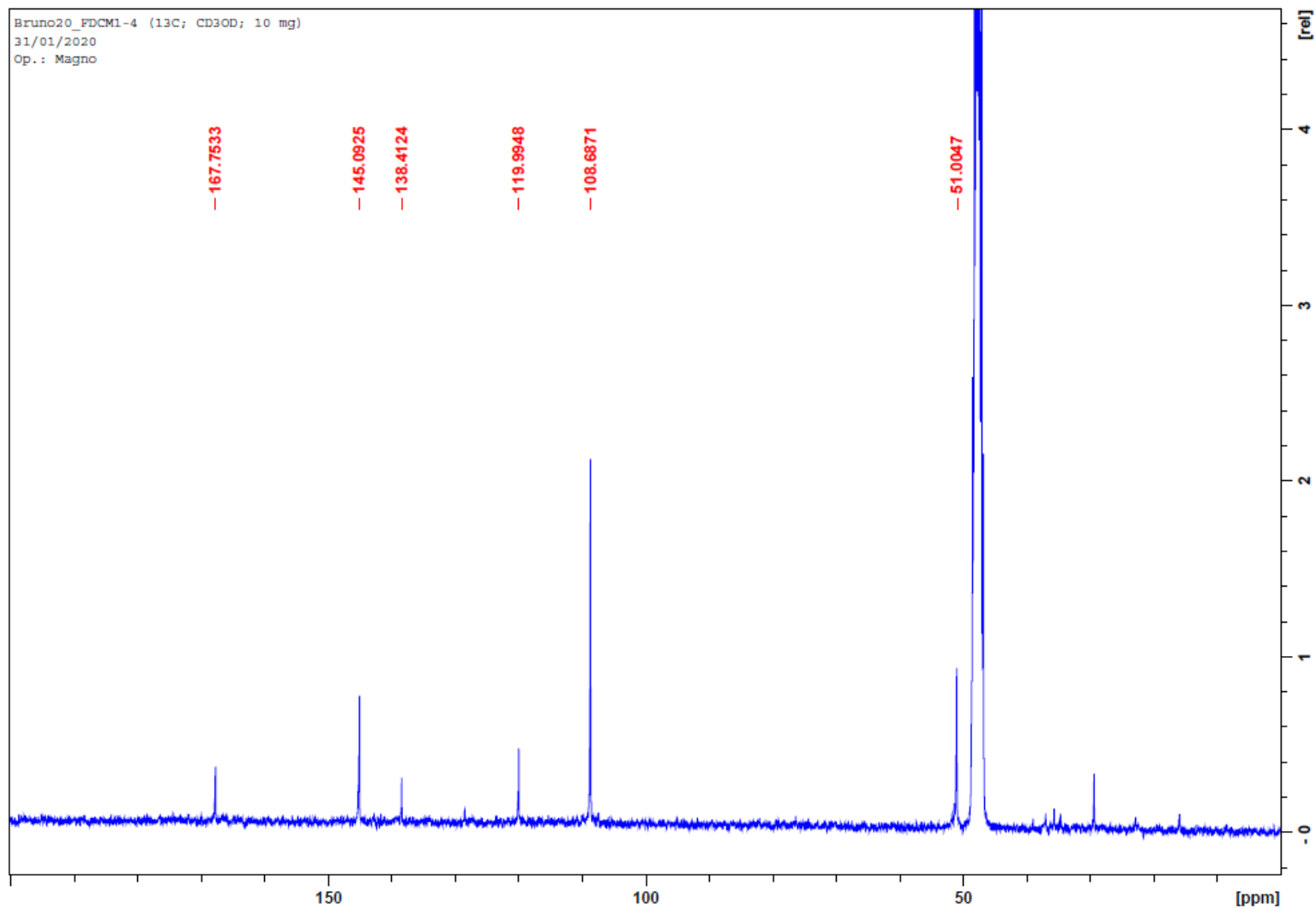


Figura 4. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do Metil-galato (LFD-1).

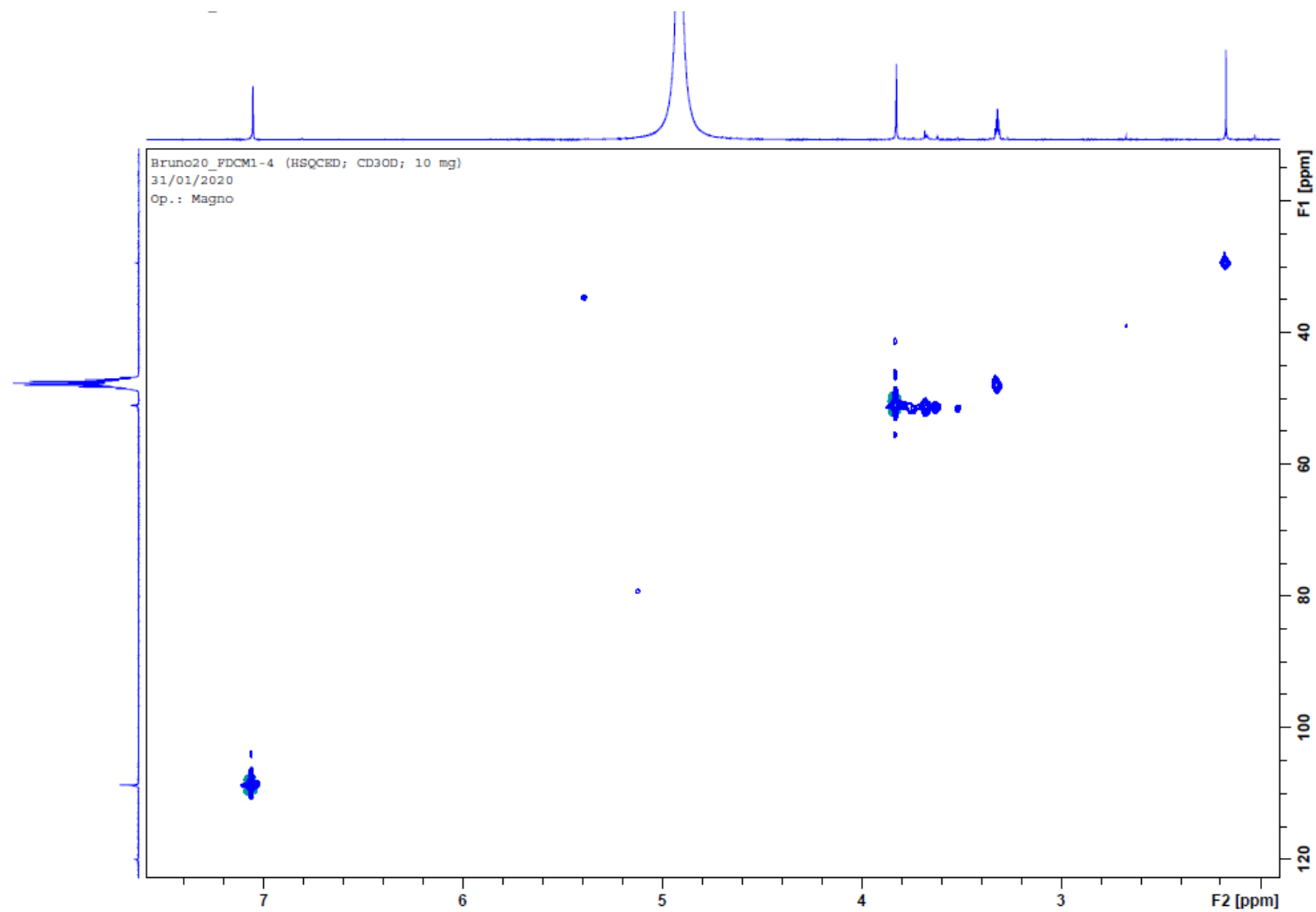


Figura 5. Mapa de correlações de HSQC editado do Metil-galato (LFD-1).

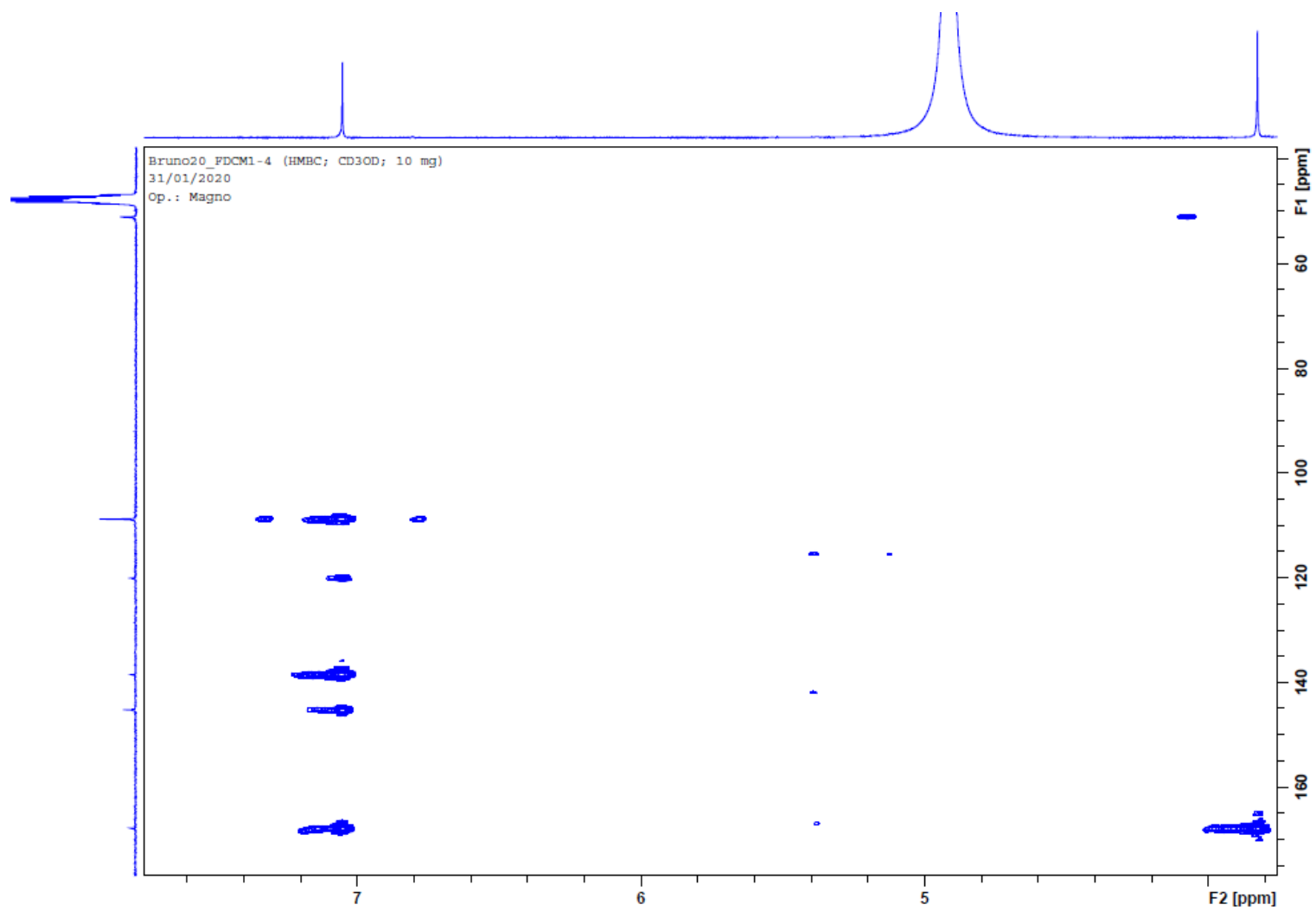


Figura 6. Mapa de correlações de HMBC do Metil-galato (LFD-1).

Quanto a amostra LFD-2 foi elucidada como um derivado do Ácido fenilpropanoico (Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster) também por meio dos espectros unidimensionais e bidimensionais (Figura 7). O espectro de RMN ^1H mostrou sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,84 (2H, d) e δ 7,06 (1H, s), metoxilas em δ 3,70; 3,65 e 3,64 além dos hidrogênios metínicos em δ 5,31 (d) e 5,34 (dl) (Figura 8). No espectro de RMN ^{13}C verificou-se os deslocamentos de carbonos aromáticos, carbonílico, metoxilas e oximetínico além de um metínico mais protegido (δ 34,25) (Tabela 2 e Figura 9).

No mapa de contorno HSQC (Figura 10) pode ser observado as correlações entre o hidrogênio δ 7,06 com o carbono em δ 107,42 (C-3), δ 6,84 com os carbonos em δ 128,99 (C-3' e C-6'), δ 5,34 com o carbono em δ 34,25 (C-8), δ 5,31 com o carbono em δ 78,62 (C-7), entre o hidrogênio δ 3,70 com δ 52,20; δ 3,65 e 3,64 com os carbonos δ 51,76 e 51,37 respectivamente. O experimento HMBC mostrou as correlações entre o sinal do hidrogênio δ 5,31 com o carbono carbonílico do éster δ 169,84 (C-9), carbonos aromáticos δ 165,72 (C-2) e 114,78 (C-1) e metínico δ 34,25 (C-8). O hidrogênio metínico em δ 5,34 correlacionou com os carbonos aromáticos em δ 166,43 (C-2'); 142,80 (C-6); 141,45 (C-5'); 128,99 (C-3' e C-6'); 116,22 (C-1') e 114,78 (C-1) além das correlações com o carbono carbinólico em δ 78,62 (C-7) e carbonílico em 169,84 (C-9). As demais correlações estão presentes na tabela 2 e Figura 11.

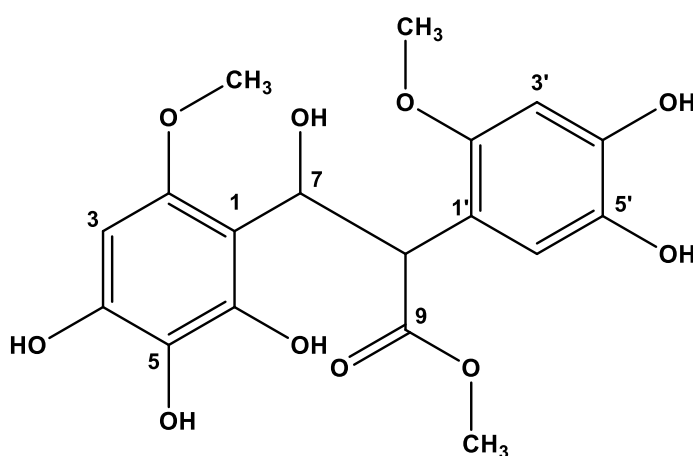


Figura 7. Estrutura química do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).

Tabela 2 – Dados de RMN de H, C e HMBC do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).

Posição	RMN ^1H	RMN ^{13}C	HMBC
1		114,78	
2		165,72	
3	7,06 s	107,42	165,72 (J-2); 145,51 (J-3); 139,20 (J-2) e 114,78 (J-2)
4		139,20	
5		145,51	
6		142,80	
7	5,31 d (1,56 Hz)	78,62	169,84 (J-3); 165,72 (J-3); 114,78 (J-2) e 34,25 (J-2)
8	5,34 dl	34,25	169,84 (J-2); 166,43 (J-3); 142,80 (J-4); 141,45 (J-4); 128,90 (J-3); 116,22 (J-2); 114,78 (J-3) e 78,62 (J-2)
9		169,84	
1'		116,22	
2'		166,43	
3'	6,84 d (0,72 Hz)	128,99	166,43 (J-2) e 141,45 (J-3)
4'		165,53	
5'		141,45	
6'	6,84 d (0,72 Hz)	128,99	166,43 (J-3); 141,45 (J-2) e 34,25 (J-3)
OMe-C2	3,64 s	51,37	165,72 (J-3)
OMe-C9	3,70 s	52,20	169,84 (J-3)
OMe-C2'	3,65 s	51,76	166,43 (J-3)

s – singlete; d – dublete; dl – dublete largo

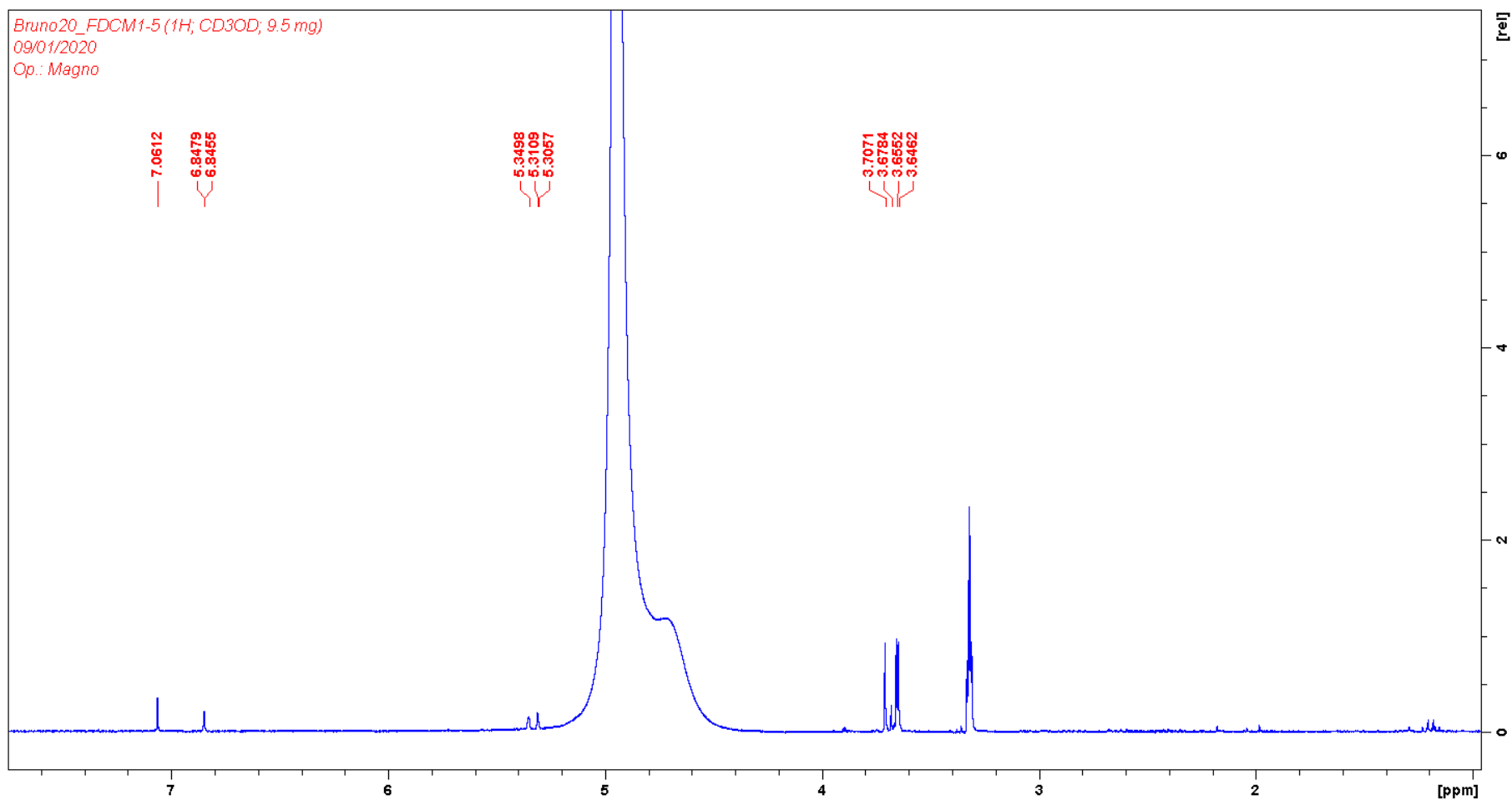


Figura 8. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxi-fenil), metiléster (LFD-2).

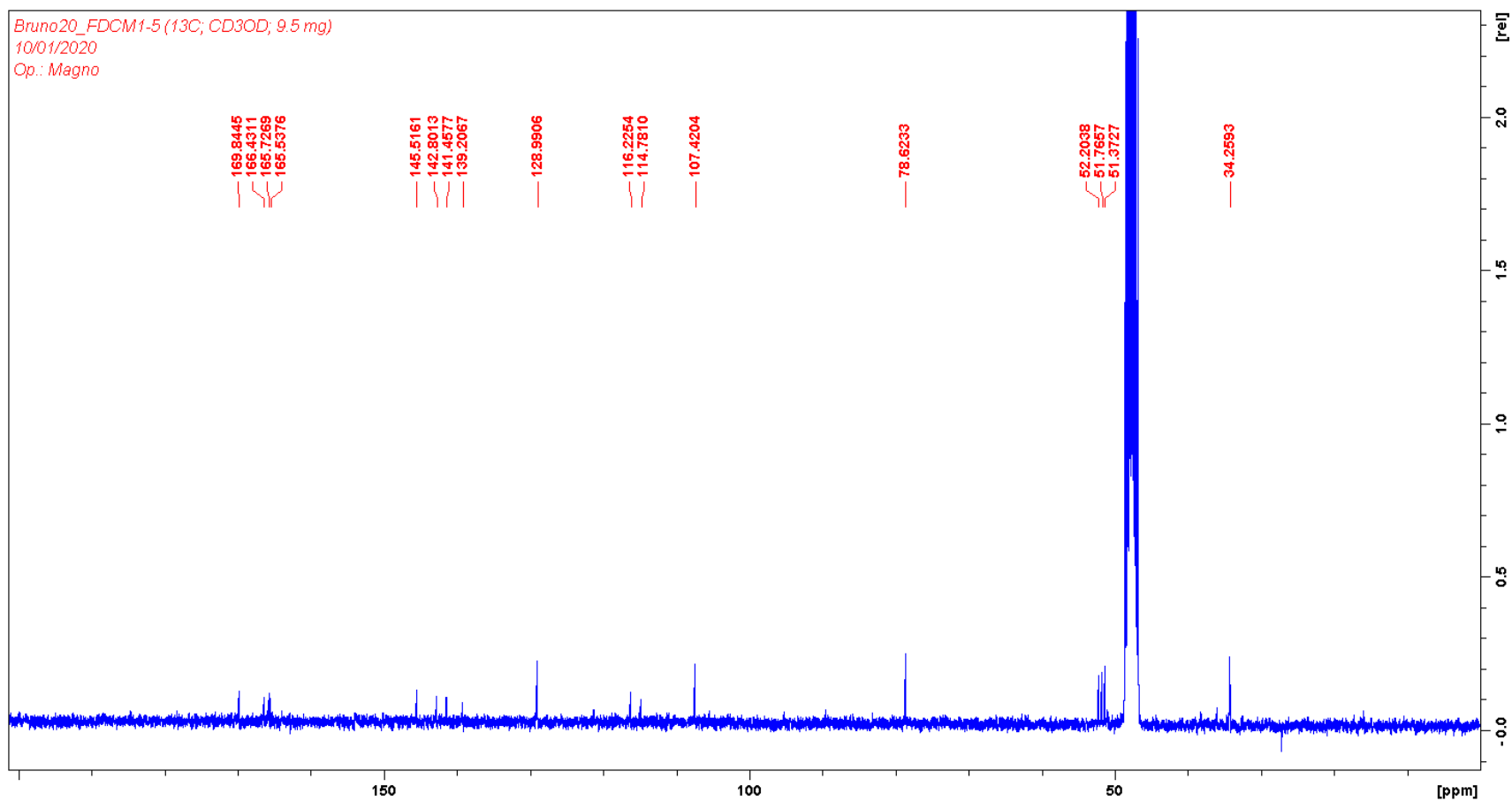


Figura 9. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).

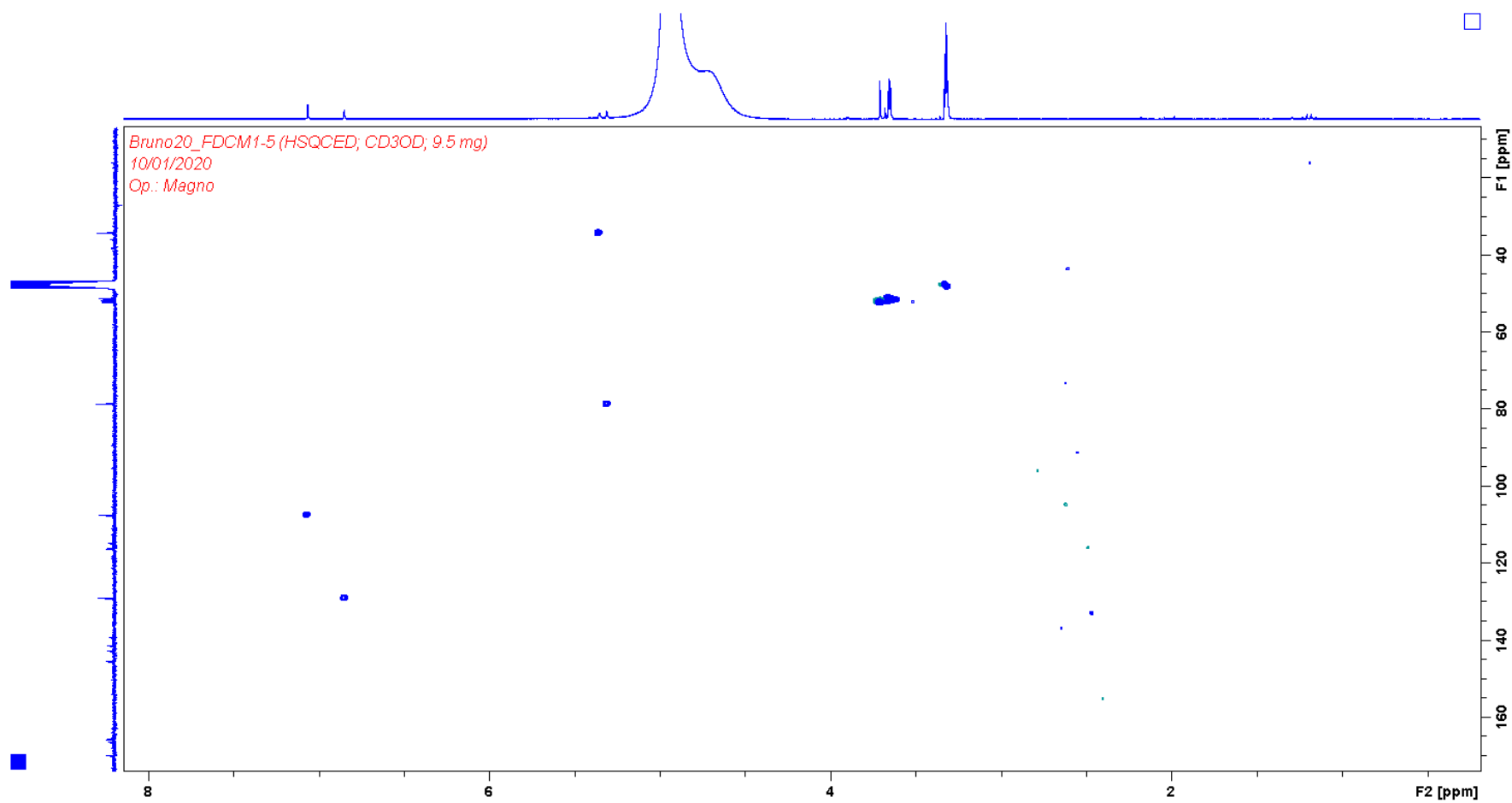


Figura 10. Mapa de correlações de HSQC editado do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).

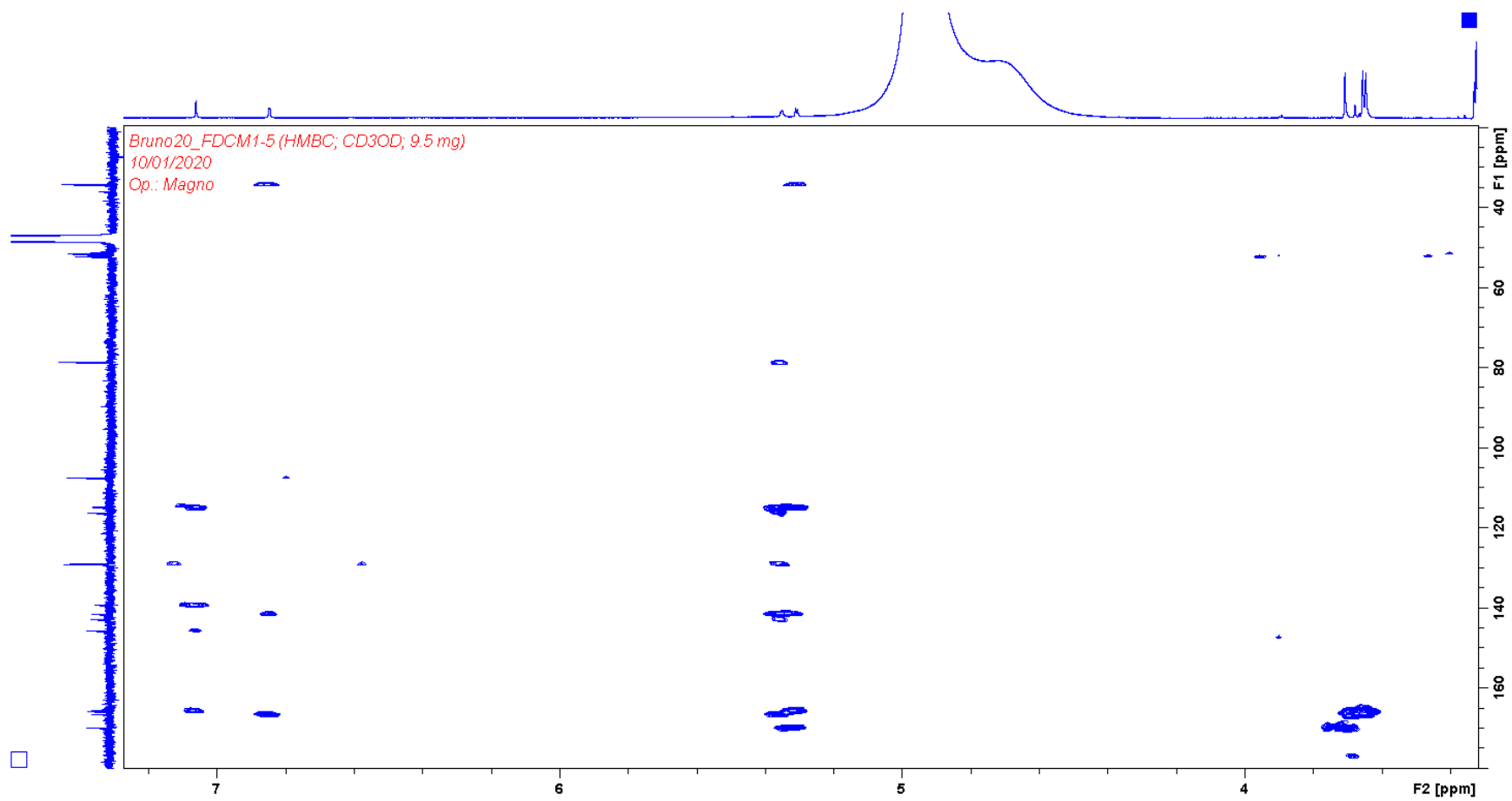


Figura 11. Mapa de correlações de HMBC do Ácido fenilpropanoico, β -hidroxi-2-metoxi, 4,5,6-trihidroxi- α (2'-metoxi-4',5'-dihidroxifenil), metiléster (LFD-2).

Até o momento não foi possível identificar a terceira amostra majoritária, LFD-3. Após o estudo químico, as amostras FDCM, LFD-1, LFD-2 e LFD-3 foram submetidas ao ensaio *in vitro* para avaliar a atividade contra as formas de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A amostra LFD-3 mostrou melhor atividade antileishmania nas concentrações 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduzindo o número de *L. amazonensis* no período de 24 às 72 horas, resultado este, melhor que um dos resultados positivos, Glucantime[®] (7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A FDCM (fração Diclorometano de *Libidibia ferrea*) também mostrou atividade antileishmania nas concentrações 125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, resultado similar ao Glucantime[®] no período de 72 horas. As amostras LFD-1 e LFD-2 promoveram atividade moderada no período de 24 às 72 horas ao comparar com o controle negativo. No entanto, o outro controle positivo, Pentacarinat[®] mostrou-se mais ativo que todas as amostras testadas em todo período de teste (Figura 12).

Os valores de IC_{50} encontrados para as amostras obtidas do extrato metanólico de *L. ferrea* variaram de 17,4 a 71,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no período de 72 horas (Tabela 3). 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 ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Esses dados corroboram com a análise dos resultados das amostras testadas no presente estudo, onde a FDCM e LFD-3 avaliadas contra *L. amazonensis*, foram consideradas ativas, com IC_{50} igual a 30,4 e 17,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no período de 72 horas, respectivamente. Já as LFD-1 e LFD-2 mostraram-se moderadamente ativas, com IC_{50} igual a 71,5 e 60,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no mesmo período que as outras.

Comandolli-Wyrepkowski (2015), avaliou a atividade antileishmania de várias frações obtidas do extrato de *Libidibia ferrea*, a fração DCM apresentou melhor atividade, com IC_{50} igual a 12,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *L. amazonensis*. Esse resultado pode ser comparado com a FDCM testada no ensaio com a IC_{50} maior que esse valor, mas mesmo assim, considerada ativa. Contudo, a LFD-3 mostrou-se mais ativa. Logo, se faz necessário confirmar se a amostra está isolada, pois pode estar ocorrendo ação sinérgica, comumente observada ao aplicar extratos ou frações vegetais em ensaios biológicos. O trabalho de Dias *et al.* (2020), mostraram que o Metil-galato apresenta atividade frente ao parasita *L. amazonensis*, contribuindo assim com o resultado desempenhado pela amostra LFD-1 (Metil-galato).

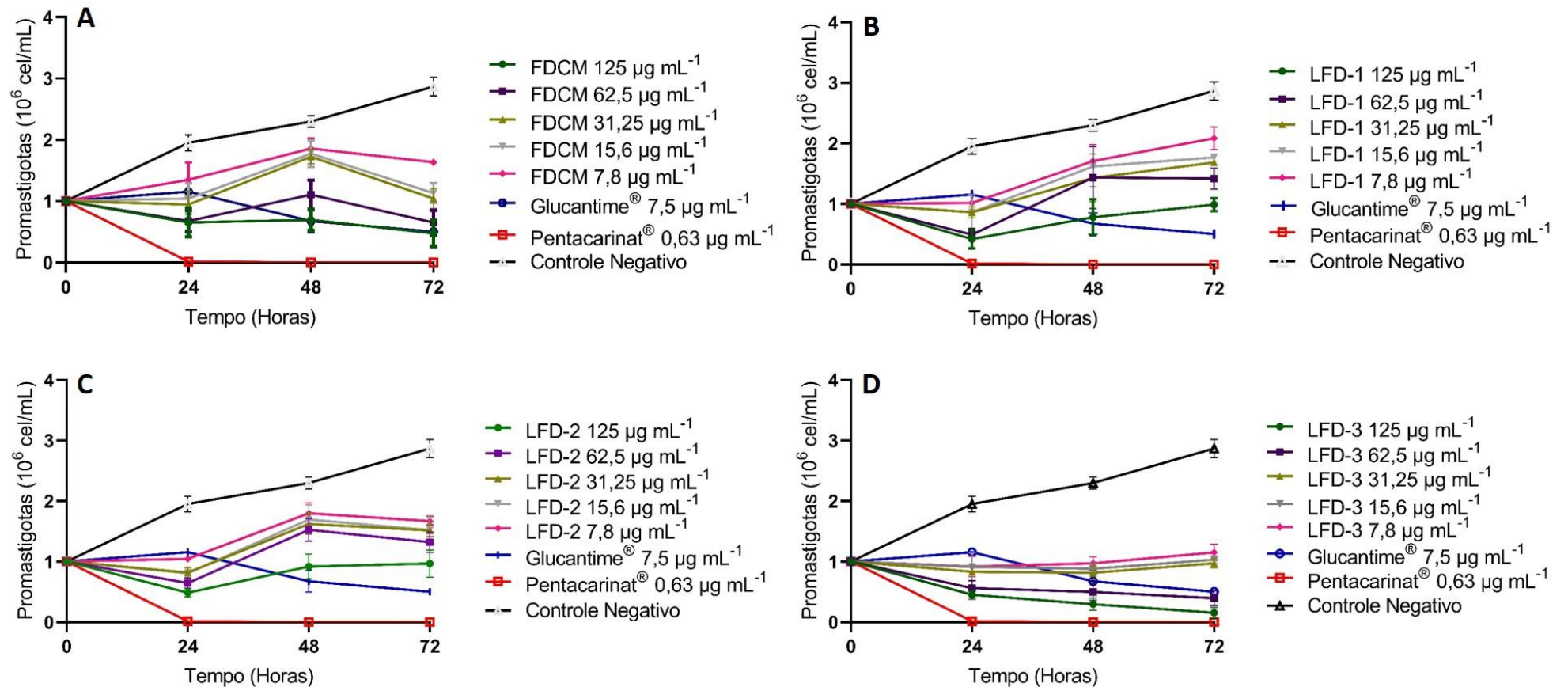


Figura 12. Atividade antileishmania das amostras de *Libidibia ferrea* frente a promastigotas *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584). **A** – FDCM (Fração Diclorometano); **B** – LFD-1; **C** – LFD-2; **D** – LFD-3. Os parasitas (10^6 células/mL) foram cultivados em diferentes concentrações a 25°C e avaliados de 24 às 72 horas. Antimoniato de meglumina (Glucantime[®] 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®] 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram usados como controle positivo. O controle negativo foram os parasitas expostos ao DMSO (dimetilsulfóxido) à 1%.

Tabela 3 – Atividade antileishmania para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e valores calculados de IC₅₀ por regressão linear das amostras obtidas de *Libidibia ferrea*.

Amostras	IC 50 (µg mL ⁻¹)		
	24h	48h	72h
FDCM	55,9 ± > 10,0	76,6 ± > 10,0	30,4 ± 8,6
LFD-1	34,7 ± 4,4	82,2 ± > 10,0	71,5 ± 3,8
LFD-2	43,2 ± 8,1	93,6 ± > 10,0	60,7 ± > 10,0
LFD-3	35 ± > 10,0	22,4 ± 6,8	17,4 ± 2,8
Glucantime®	24,9 ± 2,9	5,5 ± 2,6	2,5 ± 0,2
Pentacarinat®	< 0,63	< 0,63	< 0,63

No teste de citotoxicidade celular com os macrófagos de linhagem J774, não foi observado em nenhuma das concentrações (125 à 7,8 µg.mL⁻¹) das amostras FDCM, LFD-1, LFD-2 e LFD-3 perfil com concentração citotóxica 50% (CC₅₀), ou seja, mostrou alta viabilidade celular, aspecto bastante positivo devido muitos produtos vegetais apresentarem toxicidade, inclusive espécies da própria família Fabaceae (CAMPOS *et al.*, 2016). O resultado do Metil-galato assemelhou-se a outro trabalho, que também avaliou essa substância frente as células de linhagem J774 e não produziu atividade citotóxica, somente quando aumentada a concentração dessa molécula para mais de 200 µM (DIAS *et al.*, 2020). Ao avaliar o desempenho do Pentacarinat®, apesar de ter mostrado a maior atividade antileishmania contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, este medicamento possui um perfil citotóxico muito expressivo, apresentando uma CC₅₀ com 2,53 µg.mL⁻¹ em 48h e <1,2 µg.mL⁻¹ em 72h (Figura 13).

O segundo estudo de citotoxicidade foi realizado com macrófagos de cultivo primário no período de 72h, como confirmação, já que o primeiro foi utilizado macrófagos de linhagem tumoral. Conforme os resultados obtidos, todas as amostras também mostraram viabilidade celular maior que 90 %, resultado este, melhor que os controles positivos, Glucantime® e Pentacarinat®, com 76 e 31% respectivamente. A maior concentração (125 µg.mL⁻¹) da LFD-2, mostrou-se uma excessão, com 69 % da viabilidade celular. Mas, mesmo assim, mostrou diferença estatística ao comparar com Pentacarinat®, valor de $p < 0.0001$. Portanto, esse derivado do Ácido fenilpropanoico indicou que precisaria uma concentração igual a 353 µg.mL⁻¹ para

alcançar a CC_{50} , as demais precisariam uma concentração maior que $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 4).

A avaliação da concentração citotóxica é de suma importância para a busca de substâncias terapêuticas contra os protozoários. O índice de seletividade (IS), auxilia na distinção do efeito entre o ensaio com os macrófagos e o parasita, já que consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC_{50}) para os macrófagos e IC_{50} para *Leishmania* (NAKAMURA *et al.*, 2006). Os resultados de IS apresentados na Tabela 4 mostram que a LFD-2 é 5,8 vezes menos tóxica para as células de cultivo primário do que para a *L. amazonensis*. E as amostras FDCM, LFD-1 e LFD-3 são mais de 15 vezes menos tóxicas às células do que o parasita.

Tabela 4 – Atividade citotóxica em macrófagos murinos e o Índice de seletividade (IS) calculado para as amostras de *Leishmania ferrea* quando avaliados contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Amostras	$CC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$	
	Mácrófagos Murinos	<i>Leishmania amazonensis</i>
FDCM	> 500	> 15
LFD-1	> 500	> 15
LFD-2	353	5,8
LFD-3	> 500	> 15

As amostras também foram avaliadas contra as formas intracelulares em macrófagos infectados para determinar a atividade antileishmaniana. As substâncias testadas mostraram baixa atividade contra as amastigotas de *L. amazonensis*. A LFD-1 nas duas maiores concentrações (125 e $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram o maior potencial de inibição, com aproximadamente 31% frente as células infectadas, inclusive na maior concentração, melhor que o Pentacarinat[®] e Glucantime[®], que reduziram 26% e 7% da carga parasitária. A FDCM mostrou o segundo melhor resultado, onde as duas maiores concentrações contribuíram com a redução de 21% dos parasitas. Já as LFD-2 e LFD-3 nas duas primeiras concentrações, apresentaram um resultado melhor que o Glucantime[®], com a redução de 8 à 14% dos parasitas, com diferença estatística de $p < 0.0001$ (Figura 15).

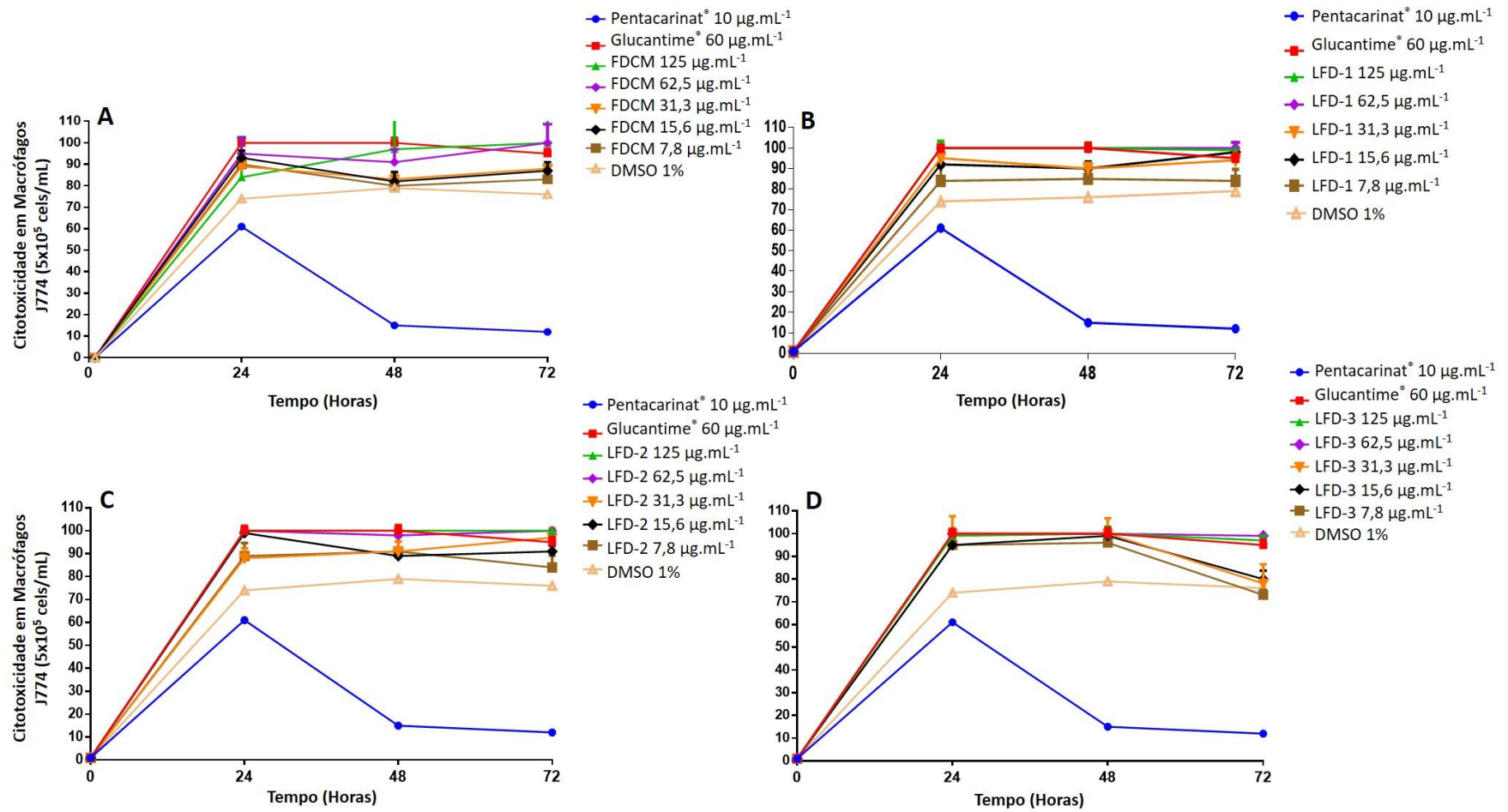


Figura 13. Atividade citotóxica das amostras testadas em macrófagos de linhagem J774 incubados a 37°C por até 72 horas, avaliados pela viabilidade celular. **A** – FDCM (Fração Diclorometano); **B** – LFD-1; **C** – LFD-2; **D** – LFD-3. Antimoniato de meglumina (Glucantime[®] 60 µg.mL⁻¹) e Isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®] 10 µg.mL⁻¹) foram usados como controle positivo. O controle negativo expostas ao DMSO (dimetilsulfóxido) à 1%.

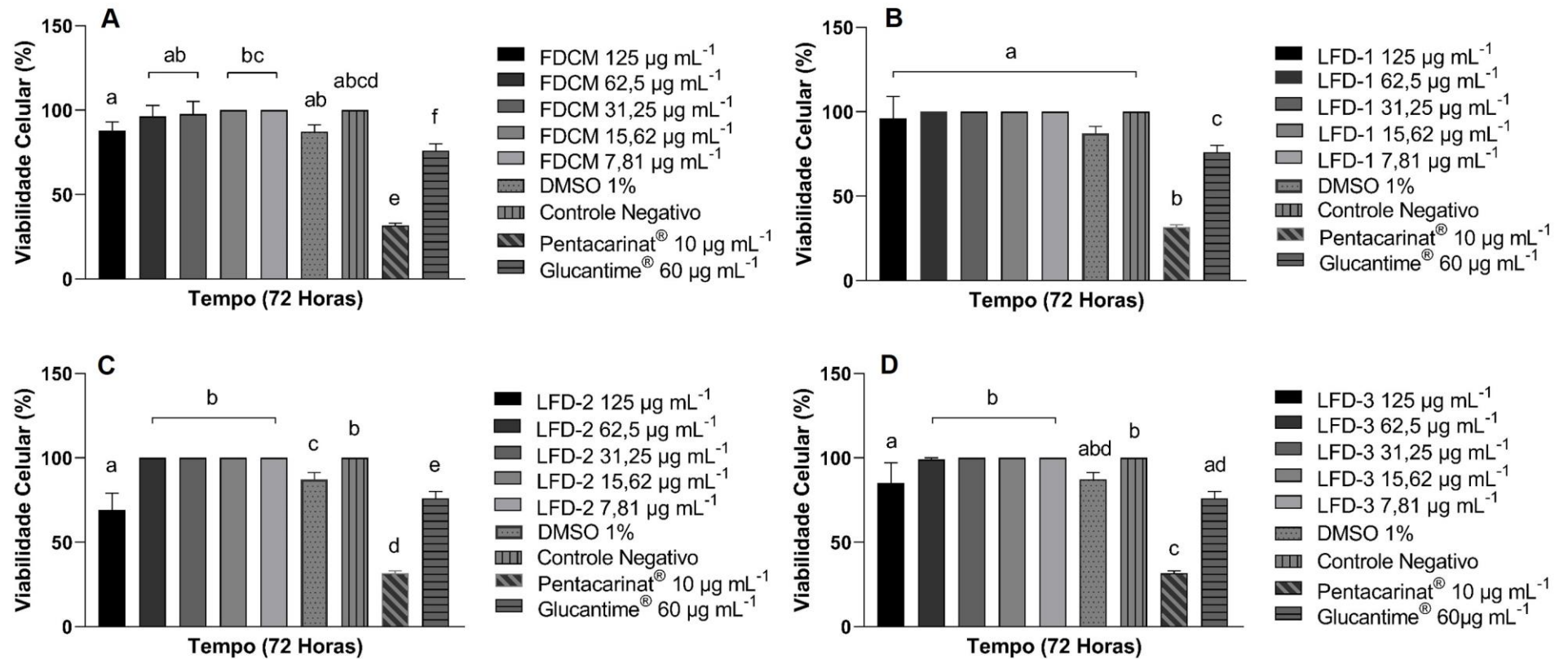


Figura 14. Atividade citotóxica da fração DCM e substâncias isoladas em macrófagos de cultivo primário (murino) incubados a 37 °C por 72 horas, avaliados pela viabilidade celular colorimétrica Alamar Blue[®]. **A** – Macrófagos frente a FDCM (125 a 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **B** – Macrófagos frente a LFD-1 (125 a 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **C** – Macrófagos frente a LFD-2 (125 a 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e **D** – Macrófagos frente a LFD-3 (125 a 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

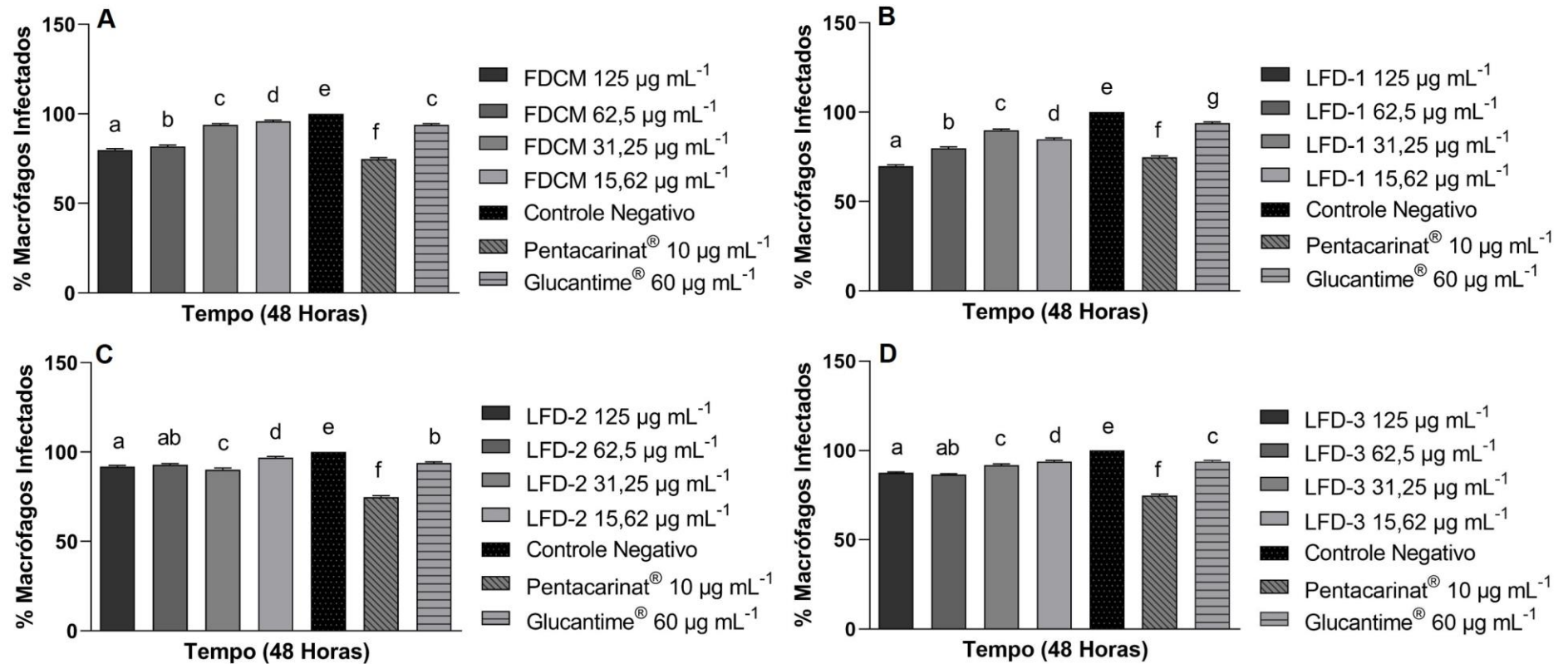


Figura 15. Atividade das amostras frente a formas amastigotas (*Leishmania amazonensis*) interiorizadas em macrófagos de cultivo primário (murino). **A** – Diferentes concentrações da FDCM (125 a 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **B** – Diferentes concentrações da LFD-1 (125 a 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$); **C** – Diferentes concentrações da LFD-2 (125 a 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e **D** – Diferentes concentrações da LFD-3 (125 a 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Incubação por 48 horas a 25 °C.

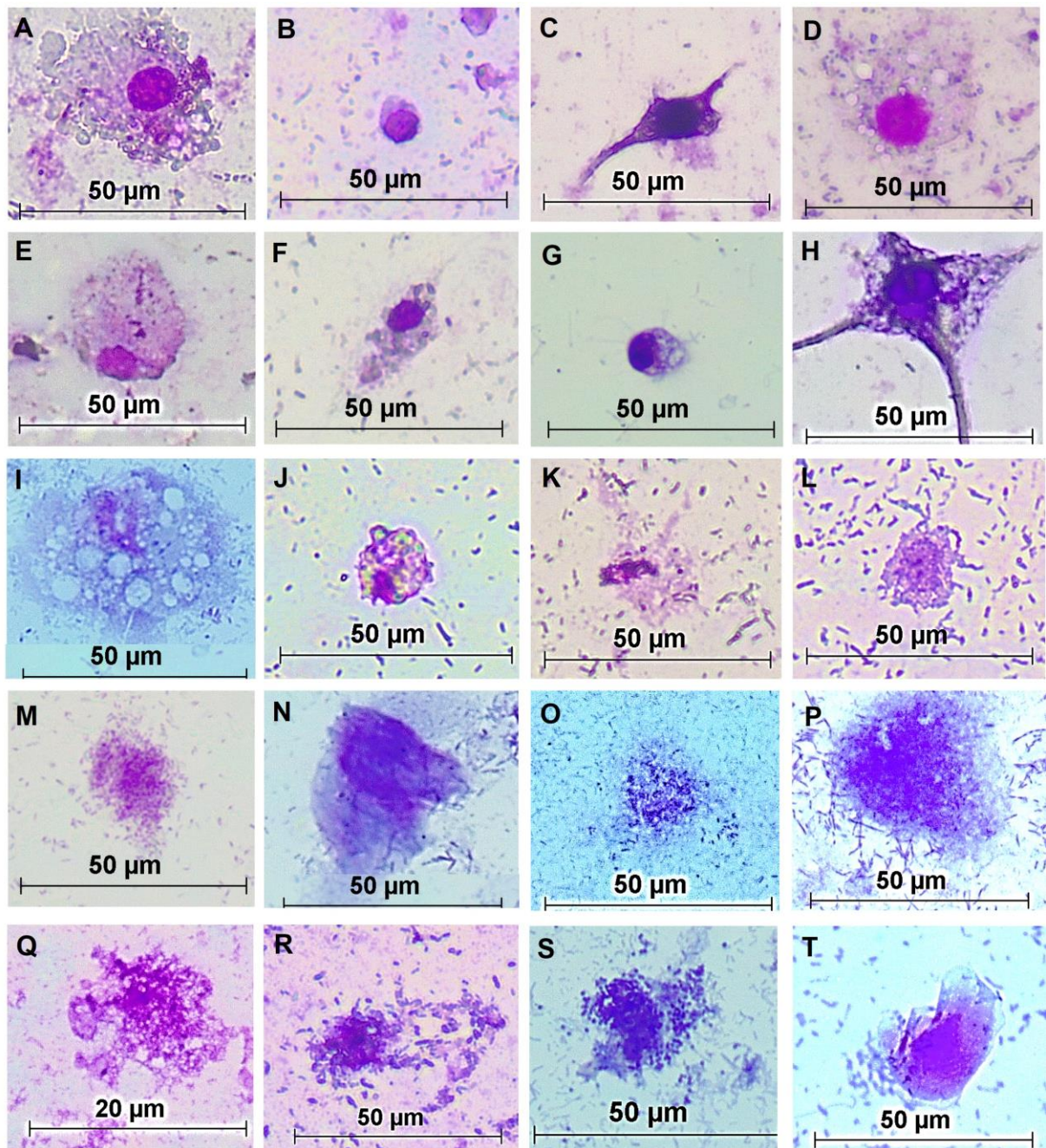


Figura 16. Efeito da atividade das amostras obtidas de *Libidibia ferrea* contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos de cultivo primário (murinos). **Macrófago infectado exposto a FDCM nas concentrações:** A – 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; B – 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; C – 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; D – 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; **Macrófago infectado exposto a LFD-1 nas concentrações:** E – 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; F – 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; G – 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; H – 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; **Macrófago infectado exposto a LFD-2 nas concentrações:** I – 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; J – 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; K – 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; L – 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; **Macrófago infectado exposto a LFD-3 nas concentrações:** M – 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; N – 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; O – 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; P – 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; **Macrófago infectado exposto a Pentacarinat® e Glucantime®:** Q – 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e R – 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; S – Macrófagos infectados (Controle) e T – Macrófagos não infectados.

As estruturas morfológicas dos macrófagos infectados após a exposição com as amostras foram avaliadas por microscopia óptica. As FDCM e LFD-1 preservaram a morfologia da maioria das células nas quatro concentrações testadas. Com as duas maiores concentrações da LFD-2, mantiveram a estrutura celular e apresentaram vacúolos com raras amastigotas. Já a LFD-3, as células tiveram suas estruturas parcialmente comprometidas. E quanto ao uso dos controles positivos, Pentacarinat[®] e Glucantime[®], mostraram ruptura da membrana celular, alteração no citoplasma, desintegração do núcleo e debris celular em abundância (Figura 16). Esses achados, são característicos de processo apoptótico, provavelmente inerente a alta concentração parasitária e ação citotóxica (PAROLIN; REASON, 2001).

Logo, por meio deste capítulo, foi possível corroborar com os resultados obtidos no primeiro capítulo, onde a Fração DCM de *L. ferrea*, apresenta atividade contra o protozoário e que pode estar agindo por meio de ação sinérgica. Sugere-se assim, a continuação do estudo, com a elucidação química da terceira substância majoritária presente na Fração DCM, a LFD-3. Além da avaliação dessas amostras contra outras espécies do parasita *Leishmania* para contribuir com um futuro tratamento a partir de produtos naturais para a complementação da terapia da leishmaniose cutânea.

CONCLUSÃO

Diante dos achados desse estudo, pode-se concluir que os resultados foram promissores. No ensaio contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, as amostras LFD-3 e FDCM foram as mais ativas. Quanto ao perfil citotóxico, não foi observado por nenhuma substância testada, nem pelos macrófagos de linhagem J774 ou de cultivo primário, e mostraram altos valores do índice de seletividade, caracterizando como substâncias mais tóxicas aos parasitas do que as células testadas. E por meio do ensaio contra as formas amastigotas da mesma espécie, o metil-galato (LFD-1) desempenhou um resultado melhor do que os controles positivos, Pentacarinat[®] e Glucantime[®]. Em seguida, a FDCM mostrou o segundo melhor resultado ao reduzir a carga parasitária. Dessa forma, a continuação desse estudo poderia contribuir mais ainda com a área de desenvolvimento dos fitoterápicos como alternativa ou complementação terapêutica para a leishmaniose tegumentar, como para qualquer outra doença negligenciada.

REFERÊNCIAS

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.

ALMASSY, A.A.J. **Folha de Chá: Plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: Editora UFV, p. 233, 2005.

ALVAREZ-PÉREZ, O.B.; VENTURA-SOBREVILLA, J.M.; ASCACIO-VALDÉS, J.A.; ROJAS, R.; VERMA, D.K.; AGUILAR, C.N. Valorization os *Flourensia cernua* DC as source of antioxidants and antifungal bioactives. **Industrial Crops & Products**, v. 152, p. 1-7, 2020.

BALANGE, A.K.; BENJAKUL, S. Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1059-1064, 2009.

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.

CAMARGOS, H. S. **Estudo de membranas modelos e efeitos de terpenos em membranas de Leishmania por meio de ressonância paramagnética eletrônica**. 2013. 85 f. Tese (Doutorado em Física), Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2013.

CHAGAS-NETO, F RANCISCO CIRINEU. **Desenvolvimento do extrato seco de *Libidibia ferrea* (Jucá) como alimento funcional: caracterização química e avaliação das atividades antioxidantes e anti-inflamatória em modelo de neuroinflamação**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2018.

CHEN, S.Y.; WANG, G.Y.; LIN, J.H.; YEN, G.C. Antioxidant and anti-inflammatory activities and bioactive compounds of the leaves of *Trichodesma khasianum clarke*. **Industrial Crops & Products**, v. 151, p. 1-6, 2020.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C.D. *et al.* Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. **Acta Amazônica**, v. 47, p. 331-340, 2017.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, Claudia Dantas. **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, Ana Claudia. **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, E.J.A. *et al.* Aspectos fenológicos do jucá- *Caesalpinia ferrea* Martius ex Tul. (Fabaceae). **Enaag**, 4: Belém, Pará, 40 pp, 2016.

CRAGG, G.M.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impacto f natural products on developing new anti-cancer agentes. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-43, 2009.

CUNHA, A.P.; RIBEIRO, A.C.B.; RICARDO, N.M.P.S.; OLIVEIRA, A.C.; DÁVILA, L.S.P.; CARDOSO, J.H.L.; RODRIGUES, D.C.; AZEREDO, H.M.C.; SILVA, L.M.A.; BRITO, E.S.; MENDES-FILHO, J.; ROCHA, T.M.; LEAL, L.K.A.M.; RICARDO, N.M.P.S. Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 68-76, 2017.

DIAS, C.N.; NUNES, T.A.L.; SOUSA, J.M.S.; COSTA, L.H.; RODRIGUES, R.R.L.; ARAÚJO, A.J.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; SILVA, M.V.; OLIVEIRA, M.R.; CARVALHO,

F.A.A.; RODRIGUES, K.A.F. Methyl gallate: selective antileishmania activity correlates with host-cell directed effects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 1-8, 2020.

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, Nivea. 2010. **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.

FALCÃO, T.R. *et al.* Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p. 1-10, 2019.

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

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.

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.

HARDY, K. *et al.* Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 617-626, 2012.

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.

KAMATHAM, S.; KUMAR, N.; GUDIPALLI, P. Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. And their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 520-529, 2015.

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.

NAKAMURA, E.S. *et al.* Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. **Journal Ethnopharmacol**, v. 81, n. 1, p. 135-137. 2002.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; DIAS-FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regenellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 61-66, 2006.

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

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

RADUNZ, M.; HACKBART, H.C.S.; BONA, N.P.; PEDRA, N.S.; HOFFMAN, J.F.; STEFANELLO, F.M.; ZAVAREZA, E.R. Glucosinolates and phenolic compounds rich broccoli extract: Encapsulation by electrospraying and antitumor activity against glial tumor cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 192, p. 1-9, 2020.

ROCHA, A. J. **O impacto social das doenças negligenciadas no Brasil e no mundo**. 2012. 50 f. Monografia (Graduação em Medicina) Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2012.

ROCHA, A.A.A.G. *et al.* Atividade antioxidante e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das vagens de *Libidibia Ferrea* (Leguminosae). **XXIV simpósio de plantas medicinais do Brasil**. 2016.

SARIKURKCU, C.; SAHINLER, S.S.; CEYLAN, O.; TEPE, B. *Onosma pulchra*: Phytochemical composition, antioxidante, skin-whitening and anti-diabetic activity. **Industrial Crops & Products**, v. 154, p. 1-10, 2020.

SELSELEH, M.; EBRAHIMI, S.N.; ALIAHMADI, A.; SONBOLI, A.; MIRJALILI, M.H. Metabolic profiling, antioxidante and antibacterial activity of some Iranian *Verbascum* L. species. **Industrial Crops & Products**, v. 153, p. 1-12, 2020.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment for leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056-1069, 2011.

SILVA, L.C.N. *et al.* Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* this fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Plants Res.**, v. 7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.

SWAIN, T. Tannins and lignins. *In* Herbivorous: their interactions with secondary plant metabolites (G.A. Rosenthal & D.H. Janzen, eds.). **Academic Press**, p. 657-682, 1979.

TAGHOUTI, M.; MARTINS-GOMES, C.; FÉLIX, L.M.; SCHAFER, J.; SANTOS, J.A.; BUNZEL, M. NUNES, F.M.; SILVA, A.M. Polyphenol composition na biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: comparison with endemic Iberian *Thymus* species. **Food chemistry**, v. 331, p. 1-11, 2020.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; TATH, S.; VILARINHO, A.; MORTARA, R.A.; DE ANDRADE, H.F. Targenting *Leishmania chagasi* amastigotes through macrophage

scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal Antimicrobiology Chemoterapy**, v. 54, p. 60-68, 2004.

VAQUERO, M.J.R.; ALBERTO, M.R.; NADRA, M.C.M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93-101, 2007.

VASCONCELOS, C.F.B. *et al.* 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.

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771-12791, 2012.

7. DISCUSSÃO GERAL

Os recursos farmacoterapêuticos disponíveis atualmente para as doenças tropicais negligenciadas são muito limitados e insuficientes. Sabe-se que a Leishmaniose tegumentar incluída no grupo das DTNs, ainda possui diversos aspectos que necessitam ser melhor investigados, dentre estes o seu protocolo terapêutico, até por que muitas das drogas recomendadas pelo pelo Ministério da Saúde há mais de meio século, apresentam tratamento prolongado, invasivo e com inúmeras reações adversas (BRASIL, 2017; FERREIRA; MAROCHI; CARVALHO, 2012). Logo, estes fatores vêm estimulando a pesquisa de novos medicamentos para essa doença, principalmente partindo de instituições públicas de pesquisas (POKHREL *et al.*, 2011).

Os produtos naturais constituem-se em uma das fontes usuais para a busca de novas substâncias com ação farmacológica. A avaliação dessas substâncias de origem natural é conduzida por ensaios biológicos, possibilitando o aparecimento de candidatos a fitoterápicos ou fitofármacos (DIAS *et al.*, 2013; IOSET, 2008). A própria OMS reconhece que essa alternativa pode partir do conhecimento tradicional para o desenvolvimento de novos medicamentos de origem natural (WHO, 2010). Seguindo essa proposta, os resultados desse trabalho mostraram-se promissores ao contribuírem com a terapia dos pacientes acometidos com a leishmaniose cutânea, apresentando uma formulação tópica inovadora, eficiente e mais segura.

A formulação farmacêutica desenvolvida no primeiro capítulo foi caracterizada como microemulsão, uma vez que apresentou aspecto translúcido, com tamanho de gotículas menor que 100 nm, pH e índice de polidispersão adequados. Também vale levar em consideração que esta manteve-se estável em todo o período do experimento. A escolha por esse tipo de formulação está relacionada ao fato de aumentar a permeação dos fármacos através da pele e aumentar a eficiência da via transdérmica, uma via de administração mais segura (NASTITI *et al.*, 2017).

Apesar desse tipo de formulação já estar sendo aplicada para o tratamento da LC com outros fármacos, como fluconazol ou anfotericina B, ainda não existem relatos descritos na literatura sobre a veiculação de extratos de plantas em microemulsão para a terapia dessa doença (OLIVEIRA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2017). Isso demonstra o pioneirismo e ineditismo desse trabalho ao formular uma fração do extrato obtido a partir de uma planta medicinal em um sistema microemulsionado, para

promover maior estabilidade e liberação prolongada das substâncias no local de administração.

Após a aplicação dessa microemulsão com a fração DCM de *L. ferrea* pela via tópica, observou-se o controle da progressão do volume das lesões dos hamsters infectados com o protozoário *L. amazonensis*, além de mostrar infiltrado inflamatório moderado avaliado pela histopatologia e redução da carga parasitária. O grupo de animais tratados com MFDCM, não mostraram diferença estatística quando comparados com os tratados com o Glucantime® pela via parenteral (LGIL e LGIM). Essa constatação é vantajosa em relação ao tratamento convencional, uma vez que a microemulsão não tem administração invasiva e dolorosa ao paciente.

No segundo capítulo, os resultados subsidiaram a confirmação da atividade antileishmania partindo da FDCM e de suas substâncias isoladas por meio de ensaios *in vitro* com o parasita *L. amazonensis* nas formas promastigotas e amastigotas, além da ausência de perfil citotóxico em macrófagos de linhagem J774 e de cultivo primário. Dentre os compostos fenólicos isolados, somente dois deles tiveram suas estruturas químicas identificadas: o metil-galato (LFD-1) e um derivado do ácido fenilpropanoico (LFD-2). A LFD-2 caracteriza-se como sendo um resultado inédito, por não apresentar informações na literatura. Já o metil-galato é derivado do ácido gálico, que inclusive já foi testado e teve sua atividade contra o parasita *L. amazonenses* comprovada, corroborando assim, com o resultado encontrado nesse capítulo (DIAS *et al.* 2020).

Desse modo, a microemulsão tópica contendo a fração DCM de *L. ferrea*, estudada nesse projeto, poderia contribuir com a otimização do protocolo terapêutico para os pacientes com LC. Sugerindo-se até mesmo uma terapia associada com o medicamento recomendado pelo Ministério da Saúde, onde a microemulsão entra como terapia complementar, como é discutido no último Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar (BRASIL, 2017). Com essa terapia combinada, poderia ser reduzido as doses do antimonial de meglumina, com o intuito de diminuir os efeitos indesejados apresentados durante o tratamento. Logo, a redução das doses desse medicamento já está sendo recomendada há mais de 20 anos, porque existem achados clínicos que demonstram que, quando a quantidade desse fármaco é diminuída, os pacientes alcançam a cura clínica e com relatos de menores efeitos colaterais (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1996; OLIVEIRA-NETO; MATTOS, 2006).

A via parenteral do antimonial pentavalente indicada é de injeções pela via endovenosa (EV), intramuscular (IM) ou em alguns casos, a intradérmica (ID), no

entanto, a IM é a mais comumente utilizada, principalmente em áreas de difícil acesso, em municípios onde o atendimento e acompanhamento do paciente é mais escasso, ou locais onde o medicamento é entregue ao próprio paciente devido ao deslocamento até o posto; a via IM é mais dolorosa e em casos de pacientes desnutridos, com pouca massa muscular e naqueles com trombocitopenia, deve-se dar preferência à via EV (BRASIL, 2017).

A indicação de uso de uma formulação tópica de um produto de origem vegetal, como uso alternativo associado ao antimonial irá possibilitar menor sofrimento e efeitos adversos ao paciente, uma maior segurança, e rapidez no tratamento. Ensaios clínicos devem ser realizados com o intuito de avaliar a possibilidade de seu uso sem associação, associado a outras drogas ou quanto a sua aplicação em casos de contra-indicação do tratamento pelo Glucantime[®], como as gestantes, uma vez que essas drogas atravessam a barreira transplacentária e podem impregnar o tecido nervoso do feto, levando a síndromes severas de retardamento mental; e pacientes com restrições de uso como os de idade acima de 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doenças de Chagas (BRASIL, 2017).

8. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados deste trabalho puderam contribuir com a área de desenvolvimento de medicamentos alternativos ou complementares para a leishmaniose cutânea, permitindo a conclusão dos seguintes aspectos:

- A microemulsão desenvolvida com a fração diclorometano obtida do extrato metanólico de *Libidibia ferrea* (MFDCM) apresentou as propriedades físico-químicas características dos sistemas microemulsionados e manteve-se estável durante todo o período experimental;
- Os animais tratados com a MFDCM pela via tópica, mostraram eficiência de forma similar aos grupos de animais tratados com o Glucantime[®] pelas vias parenterais (IL e IM), com controle da evolução das lesões, presença de perfil inflamatório moderado e redução da carga parasitária;
- Foram isoladas as três substâncias majoritárias da fração DCM, as LFD-1, LFD-2 e LFD-3. Contudo, só foi possível identificar até o momento, as estruturas químicas da LFD-1 (metil-galato) e LFD-2 (derivado do ácido fenilpropanoico);
- As LFD-3 e FDCM mostraram os melhores resultados quanto a inibição dos parasitas *Leishmania amazonensis* nas formas promastigotas;
- As LFD-1 e FDCM foram as mais ativas para a redução de *L. amazonensis* nas formas amastigotas, onde a LFD-1 mostrou-se mais eficiente quando comparada com os grupos controles positivos, Pentacarinat[®] e Glucantime[®];
- Nenhuma das amostras testadas demonstraram perfil citotóxico em macrófagos de linhagem J774 ou de murinos peritoneais. De fato, apresentaram ótimos valores do índice de seletividade, classificando-as como mais tóxicas ao parasita do que às células avaliadas.
- A MFDCM apresentou-se como sendo um recurso terapêutico promissor ao tratamento da Leishmaniose cutânea, devendo continuar a ser investigada.

9. PERSPECTIVAS

Os resultados do projeto mostraram que a aplicação da microemulsão com a fração DCM de *Libidibia ferrea* possui potencial para ser incluída na terapia da Leishmaniose cutânea e que substâncias isoladas dessa fração também podem desempenhar atividade antileishmania, sugerindo o prosseguimento do estudo com as seguintes etapas:

- Identificação da estrutura química da terceira substância majoritária (LFD-3) presente na fração DCM de *Lerrea ferrea*;
- Otimização da formulação farmacêutica, por meio do desenvolvimento de um hidrogel à base de microemulsão com a fração DCM de *L. ferrea*;
- Estudo do perfil da permeação cutânea das formulações farmacêuticas;
- Avaliação dos efeitos toxicológicos das formulações farmacêuticas em animais de experimentação;
- Avaliação da terapia combinada da melhor formulação farmacêutica contendo a fração DCM, associada à administração do antimoníaco de meglumina, para estabelecer um melhor protocolo terapêutico para a Leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, O.L.S.; SANTOS, J.B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **Na Bras Dermatol**, 3: 497506, 2011.

ALONSO, L. *et al.* Antileishmanial and cytotoxic activities of ionic surfactants compared those of miltefosine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 183: 110421, 2019.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, 2012.

AMATO, V.S. *et al.* Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1026-1034, 2009.

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.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Preços máximos de medicamentos por princípio ativo para compras públicas**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/listasdeprecos> (2020). Acesso em: 20 de Março de 2020.

ARAÚJO, A.A. *et al.* Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.

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.

ARBOLEDA, M.; BARRANTES, S.; ÚSUGA, L.Y.; ROBLEDOS, S.M. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumina antimoniate: A case series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52: e20180211, 2019.

AOUN, J.; HABIB, R.; CHARAFFEDDINE, K.; TARAIF, S.; LOYA, A.; KHALIFEH, I. Caseating Granulomas in Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1-6, 2014.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

BASHIR, U. *et al.* Comparison of intralesional meglumine antimonite along with oral itraconazole to intralesional meglumine antimonite in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Pak J Med Sci.**, v. 35, n. 6, p. 1669-1673, 2019.

BENÍCIO, E.; CORDEIRO, M.; MONTEIRO, H.; MOURA, M.A.S.; OLIVEIRA, C.; GADELHA, E.P.N.; CHRUSCIAK-TALHARI, A.; TALHARI, C.; FERREIRA, L.C.L.; MIRA, M.T.; MACHADO, P.R.L.; TALHARI, S.; SCHRIEFER, A. Sustained presence of cutaneous leishmaniasis in urban Manaus, the largest human settlement in the Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1208-1213, 2015.

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

BOECK, P. *et al.* Synthesis of chalcone analogues –ith increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medical Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BORGES, M. Ensaio Clínicos em Medicamentos. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, v. 24, p. 57-63, 2013.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 1. ed. Brasília: Editora Ideal Ltda. 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.

BRITO, M.E.; ANDRADE, M.S.; MENDONÇA, M.G.; SILVA, C.J.; ALMEIDA, E.L.; LIMA, B.S.; FELIX, S.M.; ABATH, F.G.C.; GRAÇA, G.C.; PORROZZI, R.; ISHIKAWA, E.U.; SHAW, J.J.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, P.S. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in na endemic área for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 10, p. 1278-1286, 2009.

CALIXTO, J.B. *et al.* Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 6, n.2, p. 261-279, 2001.

CAMACHO, M.D.R. *et al.* Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 203-210, 2001.

CARVALHO, F. G. *et al.* Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz] in cutaneous lesions of rats. **Acta Sci. Technol.**, v. 38, p. 137-143, 2016.

CARVALHO, A.L.M. *et al.* Evaluation of microemulsion and lamellar liquid crystalline systems for transdermal zidovudine delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 105, n.7, p. 1-6, 2016.

CARVALHO, S.H. *et al.* American tegumentar leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and shortterm possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380-391, 2019.

CASTRO, José Flávio de. **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.

CHARLTON, R.L. *et al.* Repurposing as a strategy for the Discovery of new antileishmanials: thestateoftheheart. **Parasitology**, 14: 118, 2017.

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.

CHEN, H. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester loaded in microemulsion: Enhanced *In vitro* activity against colon and breast cancer cells and possible cellular mechanisms. **Food Biophysics**, v. 14, p. 80-89, 2019.

CHRISTENSEN, S.B. *et al.* An antileishmanial chalcone from chinese licorice roots. **Planta Medical**, v. 60, p. 121-123, 1994.

CHRUSCIAKTALHARI, A. *et al.* Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus. **Am J Trop Med Hyg**, 2: 25560, 2011.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, Claudia Dantas. **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.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C.D. *et al.* Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. **Acta Amazônica**, v. 47, p. 331-340, 2017.

COSTA, J.M.L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, p. 317, 2005.

COSTA, J.M.L. *et al.* Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 3, p. 16-24, 2009.

COSTA-FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral Nmetil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Ver da Soc Bras de Med Trop**, v. 4: 424427, 2008.

CSERMELY, P. *et al.* The efficiency of multitarget drugs: the network approach might help drug design. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 26: 178-182, 2005.

CUNHA, A.P.; RIBEIRO, A.C.B.; RICARDO, N.M.P.S.; OLIVEIRA, A.C.; DÁVILA, L.S.P.; CARDOSO, J.H.L.; RODRIGUES, D.C.; AZEREDO, H.M.C.; SILVA, L.M.A.; BRITO, E.S.; FILHO, J.M.; ROCHA, T.M.; LEAL, L.K.A.M.; RICARDO, N.M.P.S. Polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* seeds – Chemical characterization and anti-diabetic effects in Wistar rats. **Food Hydrocolloids**, v. 65, p. 68-76, 2017.

DAR, M.J. *et al.* Topical treatment of cutaneous leishmaniasis with novel amphotericin B – miltefosine coinorporated second generation ultradeformable liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, 573: 118900, 2020.

DELORENZI, J.C. *et al.* *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.

DIAS, A.M.A. *et al.* Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **J. Supercrit. Fluids**, v. 74, p. 34-45, 2013.

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.

DIAS, C.N.; NUNES, T.A.L.; SOUSA, J.M.S.; COSTA, L.H.; RODRIGUES, R.R.L.; ARAÚJO, A.J.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; SILVA, M.V.; OLIVEIRA, M.R.; CARVALHO, F.A.A.; RODRIGUES, K.A.F. Methyl gallate: selestive antileishmania activity correlates with host-cell directed effects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 1-8, 2020.

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

DNDI. **Drugs for Neglected Diseases initiative**, Disponível em: https://www.dndial.org/wpcontent/uploads/2009/10/planodenegocios2015_pt.pdf?x96328 (2015). Acesso em: 20 de Março de 2020.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

DUARTE, M.L.; ROCHAEL, M.C. Histopathological and immunohistochemical profile of the American cutaneous leishmaniasis with emphasis on FXIIIa+ dermal dendrocytes. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 6, p. 537-544, 2006.

EKIZ, O. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis with marked facial disfigurement. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 83, n. 1, p. 91, 2017.

FALCÃO, T.R. *et al.* Crude extract from *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul.) L.P. Queiroz leaves decreased intra articular inflammation induced by zymosan in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p. 1-10, 2019.

FERNANDES, C.P.M. *et al.* Repellent action of *Carapa guianensis* and *Libidibia ferrea* for flies species of Calliphoridae family. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 867-870, 2016.

FERNANDEZ-FIGUEROA, E.A. *et al.* Downregulation of TLR and JAK/STAT pathway genes is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis: a gene expression analysis in NK cells from patients infected with *Leishmania mexicana*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, 2016.

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. R. A.; SOARES, L. A. L. *Libidibia Ferrea* (Mart. ex. Tul) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, p. 140-150, 2015.

FERREIRA, M.E. *et al.* 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, P. *et al.* Investigation of a microemulsion containing clotrimazole and itraconazole for transdermal delivery for the treatment of sporotrichosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 1026-1034, 2020.

FIGUEIREDO, K.A. *et al.* 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. *et al.* Oral efficacy of apigenin against cutaneous leishmaniasis: involvement of reactive oxygen species and autophagy as a mechanism of action. **Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n.2, p. 1-16, 2016.

FONSECA, V.R.; BHIDE, P.J.; JOSHI, M.P. Formulation, Development and Evaluation of Etoricoxib nanosize microemulsion based gel for topical drug delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 53, n. 4, p. 671-679, 2019.

FORMARIZ, T.P. *et al.* 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. *et al.* 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. *et al.* Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Ann Intern Med**, v. 113, n. 12, p. 934-940, 1990.

FREITAS, C.C. *et al.* Biological Activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea var. parvifolia* (Mart.exTul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evid.-Based Complementary Altern. Med.**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

FRÉZARD, F. *et al.* Glutathione induced conversion of pentavalente antimony to trivalent antimony in meglumina antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

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

GHORBANZADEH, M. *et al.* Formulation, clinical and histopathological assessment of microemulsion based hydrogel for UV protection of skin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, p. 393-404, 2019.

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**, v. 40, p. 79, 2004.

GRIMALDI, G.J.; TESH, R.B.; MCMAHONPRATT, 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.

GU, W. *et al.* Nanotechnology in the targeted drug delivery for bone diseases and bone regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2305-2317, 2013.

GUIMARAES, L.H. *et al.* Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. 1-14, 2016.

HAFNER, A. *et al.* Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1005-1023, 2014.

HAMMI, K.M. *et al.* Antileishmanial activity of *Moringa oleífera* leaf extracts and potential synergy with amphotericin B. **South African Journal of Botany**, 02256, p. 1-7, 2019.

HARDY, K. *et al.* Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 617-626, 2012.

HERRICKS, J.R. *et al.* The global burden of disease study 2013: What does it mean for the NTDs?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. 1-21, 2017.

HU, X.B. *et al.* Topical delivery of 3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene-loaded microemulsion-based hydrogel for the treatment of osteoarthritis in a rabbit model. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, p. 357-365, 2019.

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

IGNOATO, Marlene Capelin. **Contribuição ao estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Aeschynomene fluminensis* e de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) de Porto Rico**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Maringá, p. 209, 2012.

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

ISAZA, D.M. *et al.* Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in northwest Colombia. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**. v. 96, p. 165-168, 2002.

JESUS, Jairo Ramos de. **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.

JIHENE, A. *et al.* Antileishmanial potential of própolis essential oil and its synergistic combination with amphotericin B. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2020.

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. *et al.* Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteróides from *Holarrhena curtisii*. **Journal Natural Products**, v. 61, p. 1332-1336, 1998.

KAM, T.S. *et al.* Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 75-79, 1999.

KAYSER, O. *et al.* *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, v. 76, p. 131-138, 2000.

KENNEDY, M.L. *et al.* 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. *et al.* **Evolution, classification and geographical distribution**. Academic Press, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in LatinAmerica. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595-600, 1978.

LAINSON, Ralph. Ourpresent knowledge of the ecology and controlof leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 1, p. 47-56, 1985.

LAINSON, Ralph. Espécies neotropiacais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev**, v. 64, p. 175-193, 2012.

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.

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.

LOPES, N. *et al.* Sulfated polysaccharide of *Libidibia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.

MACHADO, P.R. *et al.* Oral pentoxifyline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 6, p. 788-793, 2007.

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. *et al.* 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.

MAULVI, F.A. *et al.* Lidocaine tripotassium phosphate complex laden microemulsion for prolonged local anaesthesia: *In vitro* and *in vivo* studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, p. 1-8, 2020.

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.

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

MITTAL, N. *et al.* 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. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Seminar**. v. 77, p. 3661561, 2005.

MUSA, A. *et al.* Sodium Stibogluconate (SSG) & Paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in east africa: A randomised controlled trial. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 6:e1676, 2012.

NAGLE, A.S. *et al.* Recent developments in drug Discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 11305-11347, 2014.

NAIFF-JUNIOR, R.D. *et al.* 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, E.S. *et al.* Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. **Journal Ethnopharmacol**, v. 81, n. 1, p. 135-137. 2002.

NASTITI, C.M.R.R.; PONTO, T.; ABD, E.; GRICE, J.E.; BENSON, H.A.E.; ROBERTS, M.S. Topical Nano and Microemulsions for skin delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, p. 1-25, 2017.

NAWWAR, M.A. *et al.* Phenolics from *Libidibia ferrea* Mart.: antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Pharmazie**, v. 70, n. 8, p. 553-558, 2015.

NEGRÃO, G.N.; FERREIRA, M.E.M.C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percorso**, v. 6, n. 1, p. 147-168, 2014.

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. *et al.* 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. 130. 1904.

NOZAKI, H. *et al.* 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. *et al.* Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 458-461, 1997.

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. *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, p. 131-138, 2004.

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.N. *et al.* 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.

OLIVEIRA, M.B.; CALIXTO, G.; GRAMINHA, M.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; CHORILLI, M. Development, Characterization, and *in Vitro* Biological performance of Fluconazole-Loaded Microemulsions for the Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

OLIVEIRA-NETO, M.P.; SCHUBACH A.; ARAUJOS, M.L.; PIRMEZ C. High and low doses of antimony (sb^v) in American cutaneous leishmaniasis. A five-year follow-up study of 15 patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 207-209, 1996.

OLIVEIRA-NETO, M.P; MATTOS, M.S. Na alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 223-236, 2006.

OHIRA, S. *et al.* New chalcone dimers from *Ceasalpinia ferrea* Mart. act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Left**, v. 54, p. 5052-5055, 2013.

OMOLLO, R. *et al.* Safety and efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. **Trials Journal**, v.12, p. 166, 2011.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas. **Plano Global de Combate às Doenças Tropicais Negligenciadas**. 2008-2015. QUEM; 2007.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas. **Doenças tropicais negligenciadas, sucessos ocultos, oportunidades emergentes**. QUEM; 2006.

OPAS – Organización Panamericana de la Salud. **Leishmaniose em las Américas: Recomendaciones para el tratamiento**. Washington: OPAS, p. 1-60, 2013.

OPAS – PanAmericana da Saúde. Organização Mundial da Saúde – OMS. **Informe Epidemiológico das Américas**, n. 3, julho de 2015.

PARVEEN, R. *et al.* Preparation of microemulsion containing *Lycopersicon esculentum* extract: *In vitro* characterization and stability studies. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 4, p. 1821-1827, 2019.

PECOUL, Bernard *et al.* Access to essential drugs in poor countries: a lost battle?. **Jama**, v. 281, n. 4, p. 361-367, 1999.

PEDROSA, T.N. *et al.* Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Arch Dermatol Res**, v. 308, p. 643-654, 2016.

PIGOTT, David M. *et al.* Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960–2012. **Scientific Data**, v. 1, n. 1, p. 17, 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.

POKHEL, S.; REIDPATH, D.; ALLOTEY, P. Social sciences research in neglected tropical diseases: investment in social Science research in neglected diseases of poverty: a case study Bill and Melinda Gates Foudation. **Health Research Policy and Systems**, v. 9, n. 2, p. 16, 2011.

PORT'S, P.S. *et al.* The phenolic compounds and the antioxidante potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food Res. Intern.**, v. 53, p. 875-881, 2013.

POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M.H.; HATAM, G.R.; KALANTARI, M.; HABIBI, P.; SARKARI, B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 5, n. 4, p. 1-8, 2010.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da caatinga**. [s.l.] Universidade Estadual de Freira de Santana, 2009.

QUEIROZ-NETO, A.; SANTOS, E.; MATAQUEIRO, M.I.; BECHARA, G.; PEIRO, J.R. Avaliação toxicológica da administração oral aguda e sub-aguda do Extrato aquoso de casca e vagem de jucá (*Caesalpinia ferrea*) em ratos e suínos. **In: Reunião Annual da FESBE VI**, p. 273-273, 1991.

RAGELLE, H. *et al.* Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field natures. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 14, p. 851-864, 2017.

RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n.4, p. 550-555, 2003.

REDDY, Madhuri *et al.* Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases: a systematic review. **Jama**, 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–hostcell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

ROBERTS, C.W. *et al.* Fatty acid and sterol metabolismo: potencial antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 129-142, 2003.

ROCHA-SILVA, H. *et al.* Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, v. 30, p. 1877-1881, 2007.

ROSS, Ronald. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British medical journal**, v. 2, n. 2237, p. 12-61, 1903.

SAHU, G. *et al.* Advancements in microemulsion based drug delivey systems for better therapeutic effects. **Int J Pharm Sci Dev Res**, v. 1, n. 1, p. 8 -15, 2015.

SAMPAIO, F.C. *et al.* *In vitro* antimicrobial of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal Ethnopharmacol**, v. 124, p. 289-294, 2009.

SANTOS, D.S.; RODRIGUES, M.M.F. Atividades farmacológicas dos flavonoids: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SAKATA, S. *et al.* Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental simulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 76, p. 733-737, 2007.

SAWADA, L.A. *et al.* *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive affect by peripheral and central pathway: possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed. Res Interm.**, v. 508725, 2014.

SCHLEIN, Y. Leishmania and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255-258, 1993.

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

SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, 2016.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurol.**, v. 61, p. 216-220, 2004.

SILVA, L.C.N. *et al.* Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpamoniliformis* fruits. **Food Chem. Toxicol.** V. 49, p. 2222-2228, 2011.

SILVA, L.C.N. *et al.* Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* this fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Plants Res.**, v. 7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.

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 do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def> (2019). Acesso em: 20 Março 2020.

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.

SOTO, J. *et al.* Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 9, p. 126672, 2004.

SOTO, J. Miltefosine combined with intralesional pentamidine for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 5, p. 1153-1155, 2018.

SOUSA, J.S.; BASTOS, M.N.C.; ROCHA, A.E.S. Mimosoideae (Leguminosae) do litoral paraense. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 4, p. 799-812, 2009.

SOUSA, G.D.; KISHISHITA, J.; AQUINO, K.A.S.; PRESGRAVE, O.A.F.; LEAL, L.B.; SANTANA, D.P. Biopharmaceutical assessment and irritation potential of microemulsions and conventional systems containing oil from *Syagrus cearensis* for topical delivery of Amphotericin B using alternative methods. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 18, n. 5, p. 1833-1842, 2017.

SOUZA, C.F. *et al.* *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seed as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydr. Pol.**, v. 82, p. 641-647, 2010.

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.

SUN, W.; SANDERSON, P.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discov Today**, v. 21, n. 7, p. 1189-1195, 2016.

TALHARI, S. *et al.* Leishmaniose no Estado do Amazonas – Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, n. 6, p. 433-438, 1998.

TIRNAKSIZ, F. *et al.* 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.

TIUMAN, T.S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525-532, 2011.

TRAN, T.N. Cutaneous drug delivery: an update. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceeding**, v. 16, n. 1, p. 67-69, 2013.

TRICONI, C.T. *et al.* Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2608-2613, 2014.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of Ellagic Acid and 2-(2,3,6-Trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid na sorbitol accumulation *in vitro* and *in vivo*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 10, p. 1584-1587, 2004.

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

VASCONCELOS, C.F.B. *et al.* 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. 113, 1965.

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

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases**. World Health Organization, 2010.

WHO. World Health Organization, **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en> (2020). Acesso em: 09 Março 2020.

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

ZILBERBERG, M.D. ET AL. Multidrug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gramnegative severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. **Crit. Care**. v. 18, p. 596, 2014.

ZHU, W. *et al.* Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 184-190, 2008.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.P.; AVERY, V.M. Leishmaniasis drug Discovery: recente progress and challenges in assay development. **Drug Discov Today**, v. 17: 300053, 2017.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (1);

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (2);

Anexo C – Declaração do cadastro de acesso ao patrimônio genético junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN);

Anexo D – Declaração do Depósito de Patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI);

Anexo E – Certificado de Premiação do trabalho apresentado no I Congresso de Ciências Farmacêuticas do Amazonas;

Anexo F – Comprovante de Submissão do Capítulo I para a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (1).

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

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais (2).

31/03/2020

SEI/MCTIC - 5349170 - Parecer Técnico



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudos Pré-clínicos em Leishmaniose cutânea com substâncias isoladas da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae)", registrada com o nº 003/2020, SEI 01280.000145/2020-26, sob a responsabilidade de BRUNO BEZERRA JENSEN - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 26/03/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 01/06/2020 a Final: 31/07/2021
Espécie/linhagem/raça:	<i>Mus musculus</i> Balb C, <i>Mesocricetus auratus</i> Golden
Número de animais:	<i>Mus musculus</i> 96, <i>Mesocricetus auratus</i> 96, total 192
Peso/Idade:	<i>Mus musculus</i> 12 semanas / 15g, <i>Mesocricetus auratus</i> 12 semanas / 100 g
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério Central do INPA
Jejum:	não se aplica
Inoculação:	L. (L.) amazonensis e L. (V.) guyanensis Formulações Farmacêuticas com a Fração DCM de <i>Libidibia ferrea</i> Antimoniato de meglumina - Glucantime® Antimoniato de meglumina - Glucantime®

Data de liberação do Parecer: 30.03.2020 - Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 011/2020



Documento assinado eletronicamente por Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia, em 31/03/2020, às 09:01 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador 5349170 e o código CRC 771A8F02.

Referência: Processo nº 01280.000145/2020-26

SEI nº 5349170

Anexo C – Declaração do cadastro de acesso ao patrimônio genético junto ao SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AF46200

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

Número do cadastro: **AF46200**
 Usuário: **Bruno Bezerra Jensen**
 CPF/CNPJ: **009.683.882-56**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Libidibia ferrea

Título da Atividade: **Bioprospecção com Libidibia ferrea (Fabales:Fabaceae) com o objetivo de testá-la como terapia alternativa para processos inflamatórios e infecciosos.**

Equipe

Bruno Bezerra Jensen	INDEPENDENTE
Antonia Maria Ramos Franco	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Claudia Dantas Comandolli Wyrepkowski	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Maria da Paz Lima	INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
José Fernando Marques Barcellos	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

Parceiras Nacionais

01.263.896/0015-60 / MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA, INOVACOES E COMUNICACOES

Data do Cadastro: **08/10/2018 13:30:21**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:37 de 16/08/2019.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo D – Declaração do Depósito de Patente junto ao INPI

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 000809 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 01283896001560

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis

Cidade: Manaus

Estado: AM

CEP: 69087-375

País: Brasil

Telefone: (92) 3643-3324

Fax: .

Email: cadastro@vilage.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 15/01/2019 às 15:32, Petição 870190004528

Anexo E – Certificado de Premiação do trabalho apresentado no I Congresso de Ciências Farmacêuticas do Amazonas



Anexo F – Comprovante de Submissão do Capítulo I para a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Clinical and histopathological evaluation of an experimental topical treatment for cutaneous leishmaniasis

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	MIOC-2020-0446
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	31-Aug-2020
Complete List of Authors:	Jensen, Bruno; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas; Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Comandolli-Wyrepkowski, Claudia Dantas; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas de Souza, Caio; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Laboratório de Leishmaniose e Doenças de Chagas Barcellos, José Fernando; Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Biológicas Lima, Maria ; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Laboratório de Química de Produtos Naturais de Souza, Tatiane; Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Rolim, Fabrício Nonato; Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Pinheiro, Francimeire; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas; dos Santos, Katia Solange ; Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Franco, Antonia; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas; Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Keyword:	neglected diseases, pharmaceutical technology, treatment, in vivo assay, Leishmania amazonensis
Theme:	Parasitology, Leishmaniasis, Tropical Diseases, Therapy