



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



**Estudo Pré-clínico com microemulsões de via tópica contendo produtos
bioativos como alternativa terapêutica para a Leishmaniose Cutânea**

THIAGO DE JESUS BACHA

Manaus/Amazonas

Setembro, 2023

THIAGO DE JESUS BACHA

**Estudo Pré-clínico com microemulsões de via tópica contendo produtos
bioativos como alternativa terapêutica para a 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: Dra. Antonia Maria Ramos Franco.

Co-orientador: Dr. Bruno Bezerra Jensen.

Manaus/Amazonas

Setembro, 2023

Ficha Catalográfica

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

B118e Bacha, Thiago de Jesus
Estudo pré-clínico com microemulsões de via tópica contendo
produtos bioativos como alternativa terapêutica para a leishmaniose
cutânea / Thiago de Jesus Bacha . 2023
167 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Antonia Maria Ramos Franco
Coorientador: Bruno Bezerra Jensen
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Doença tropical negligenciada. 2. Libidibia ferrea. 3.
Nanotecnologia. 4. terapia combinada. I. Franco, Antonia Maria
Ramos. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Estudo Pré-clínico com microemulsões de via tópica contendo produtos bioativos como alternativa terapêutica para a Leishmaniose Cutânea”

DISCENTE: THIAGO DE JESUS BACHA

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, 29/09/2023.



Documento assinado digitalmente
EMERSON SILVA LIMA
Data: 05/10/2023 12:11:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGIF

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



Documento assinado digitalmente
ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO PEREIRA
Data: 29/09/2023 17:34:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Antônia Maria Ramos Franco Pereira
Orientadora e Presidente da banca



Documento assinado digitalmente
PAULA FIGLIUOLO DA CRUZ BORGES
Data: 03/10/2023 17:35:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Paula Figliuolo da Cruz Borges
Membro (INPA)



Documento assinado digitalmente
ALINE FAGUNDES DA SILVA
Data: 02/10/2023 12:03:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva
Membro (FIOCRUZ)



Documento assinado digitalmente
THAIS TIBERY ESPIR
Data: 02/10/2023 12:20:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Thais Tibery Espir
Membro (UFAM)



Documento assinado digitalmente
ORMEZINDA CELESTE CRISTO FERNANDES
Data: 03/10/2023 16:25:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Membro (FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder galgar mais esta vitória, por sempre me sustentar nos momentos mais difíceis, me apresentar quando, em dúvida, o caminho certo nas horas incertas, por todas as bênçãos, concedidas e, especialmente, pela vida e alegria de viver;

Aos meus pais, Luiz Carlos Bacha e Laura Oliveira de Jesus Bacha, fontes inesgotáveis de inspiração e meus maiores exemplos de vida, amor, resiliência e fé. Lembrem-se: vocês estarão sempre presentes em mim, em minha vida, em meus pensamentos, em meu coração;

À minha orientadora, Dra. Antonia Maria Ramos Franco, por todas as diretrizes e ensinamentos repassados, por confiar em meu potencial para desenvolver um trabalho tão complexo, tornando o caminhar mais ameno e seguro;

Ao meu coorientador, Dr. Bruno Bezerra Jensen, que norteou meus passos na construção desta obra;

A todos os colaboradores do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA, por todo suporte fornecido na realização do projeto;

À Camila de Jesus Bacha e Edilmar Bezerra Silva, por tanto carinho, apoio, compreensão e companheirismo;

Aos membros da banca examinadora pela contribuição no trabalho, ensinamentos e tempo desprovido;

Aos professores da Universidade Federal do Amazonas pelos ensinamentos e convívio.

BACHA, Thiago de Jesus. **Estudo Pré-clínico com microemulsões de via tópica contendo produtos bioativos como alternativa terapêutica para a Leishmaniose Cutânea**. 2023. 167 f. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2023.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada que afeta principalmente países subdesenvolvidos e parte da população menos favorecida. A infecção é ocasionada por parasitas do gênero *Leishmania* e apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo estas classificadas em forma cutânea ou mucocutânea. Atualmente o tratamento preconizado no Brasil consiste na utilização de antimoniato de meglumina, isetionato de pentamidina, anfotericina B e anfotericina B lipossomal, entretanto esses medicamentos apresentam eficácia limitada e alta toxicidade. Neste sentido, as plantas medicinais vêm despertando o interesse da comunidade científica, devido o potencial terapêutico dos metabólitos secundário presentes plantassem diferentes espécies vegetais. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo desenvolver formulações microemulsionadas contendo a fração diclorometano de *Libidibia ferrea* e o composto fenólico galato de metila para avaliá-las em estudo pré-clínico como alternativa terapêutica para a leishmaniose cutânea, com finalidade de otimizar o protocolo terapêutico dos pacientes diagnosticados com esta doença. Inicialmente foram realizados ensaios biológicos *in vitro* da atividade antileishmania em formas amastigotas, bem como a avaliação da citotoxicidade em células de linhagem RAW. Em seguida, foi feita a investigação da atividade antileishmania em ensaios *in vivo* com formulações microemulsionadas contendo fração diclorometano (DCM) de *Libidibia ferrea* e com galato de metila submetidas ao tratamento de hamsters dourados infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* de forma monoterapêutica e associada ao Glucantime® por via IM e IL. Os resultados preliminares demonstraram que as substâncias não apresentaram citotoxicidade em macrófagos RAW264.7; a fração diclorometano de *L. ferrea* apresentou maior eficácia em inibir a infecção de macrófagos RAW264.7 e o extrato metanólico induziu maior secreção de IL-6 por macrófagos de linhagem murina. No estudo *in vivo* houve uma redução expressiva no volume de lesão de animais tratados com a associação da fração diclorometano + 20 mg/Sb/Kg/dia de Glucantime® intralesional, porém não houve cura clínica e parasitológica, na análise bioquímica houve diferença significativa durante o decorrer do tratamento nos valores obtidos para creatinoquinase e ureia. A microemulsão com galato de metila apresentou estabilidade e eficácia no controle da evolução das lesões leishmanióticas e carga parasitária em hamsters dourados infectados com *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao grupo controle. Assim, a associação da microemulsão contendo a fração diclorometano de *L. ferrea* com o Glucantime® e a microemulsão contendo galato de metila mostraram-se promissores na redução das lesões leishmanióticas.

Palavras-chave: Doença tropical negligenciada; *Libidibia ferrea*; Nanotecnologia; terapia combinada.

BACHA, Thiago de Jesus. **Pre-clinical study with topical microemulsions containing bioactive products as a therapeutic alternative for Cutaneous Leishmaniasis**. 2023. 167 f. Thesis (Doutorate in Pharmaceutical Innovation) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2023.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a neglected disease that mainly affects developing countries, from underdeveloped and developing countries. The infection is caused by parasites of the genus *Leishmania* and presents a wide spectrum of clinical manifestations, which are classified as cutaneous or mucocutaneous. Currently, the recommended treatment in Brazil consists of the use of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate, amphotericin B and liposomal amphotericin B, however these drugs have limited efficacy and high toxicity. In this sense, medicinal plants have aroused the interest of the scientific community, due to the therapeutic potential of secondary metabolites present in different plant species. Thus, the present study aims to develop microemulsion formulations containing the dichloromethane fraction of *Libidibia ferrea* and the phenolic compound methyl gallate to evaluate them in a preclinical study as a therapeutic alternative for cutaneous leishmaniasis, with the aim of optimizing the therapeutic protocol of patients diagnosed with this disease. Initially, *in vitro* biological assays of antileishmania activity in amastigotes were carried out, as well as the evaluation of cytotoxicity in RAW cells. Then, the antileishmania activity was investigated in *in vivo* assays with microemulsion formulations containing the dichloromethane fraction (DCM) of *Libidibia ferrea* and methyl gallate submitted to the treatment of golden hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* monotherapeutically and associated with Glucantime® via IM and IL. Preliminary results demonstrated that the substances did not present cytotoxicity in RAW264.7 macrophages; the dichloromethane fraction of *L. ferrea* was more effective in inhibiting RAW264.7 macrophage infection and the methanolic extract induced greater IL-6 secretion by murine macrophages. In the *in vivo* study, there was a significant reduction in the volume of the lesion in animals treated with the association of the dichloromethane fraction + 20 mg/Sb/Kg/day of intralesional Glucantime®, but there was no clinical and parasitological cure, in the biochemical analysis there was a significant difference during the course of treatment on the values obtained for creatine kinase and urea. The microemulsion with methyl gallate showed stability and efficacy in controlling the evolution of leishmaniatic lesions and parasitic load in golden hamsters infected with *L. (L.) amazonensis* when compared to the control group. Thus, the association of the microemulsion containing the dichloromethane fraction of *L. ferrea* with Glucantime® and the microemulsion containing methyl gallate showed promise in reducing leishmaniatic lesions.

Keywords: Neglected tropical disease; *Libidibia ferrea*; Nanotechnology; combined therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas evolutivas dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i> . A – amastigotas interiorizadas em macrófagos e B – promastigotas.....	20
Figura 2 – Inseto vetor.	21
Figura 3 – Ciclo biológico dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	22
Figura 4 – Manifestações clínicas da leishmaniose cutânea. A – cutânea localizada, B – cutânea disseminada, C – cutânea recidiva cútis e D – cutânea difusa.....	24
Figura 5 – Manifestações clínicas da leishmaniose mucocutânea. A – mucosa tardia, B – mucosa indeterminada, C – mucosa concomitante, D – mucosa contígua e E – musoca primária.....	26
Figura 6 – Casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) no Brasil em 2022. A – casos de LT nas diferentes regiões brasileiras e B – casos de LT nas Unidades Federativas da região norte do Brasil.	28
Figura 7 - Estrutura química do antimonial pentavalente (antimoniato de meglumina). BKchem®.....	29
Figura 8 - Estrutura química do isetionato de pentamidina. BKchem®.....	31
Figura 9 - Estrutura química do desoxicolato de anfotericina B. BKchem®.....	31
Figura 10 - <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz. (A) Frutificação da Espécie vegetal; (B) Fruto maduro; (C) Fruto triturado e sementes removidas.	36
Figura 11 – Diferentes tipos de emulsões (A) e estrutura das microemulsões (B)....	39

CAPÍTULO 2

Figure 1. Cytotoxicity in RAW cells at 24 hours. Glucantime® (GL); Pentamidine (PTM); Libidibia ferrea dichloromethane fraction (DCM), association of Glucantime® and <i>L. ferrea</i> dichloromethane fraction (GL+DCM), <i>L. ferrea</i> extract (EXT) and association of Glucantime® and <i>L. ferrea</i> extract (GL+EXT), dimethylsulfoxide (DMSO). * indicates significant difference for the control (-) – untreated cells.	80
Figure 2. <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> infection rate in RAW cells after 24 hours. Glucantime® (GL); Pentamidine (PTM); Libidibia ferrea dichloromethane fraction (DCM), association of Glucantime® and <i>L. ferrea</i> dichloromethane fraction (GL+DCM), <i>L. ferrea</i> extract (EXT) and association of Glucantime® and <i>L. ferrea</i>	

extract (GL+EXT), dimethylsulfoxide (DMSO). * indicates significant difference for control (-) – infected and untreated cells.	82
Figure 3. Leishmania (Leishmania) amazonensis infection rate in RAW cells after 24 hours. A - control (-) – infected and untreated cells; B – DMSO (1%); C – Glucantime® (100 µg. mL ⁻¹); D – Pentamidine (50 µg. mL ⁻¹); E – Libidibia ferrea dichloromethane fraction and association of Glucantime® (100 µg. mL ⁻¹); F – L. ferrea dichloromethane fraction (100 µg. mL ⁻¹); G – L. ferrea extract and association of Glucantime® (100 µg. mL ⁻¹); H – L. ferrea extract (100 µg. mL ⁻¹).....	83
Figure 4. Cytokine secretion in RAW264.7 macrophages infected with Leishmania (Leishmania) amazonensis. NI – uninfected, IN – infected, LPS – lipopolysaccharide, IFN γ – interferon-gamma, GL – Glucantime®, EXT – Libidibia ferrea extract and DCM – Libidibia ferrea fraction.	84
Figure 5. Snout volume of uninfected hamsters infected with Leishmania (Leishmania) amazonensis. (A) Infected animals treated with the microemulsion containing the L. ferrea DCM fraction (topical route) and intralesional Glucantime®. (B) infected animals treated with the microemulsion containing the DCM fraction of L. ferrea (topical route) and intramuscular Glucantime®. * indicates significant difference for IST group. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/Kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.	85
Figure 6. Clinical aspects of snout lesions of the hamsters (Mesocricetus auratus) infected with Leishmania (Leishmania) amazonensis. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM	

microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.86

Figure 7. Infection rate in hamsters on the 30th day (A) and 135th day (B) of treatment.

* indicates significant difference for IST group. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.88

Figure 8. Biochemical values of creatine kinase (CK), urea and creatinine in hamsters on the 30th and 135th day of treatment. * indicates significant difference for NIST group.

NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.90

CAPÍTULO 3

Figure 1. Evolution of the lesion volume (mm³) of the snout of treated experimental animals and of the control groups not infected and infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

NIST: uninfected and untreated (evolution of the size of the uninfected snout) ; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally ; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally and with a microemulsion of methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally and with a microemulsion of methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically..107

Figure 2. Evolution of lesions caused by cutaneous leishmaniasis in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically .

The lack of standardization in image capture may affect the accuracy of comparing lesion sizes in different images. However, efforts have been made to mitigate this issue by placing 6 mm scale bars in the NIST group (NIST group mean muzzle width) to provide better muzzle sizing. scale between images.....108

Figure 3. Parasite viability score (A) and infection rate (B) in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* after treatment.

IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹)

via IL; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically.110

Figure 4. Biochemical indicators in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* after treatment.

A - CPK; B - CK-MB; C - GOT; D - GPT; E - creatine and F - urea.

NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) via IL; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) via IL; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically.112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação entre as diferentes espécies de <i>Leishmania</i> do novo mundo, reservatório, vetor e aspecto clínico.	19
Quadro 2 – Classificação das manifestações clínicas da leishmaniose cutânea.	23
Quadro 3 – Classificação das manifestações clínicas da leishmaniose mucocutânea.	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CI ₅₀	Concentração Inibitória para 50%
DCM	Diclorometano
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
EV	Endovenosa
FDCM	Fração Diclorometano
IL	Intralesional
IN	Infectado
NI	Não Infectado
IM	Intramuscular
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
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
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	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	17
2.1.1 Histórico da Leishmaniose Tegumentar	17
2.1.2 Agente etiológico	19
2.1.3 Vetor	20
2.1.4 Ciclo biológico	21
2.1.5 Aspectos clínicos	22
2.1.5.1 Leishmaniose cutânea.....	23
2.1.5.2 Leishmaniose Mucocutânea	24
2.1.6 Aspectos imunopatológicos	26
2.1.7 Epidemiologia	27
2.1.8 Tratamento	29
2.1.9 Tratamento alternativo e associação terapêutica	32
2.2 PRODUTOS NATURAIS.....	34
2.2.1 Libidibia ferrea	35
2.4 Nanomedicina e sistemas microemulsionados	38
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. METODOLOGIA GERAL.....	43
4.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	43
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PARTIÇÃO DOS EXTRATOS – LIBIDIBIA FERREA	43
4.3 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS IN VITRO	44
4.3.1 Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária	44
4.3.2 Padrões de ensaios in vitro	45
4.3.3 Ensaio biológico de citotoxicidade	45
4.3.4 Ensaio biológico com formas amastigotas	45
4.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS IN VIVO – ATIVIDADE ANTILEISHMANIA	46
4.4.1 Preparação e caracterização da formulação – Microemulsão	46

4.4.2 Procedência dos animais e infecção experimental	46
4.4.3 Delineamento Experimental	47
4.4.4 Eutanásia	47
4.4.5 Diagnóstico parasitológico	47
4.4.6 Diagnóstico bioquímico	48
4.4.7 Análise Estatística.....	48
4.4.8 Aspectos éticos.....	49
5 CAPÍTULO 1	50
6 CAPÍTULO 2	71
7 CAPÍTULO 3	99
8 DISCUSSÃO GERAL	121
9 CONCLUSÃO GERAL	126
10 PERSPECTIVAS	127
REFERÊNCIAS	128
ANEXO I – PROPOSTA DE ENSAIO CLÍNICO	143
ANEXO II – TCLE DE FASE I	150
ANEXO III – MODELO DE PRONTUÁRIO (CRF) PARA FASE I.....	155
ANEXO IV – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	160
ANEXO V – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	162
ANEXO VI – PARECER DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO	163
ANEXO VII – CAPA DO ARTIGO CAPÍTULO 1	164
ANEXO VIII – CAPA DO ARTIGO CAPÍTULO 2.....	165
ANEXO IX – ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO CAPÍTULO 3.....	166
ANEXO X – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO CONGRESSO MEDTROP .	167

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença negligenciada, endêmica em todo o território brasileiro, tendo registrado 14.271 casos em 2022 e na região norte do país o registro foi de 6.860 casos (SINAN/SVS/MS, 2023; WHO, 2023). Essa doença apresenta manifestações clínicas diferenciadas sendo classificada em leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2017).

A doença é ocasionada por ao menos 13 espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* circulantes nas Américas, tendo como principais formas no seu desenvolvimento a forma promastigota e a forma amastigota. A transmissão desses parasitas é vetorial, sendo realizada durante o repasto sanguíneo de flebotomíneos fêmeas pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo) e conhecidos popularmente como mosquitos-palha, cangalhinha ou birigui (BRILHANTE; SÁBIO; GALATI, 2017).

No Brasil, destaca-se a circulação de ao menos sete espécies, sendo elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (TELES, *et al.*, 2016) e no Amazonas há a circulação de ao menos quatro delas, como: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *Leishmania (L.) amazonensis* (FIGUEIRA *et al.*, 2008).

Assim, considerando a diversidade de espécies de *Leishmania*, hospedeiros, vetores e manifestações clínicas, o Ministério da Saúde (MS) fez modificações no esquema terapêutico a ser adotado para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), preconizando a utilização de antimoniato de meglumina, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, isetionato de pentamidina e a pentoxifilina (BRASIL, 2017).

Entretanto, apesar da existência desse arsenal farmacoterapêutico para o tratamento da LT, ainda há limitações que devem ser superadas como à baixa eficácia dos medicamentos para todas as espécies de *Leishmania*, a alta toxicidade, a durabilidade do tratamento que de um modo geral é longo e doloroso, alto custo financeiro e resistência parasitária. Sendo assim, justifica-se a busca por novos princípios ativos que possam atuar de forma eficaz no tratamento dessa doença (BASTOS *et al.*, 2016).

Assim, diversas pesquisas têm buscado descobrir e desenvolver medicamentos mais eficazes e seguros para LT, e uma das alternativas é a utilização de produtos naturais, principalmente, dos vegetais, visto que estes produzem metabólitos secundários que podem ser utilizados para fins terapêuticos (HARDY *et al.*, 2012).

Nesse contexto, a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) var. *ferrea*, uma espécie vegetal pertencente a família Fabaceae, conhecida popularmente como Jucá ou Pau-ferro, tem despertado o interesse da comunidade científica quanto as suas propriedades biológicas, visto que a investigação da mesma tem demonstrado que essa planta possui propriedade anti-inflamatória (FALCÃO *et al.*, 2019), antidiarreica, anticatarrais, cicatrizantes, antidiabético, antitumoral (CARVALHO *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2012; MAIA; 2004) e antileishmania (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017; JENSEN, 2020).

Entretanto, é importante ressaltar que existe não só uma necessidade na busca de novos candidatos à fármacos para o tratamento da LT, mas também a investigação e o desenvolvimento de novas formulações mais eficazes na entrega dessas drogas, melhorando assim a eficácia do tratamento e reduzindo a toxicidade ao paciente (NASSIF *et al.*, 2017). Assim, as microemulsões constituem uma alternativa atraente pois apresenta as vantagens de utilizar menor quantidade do princípio ativo e atuar por meio do mecanismo de liberação controlada, promovendo redução da toxicidade, melhor disponibilidade e entrega direcionada (BASTOS *et al.*, 2016a). Além disso, essa formulação pode ser administrada por diferentes vias como oral, parenteral, tópica, ocular, dentre outras (KOGAN; GARTI, 2006).

Assim, esse o presente estudo tem como objetivos desenvolver duas formulações microemulsionadas uma contendo fração diclorometano de *Libidibia ferrea* e outra contendo galato de metila, com a finalidade de realizar uma avaliação pré-clínica como alternativa terapêutica para o tratamento leishmaniose cutânea em associação ao Glucantime® e sugerir um protocolo para a avaliação clínica toxicológica da microemulsão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença considerada negligenciada, ou seja, a principal ocorrência dessa doença é em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento; sendo endêmica e com notificação em todas as Unidades Federativas do Brasil (WHO, 2021; SINAN/SVS/MS, 2021).

A doença é ocasionada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e estes induzem a diferentes espectros clínicos no hospedeiro, que podem variar de lesões cutâneas localizada a formas mais agressivas com acometimento de mucosas e desenvolvimento de lesões destrutivas, assim, a LT tem sido classificada em leishmaniose cutânea e leishmaniose mucocutânea, respectivamente (BRASIL, 2017; SHIO *et al.*, 2014).

2.1.1 Histórico da Leishmaniose Tegumentar

Desde a antiguidade até os dias atuais distintas doenças acometem a humanidade, dentre estas pode ser citada a LT, visto que há relatos de estudos arqueológicos (vasos de cerâmicas com imagens humanas com a face mutilada) do período inca que sugerem a ocorrência da doença, conhecida anteriormente como uta e espúndia (VALE; FURTADO, 2005). Outros estudos realizados na área da paleomedicina sugerem a ocorrência de LT em múmias que datam de 1500 a.C., devido a achados com características de lesões cutâneas similares a leishmaniose tegumentar nesses cadáveres (STERVENDING, 2017).

Quanto a descoberta no Brasil, o registro de maior confiabilidade quanto a ocorrência da LT foi apresentada em 1908, na tese de Tello, “*Antigüedad de la syphilis em el Peru*”, referente à obra escrita, *Pastoral Religioso-Político Geographico*, editada em 1827; nesta obra há uma descrição de uma viagem na região amazônica realizada por um missionário, sendo apresentado relatos quanto a observação de pessoas que apresentavam lesões ulceradas em diferentes segmentos corporais e que acreditava-se estar associada a picada de insetos (VALE; FURTADO, 2005).

No Brasil acredita-se que a disseminação da doença ocorreu possivelmente no período da alta imigração da população brasileira para os estados da região norte em busca de trabalho nos seringais e que retornaram infectados posteriormente as suas cidades de origem, visto que a doença se apresentava endêmica principalmente na região amazônica (VALE; FURTADO, 2005).

Apesar da endemidade estar associada à região amazônica, em 1909, Lindenberg realizou a primeira descrição de casos ocorridos no Brasil, demonstrando que as lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam no interior do estado de São Paulo apresentavam protozoários idênticos às espécies de *Leishmania* já descritas no Velho Mundo e assim surgiu a denominação “leishmaniose ulcerosa” que posteriormente foi substituída para “leishmaniose tegumentar”, visto o seu acometimento ulceroso, vegetativo e infiltrante (BASANO; CAMARGO; ARANHA, 2004; LAINSON, 2010).

A descrição do parasita ocorreu somente em 1911, tendo sido realizada pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, que denominou o agente etiológico da leishmaniose tegumentar como *Leishmania braziliensis*. Além disso, Gaspar Vianna também foi o responsável pela descoberta do medicamento utilizado até os dias atuais para o tratamento da LT (NEVES, 2009).

Inicialmente acreditava-se que somente a *L. braziliensis* era responsável pela ocorrência da doença, entretanto, após a década de 70 iniciou-se a descoberta e classificação das diferentes espécies de *Leishmania* (por meio da observação do parasita na microscopia e comportamento clínico-evolutivo do paciente), envolvidas na ocorrência da LT (VALE; FURTADO, 2005).

Atualmente as diferentes espécies estão classificadas taxonomicamente no gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* e *Viannia* como proposto por Lainson & Shaw (1987); e com o desenvolvimento tecnológico novas espécies foram descritas, bem como os diferentes espectros clínicos da doença e distribuição geográfica, além de uma maior compreensão a respeito do vetor e reservatórios desses parasitas (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003).

2.1.2 Agente etiológico

A LT é ocasionada por diferentes protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* e *Viannia*; essa diversidade de espécies de *Leishmania* é responsável pelas diferentes manifestações clínicas, atualmente, são conhecidas 13 espécies circulantes nas Américas responsáveis pela ocorrência de LT e destas sabe-se da circulação de ao menos sete espécies em território brasileiro, sendo elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Quadro 1) (TELES, et al., 2016).

Quadro 1 – Relação entre as diferentes espécies de *Leishmania* do novo mundo, reservatório, vetor e aspecto clínico.

<i>Leishmania</i>	Reservatório	Vetor	Aspectos clínicos
<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	Roedores Humanos	<i>Lutzomyia olmeca</i>	LCL, LCD,
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Roedores Humanos	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	LCL, LD, LCD
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	Roedores Tamanduás Humanos	<i>Lutzomyia</i> spp.	LCL, LD, LMC
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	Preguiças Tamanduás Humanos	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	LCL, LMC
<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	Preguiças Humanos	<i>Lutzomyia trapidoictal</i>	LCL, LMC
<i>Leishmania (V.) peruviana</i>	Cães Humanos	<i>Lutzomyia verrucarum</i> <i>Lutzomyia pvmenis</i>	LCL
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	Tatus Humanos	<i>Lutzomyia davisii</i> <i>Lutzomyia ayrozai</i>	LCL

LCL: leishmaniose cutânea localizada, LD: leishmaniose cutânea disseminada, LCD: leishmaniose cutânea difusa, LMC: leishmaniose mucocutânea.

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

De acordo com Reis *et al.* (2019), o parasita *Leishmania* é encontrado em duas formas evolutivas principais: forma amastigota (obrigatoriamente intracelular, esférica, com flagelo internalizado, não móveis e que residem e se multiplicam nos fagolisossomos de células fagocíticas do hospedeiro vertebrado) e a forma promastigota (extracelular, alongada, fusiforme, flagelada, móvel e que se apresenta dentro dos flebotomíneos) (Figura 1).

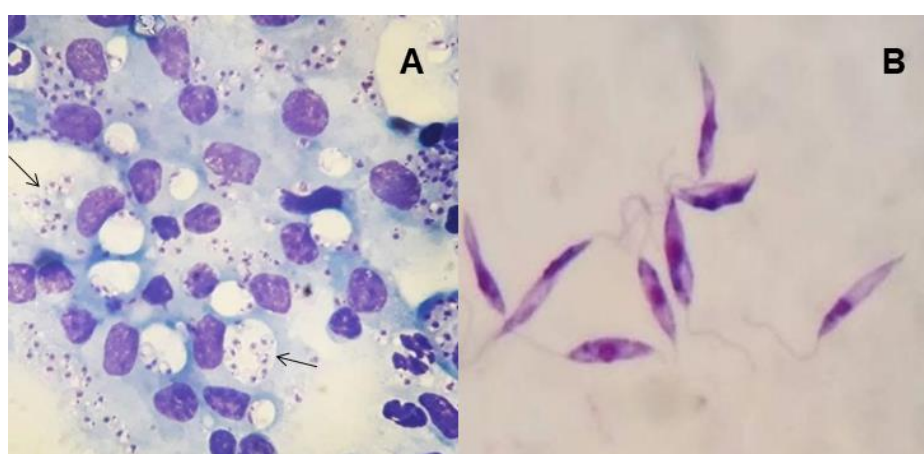


Figura 1. Formas evolutivas dos protozoários do gênero *Leishmania*. A – amastigotas interiorizadas em macrófagos e B – promastigotas. Fonte: CHAGAS (2021).

2.1.3 Vetor

Atualmente, sabe-se que o vetor da leishmaniose são os insetos denominados flebotomíneos e que ao menos 50 espécies classificadas nos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) estão envolvidas na transmissão das diferentes espécies de *Leishmania* sp. aos reservatórios, incluindo o homem (BARI; RAHMANA, 2008).

Os flebotomíneos (Figura 2) são insetos são pequenos (1 a 3 mm de comprimento), que possuem atividade crepuscular e que apresentam características peculiares como o corpo e asas cobertas de cerdas, coloração castanha clara ou cor de palha, o voo consiste em pequenos saltos e quando pousados permanecem com as asas entreabertas; devido a essas características esses insetos receberam diversos nomes populares como mosquito palha, tatuquiras, birigui, cangalha, cangalhinha, entre outros (BRASIL, 2013).



Figura 2. Inseto vetor. Fonte: Fiocruz (2015).

Vale ressaltar que apesar de ambos os sexos desse inseto necessitarem de carboidratos como principal fonte de alimentação, somente as fêmeas estão envolvidas na realização da hematofagia, sendo assim, somente as fêmeas são responsáveis pela transmissão das espécies de *Leishmania* aos hospedeiros (BARI; RAHMANA, 2008).

2.1.4 Ciclo biológico

Os flebotomíneos (fêmea) ingerem células contendo as formas amastigotas durante o repasto sanguíneo de reservatórios/hospedeiros infectados com *Leishmania* sp. Ao adentrar no flebotomíneo essas formas amastigotas rompem as células e iniciam um processo de diferenciação para as formas promastigotas procíclicas no trato digestório do vetor (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

As formas promastigotas procíclicas realizam a aderência pelo flagelo no trato digestório e iniciam o processo de divisão celular, após sucessivas divisões celulares, essas formas promastigotas migram para a válvula estomodeal e iniciam uma nova diferenciação, denominada metaciclogênese, momento em que as formas promastigotas procíclicas tornam-se metacíclicas, sendo estas últimas a forma altamente móvel e infectiva. Por fim, essas formas metacíclicas migram para o probóscide do flebotomíneo e durante um novo repasto sanguíneo estas serão inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Atualmente sabe-se que o processo de repasto sanguíneo está diretamente associado ao recrutamento de neutrófilos e macrófagos que serão responsáveis pela fagocitose das formas promastigotas metacíclicas que foram inoculadas durante o

repasto sanguíneo. Após o processo de fagocitose, essas formas promastigotas passam por um novo processo de diferenciação, transformando-se nas formas amastigotas e estas irão se associar a membrana interna do vacúolo e iniciar um novo processo de sucessivas divisões celulares. Por fim, essas formas amastigotas irão lizar as células hospedeiras e reiniciar o processo de infecção de novas células dentro do hospedeiro ou serão ingeridas novamente por flebotomíneos durante um novo repasto sanguíneo (Figura 3) (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

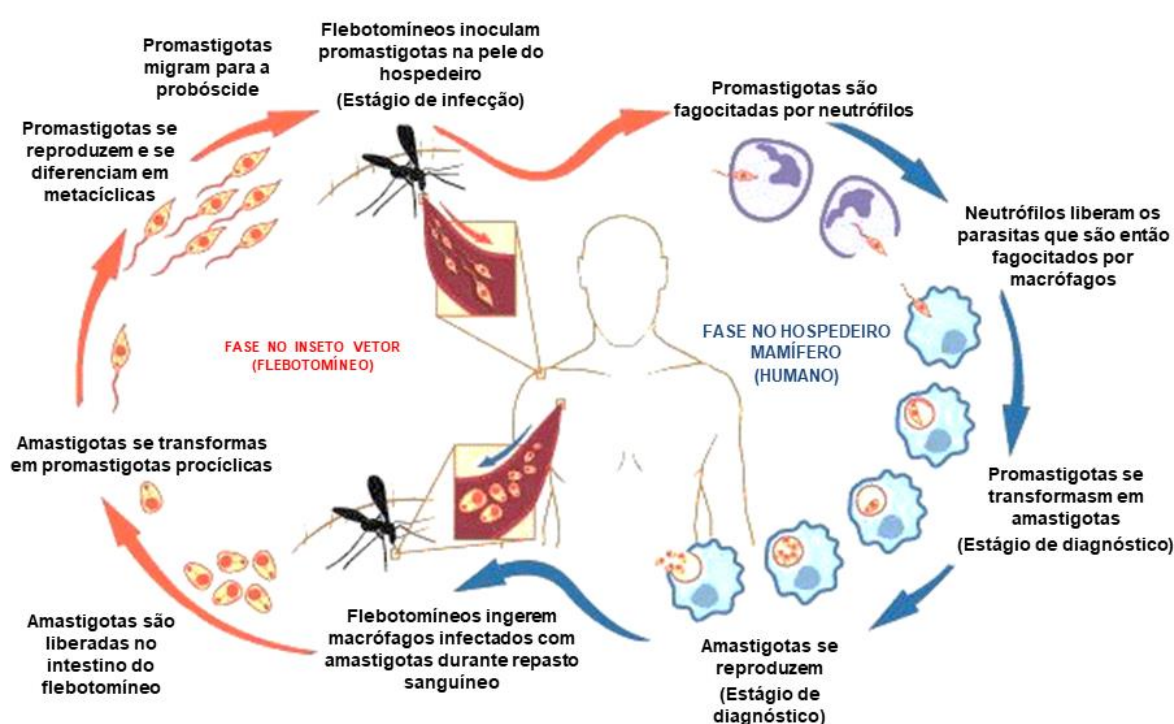


Figura 3. Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*. Fonte: Traduzido de Mcwire; Satoskar (2014).

2.1.5 Aspectos clínicos

As características clínicas diferenciam-se a depender da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, bem como fatores inerentes ao hospedeiro como aspectos genéticos e imunológicos (ROSSI; FASEL, 2017). Assim, o Ministério da Saúde classifica de um modo geral, as manifestações clínicas da LT em leishmaniose cutânea (localizada, disseminada ou difusa) e leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2017).

2.1.5.1 Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea (LC) é considerada a manifestação clínica menos severa, que ocorre em áreas do corpo expostas a picadas de insetos (orelhas, nariz, lábio superior, bochechas, pernas, mãos, antebraços e tornozelos), com um período de incubação que pode variar de duas semanas a meses (BRASIL, 2017; SUNDAR *et al.*, 2011).

A manifestação clínica de um modo geral apresenta lesão indolor, ulcerativa ou nodular, com formato arredondado ou ovalado, tamanho variando de 1 a 10 mm de diâmetro, com bordas bem delimitadas, base eritematosa, infiltrada e granulações grosseiras (BRASIL, 2017; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; REIS *et al.*, 2019). Entretanto, há uma diversidade de espectros clínicos e visando auxiliar no diagnóstico o Ministério da Saúde (2017) classificou a LC em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose recidiva cútis (LCC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Quadro 2).

Quadro 2 – Classificação das manifestações clínicas da leishmaniose cutânea.

Manifestação clínica	Características
Leishmaniose cutânea localizada	Lesão geralmente ulcerada, podendo ser única ou múltipla, ocorrendo o surgimento no local em que ocorreu a inoculação do parasita, com bom prognóstico de cura espontânea ou resposta ao tratamento, visto que tem como característica acometimento primário da pele (Figura 4A).
Leishmaniose cutânea disseminada	Múltiplas lesões com aspecto acneiforme e papula, apresentando-se em diferentes segmentos corporais, inclusive distante do local de inóculo do parasita, sugere-se que essa última característica esteja relacionada a disseminação do parasita por via linfática e hematogênica (Figura 4B).
Leishmaniose recidiva cútis	Ocorre por meio da recidiva da lesão, após ter ocorrido uma cura clínica (cicatrização), que pode ocorrer

	espontaneamente ou por trauma, mantendo-se o fundo com aspecto cicatricial (Figura 4C).
Leishmaniose cutânea difusa	Manifestação clínica rara, porém, grave, pois não apresenta resposta boa resposta terapêutica, iniciando com lesão única que posteriormente evolui disseminando-se por diferentes segmentos corporais de forma lenta com lesões nodulares e/ou em placas, sem presença de ulceração, tendo como principal característica a ocorrência em pacientes com deficiência específica na resposta imune (Figura 4D).

Fonte: Brasil (2017).



Figura 4 – Manifestações clínicas da leishmaniose cutânea. A – cutânea localizada, B – cutânea disseminada, C – cutânea recidiva cútis e D – cutânea difusa. Fonte: Brasil (2017).

2.1.5.2 Leishmaniose Mucocutânea

A maioria dos casos de leishmaniose mucocutânea (LMC) é causada pela *L. (V.) braziliensis*, mas há outras espécies envolvidas, como a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* (SACHDEVA *et al.*, 2014). A LMC pode coincidir com o envolvimento cutâneo ou ocorrer após a eliminação das lesões cutâneas, às vezes até um ano depois (REIS, 2018).

Essa manifestação clínica tem como característica o desenvolvimento de lesões destrutivas e desfigurantes das mucosas, tendo como principal acometimento a mucosa nasal, entretanto, há relatos de lesões na orofaringe, palato, lábios, língua,

laringe, traqueia e árvore respiratória superior, conjuntivas oculares, órgãos genitais e ânus (BRASIL, 2017; REIS, 2018). Devido à extensão das lesões é necessária a realização do tratamento para o controle da infecção, pois essa condição pode ser fatal (SACHDEVA *et al.*, 2014).

Assim como a leishmaniose cutânea, a forma LMC apresenta diferentes manifestações clínicas, dessa forma, o Ministério da Saúde classificou a LMC em mucosa tardia, mucosa sem lesão cutânea prévia, mucosa concomitante, mucosa contígua e mucosa primária (BRASIL, 2017) (Quadro 3).

Quadro 3 – Classificação das manifestações clínicas da leishmaniose mucocutânea.

Manifestação clínica	Características
Mucosa tardia	Forma mais comum que pode surgir até vários anos após a cicatrização da forma cutânea (Figura 5A).
Mucosa sem lesão cutânea prévia	Quando a lesão mucosa se apresenta clinicamente isolada, não sendo possível detectar nenhuma outra evidência de LC prévia (Figura 5B).
Mucosa concomitante	Quando a lesão mucosa ocorre à distância, porém ao mesmo tempo em que a lesão cutânea ativa (Figura 5C).
Mucosa contígua	Ocorre por propagação direta de lesão cutânea localizada próxima a orifícios naturais, para a mucosa das vias aerodigestivas (Figura 5D).
Mucosa primária	Ocorre eventualmente pela picada do vetor na mucosa ou semimucosa de lábios genitais (Figura 5F).



Figura 5 – Manifestações clínicas da leishmaniose mucocutânea. A – mucosa tardia, B – mucosa indeterminada, C – mucosa concomitante, D – mucosa contígua e E – musoca primária. **Fonte: Brasil (2017).**

Segundo Teles *et al.* (2016), a diversidade de manifestações clínicas da LT está associada diretamente a diversidade de espécies de *Leishmania* e no Brasil sabe-se da circulação de sete espécies, sendo elas *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* e no Amazonas, segundo estudo de Figueira *et al.* (2008) circulam aos menos quatro espécies, sendo ela *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

2.1.6 Aspectos imunopatológicos

A evolução da infecção por *Leishmania* sp. está diretamente associada a população que possui maior vulnerabilidade social, como o grau de desnutrição, presença de comorbidades, diferenças regionais (espécie do parasita circulante), grupo populacional acometido, resposta imune e polimorfismos genéticos (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014; ROSSI; FASEL, 2017).

Dentre os diversos fatores que estão relacionados a evolução e severidade da LT, pode-se inferir que o sucesso do hospedeiro depende em grande parte da atuação do sistema imune, principalmente no momento inicial da infecção e da resposta mediada por células; assim a secreção de citocinas e quimiocinas tornam-se essenciais para o direcionamento e estimulação da resposta imune. Apesar dos diversos estudos realizados visando a compreensão dos mecanismos de defesa e a associação destes as diferentes apresentações clínicas da LT, ainda não foi possível traçar um panorama completo da relação entre capacidade de infecção do parasita e resposta imune do hospedeiro (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014).

Atualmente alguns estudos sugerem que as células CD4⁺ compõem as células efectoras mais importantes no processo de resposta imune em casos de infecção por *Leishmania* sp., e essas células se dividem em pelo menos duas subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th1 e T2), infecções que apresentam maior prevalência de células Th1 possuem infiltrado inflamatório dominado por IFN- γ , estando estas correlacionadas a resistência à infecção, ao contrário deste, infecção que apresentam maior prevalência de células Th2 estão relacionado a maior produção de citocinas IL-4 e IL-10, estando assim, associado à maior suscetibilidade e incapacidade de controle parasitário (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Assim, percebe-se a importância da investigação da participação das interleucinas e nesse sentido, alguns estudos têm concentrado as investigações na compreensão da participação da secreção da IL-6 e a evolução da infecção, visto que tornou-se perceptível que macrófagos infectados com *Leishmania* sp. apresentaram uma redução da produção de IL-6 (CRAIG *et al.*, 2017), além disso, Castellucci *et al.* (2006), relataram uma possível correlação entre a inibição da secreção de IL-6 em macrófagos de pacientes com a progressão da doença para a forma mucosa.

De um modo geral, é importante considerar nos estudos a interações entre as diferentes células do sistema imune e a participação das interleucinas, visando compreender como estas estão relacionadas com controle da infecção parasitária e a inibição ou progressão da doença (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014).

2.1.7 Epidemiologia

Devido às dificuldades em realizar um controle adequado da ocorrência da LT em regiões remotas torna-se difícil estimar a real incidência da doença, entretanto estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente (WHO, 2021).

Segundo a *World Health Organization* - WHO (2021), a leishmaniose cutânea é uma doença que apresenta distribuição mundial e segundo o DNDi (2018) a maioria dos casos estão distribuídos no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã e Síria.

Nas Américas foi notificado por 17 países um total de 1.105.545 casos de LT (cutânea e mucosa) no período que compreende 2001 a 2021, apresentando uma

média de 52.645 casos por ano (OPAS, 2022). Ainda segundo a Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS (2022), em 2021, os países com maior número de casos notificados foram: Brasil (15.023), Colômbia (6.175), Peru (5.201), Bolívia (2.166) Venezuela (1.808) e Panamá (1.286).

Segundo o Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN (2023), em 2022, no Brasil houve um total de 14.271, destes 6.860 casos foram notificados na região norte (Figura 6A) e as Unidades Federativas da região norte que apresentaram maior quantidade de casos notificados foram o Pará (3.070 casos), Amazonas (888 casos) e Acre (836 casos) (Figura 6B).

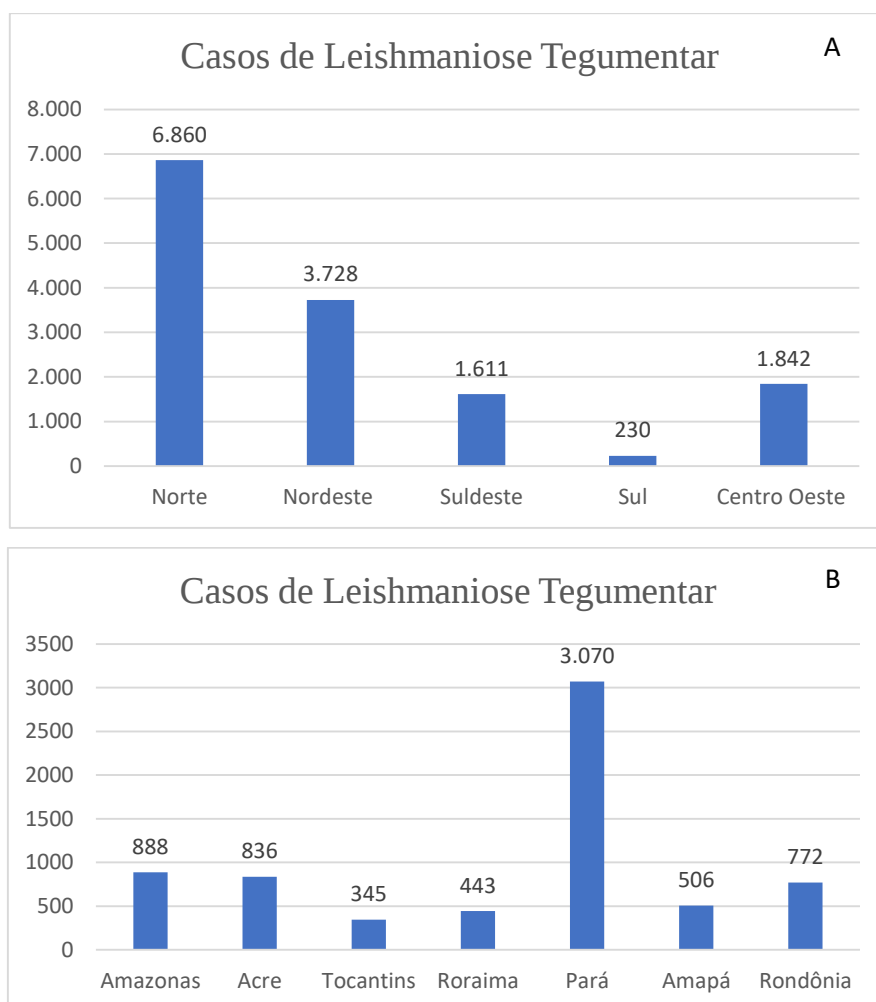


Figura 6 – Casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) no Brasil em 2022. A – casos de LT nas diferentes regiões brasileiras e B – casos de LT nas Unidades Federativas da região norte do Brasil. Fonte: SINAN/SVS/MS (2023).

2.1.8 Tratamento

O arsenal de fármacos e protocolo terapêutico da LT é preconizado pelo Ministério da Saúde no Brasil e consiste, atualmente, em uma observação quanto à realidade brasileira, assim, para a escolha do esquema terapêutico deve-se levar em consideração a manifestação clínica, a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, a resposta ao tratamento, à avaliação de risco-benefício ao paciente e a disponibilidade do medicamento no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2017).

Os medicamentos utilizados no Brasil são representados pelos antimoniais pentavalentes que estão disponíveis no mercado sob a formulação de antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi Aventis) (HOLANDA *et al.*, 2018); e os representados pelos não antimoniais, sendo eles isetionato de pentamidina e desoxicolato de anfotericina B (BRASIL, 2017).

O tratamento para a LT foi descoberto e introduzido em 1912, pelo médico brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna por meio da utilização de sais de antimônio trivalente (Sb^{III}), mais especificamente tartarato de antimônio e potássio emético, porém, devido a alta toxicidade a utilização desse medicamento foi suspenso e somente em 1947 foi introduzida a utilização do antimônio pentavalente (Sb^V) (CARVALHO *et al.*, 2019). Atualmente, o esquema terapêutico com Sb^V (Figura 7) consiste na administração de 10 a 20 mg/ Sb^{+5} /Kg/dia, devendo ser realizada preferencialmente por via endovenosa (EV), entretanto, pode também ser administrado por via intramuscular (IM) ou intralesional (IL) (BRASIL, 2017).

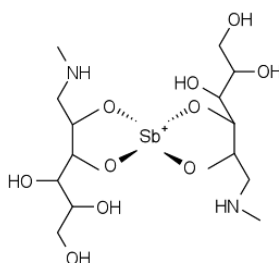


Figura 7 - Estrutura química do antimonial pentavalente (antimoniato de meglumina). BKchem®. Fonte: Próprio autor (2022).

A via IL é indicada quando há alguma contraindicação da administração desse fármaco por via sistêmica, sendo recomendado o uso do antimoniato pentavalente em

lesões menores que 3 cm e não localizadas em superfícies articulares ou faciais (OPAS, 2013); segundo o esquema terapêutico estabelecido pelo Ministério da Saúde deve-se realizar três aplicações, por via subcutânea de, aproximadamente, 5 mL por sessão, com intervalo de 15 em 15 dias (BRASIL, 2017).

Apesar do tempo de uso do antimônio pentavalente como monoterapia o mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado, assim algumas hipóteses são levantadas na literatura como a interferência na bioenergética das formas amastigotas por meio da inibição da glicose e a oxidação de ácidos graxos, com consequente redução da produção de ATP e GTP (BERMAN, 1998); outra hipótese sugere que o Sb^V atua como um pró-fármaco, ou seja, é necessário que ocorra a redução de Sb^V para Sb^{III} para que ocorra a eficácia contra os parasitas (FRÉZARD; SCHETTINI, 2005) e ainda há hipóteses que sustentam a possibilidade do Sb^V atuar produzindo danos ao DNA das células hospedeiras infectadas por meio da geração de espécies de oxigênio, os quais disparam mecanismos de resposta celular ao estresse oxidativo (MOREIRA, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

Segundo Alavi-Naini *et al.* (2012), o único tratamento eficaz com resultados clínicos e parasitológicos satisfatórios para todas as formas clínicas de LT é alcançado com o Sb^V . Entretanto, atualmente o Ministério da Saúde preconiza que o uso do Glucantime® deve levar em consideração a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, manifestação clínica do paciente e tempo de tratamento (BRASIL, 2017).

Essa modificação na escolha da utilização do Glucantime® se deu principalmente devido a utilização desse medicamento como monoterapia para LT durante décadas, o que propiciou a ocorrência de resistência parasitária ao medicamento, principalmente em pacientes acometidos pelas formas LD, LCD e LMC (SILVA-JÚNIOR, 2013). Assim, o Ministério da Saúde preconiza a utilização do Glucantime® para todas as manifestações clínicas de LT, exceto quando esta for ocasionada pela espécie *L. (V.) guyanensis*, falha terapêutica ou outras contraindicações, sendo necessário optar pelo uso do isetionato de pentamidina ou desoxicolato de anfotericina B (BRASIL, 2017).

O isetionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) de pentamidina (Figura 8) é pertencente às diamidinas aromáticas e o fármaco (Pentacarinat®) é comercializado em um frasco - ampola com 300 mg do sal, sendo recomendado a dose de 3 - 4 mg/Kg/dia por via EV lenta ou IM (BRASIL, 2017). Essa medicação tem apresentado

eficácia no tratamento de LT ocasionado por *L. (V.) guyanensis*, tendo a vantagem de possuir um tratamento com menor tempo e efeitos adversos quando comparado ao Glucantime® (NEVES *et al.*, 2011).

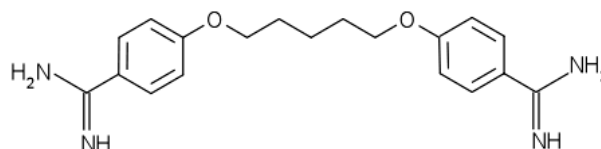


Figura 8 - Estrutura química do isetonato de pentamidina. BKchem®. Fonte: Próprio autor (2022).

Assim como as demais drogas utilizadas para LT, deve-se considerar que o uso do Pentacarinat® pode induzir a reações adversas como dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação intramuscular, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotímias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Devido ao medicamento ter ação tóxica aguda sobre as células beta-pancreáticas, pode haver hipoglicemia durante o tratamento e diabetes mellitus tardio (BRASIL, 2017).

Outro medicamento preconizado pelo Ministério da Saúde é o desoxicolato de anfotericina B (Figura 9) que consiste em um antibiótico polieno, sendo este também disponibilizado no Brasil em formulações lipídicas (BRASIL, 2017). A apresentação comercial é uma formulação de suspensão coloidal em um frasco contendo 50 mg de desoxicolato sódico liofilizado de anfotericina B; a dose recomendada pelo Ministério da Saúde é 0,7 a 1 mg/Kg/dia e a via de aplicação deve ser EV lenta (BRASIL, 2017).

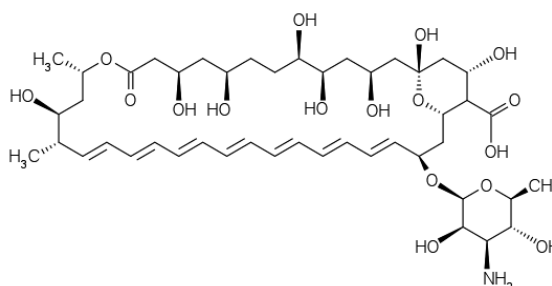


Figura 9 - Estrutura química do desoxicolato de anfotericina B. BKchem®. Fonte: Próprio autor (2022).

Segundo informações da Ambiosome (2015) e Brasil (2017), o medicamento é bem tolerado e apresenta como efeitos colaterais mais comuns náusea, vômitos e cefaleia leve. Apresenta contraindicações de uso em pacientes que apresentam hipersensibilidade a qualquer constituinte da formulação, cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas; enquanto que em gestantes deverá ser utilizado somente se os possíveis benefícios se sobrepuserem aos potenciais riscos envolvidos.

Apesar de existir diferentes fármacos preconizados pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LT, há uma eficácia relativa destes, visto que todos os medicamentos apresentam relatos de toxicidade, custo expressivo, resistência parasitária, tratamento longo e doloroso, dentre outras limitações, assim outros princípios ativos têm sido empregados no tratamento da LT como via alternativa e outros estão sendo avaliados como potenciais medicamentos futuros (BASTOS *et al.*, 2016b).

2.1.9 Tratamento alternativo e associação terapêutica

Devido à utilização durante décadas da monoterapia funcional, por meio do uso exclusivo dos antimoniais para o tratamento de todas as manifestações clínicas da LT houve o desenvolvimento de cepas resistentes, além disso, os tratamentos atuais (antimoniais e não antimoniais) que vem sendo utilizado não são considerados ideais, pois apresentam alta toxicidade, alta durabilidade do tratamento e ausência de cura parasitológica; assim, o tratamento da LT ainda é um desafio e diversos estudos tem se empenhado para descobrir e desenvolver novas terapias (MENEZES *et al.*, 2015; ABAMOR; ALLAHVERDIYEV, 2016)

Nesse sentido há diferentes estratégias que estão sendo adotadas nessa busca por novas terapias, podendo ser citado a estratégia de reposicionamento de fármacos; ou a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos; ou a associação de drogas já conhecidas ou recém-descobertas (FRÉZARD; SCHETTINI, 2005).

O reposicionamento de fármacos tem sido bastante explorado e há drogas que já estão em uso para o tratamento da LT, como é o caso da anfotericina B (antibiótico antifúngico para tratar infecções generalizadas, mas no Brasil é preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LT) (BRASIL, 2017), a paromomicina (antibiótico aminoglicosídeo produzido por bactérias do gênero *Streptomyces*) (SILVA,

2015), a azitromicina (antibiótico preconizado no tratamento de diversas doenças infecciosas) (BLUM; HATZ, 2009), recentemente a miltefosina (originalmente desenvolvida como fármaco antineoplásico) (ALMEIDA; SANTOS, 2011; HOLANDA *et al.*, 2018), rifampicina (REIS *et al.*, 2019), metronidazol e cetoconazol, sendo esta última investigada no tratamento de LT ocasionada por *L. mexicana* (SANTOS, 2018).

Outra estratégia que tem sido investigada no intuito de melhorar o tratamento da LT é a identificação de novos alvos potenciais em parasitas e/ou nas células hospedeiras, assim, é essencial que sejam desenvolvidos estudos na busca de elucidar as interações parasita-hospedeiro facilitando o processo de descoberta e desenvolvimento de drogas mais eficazes contra a infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania* (RIBEIRO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2018; SAUDAGAR *et al.*, 2014).

Além disso, é importante ressaltar que há estratégias que estão buscando protocolos alternativos, como a associação de terapias e estas tem sido aplicada com sucesso para doenças negligenciadas (MESQUITA, 2018), no contexto da LT o uso de terapias combinadas tem sido utilizado visando o aumento da eficácia, diminuição da toxicidade, redução do tempo de tratamento com consequente redução de doses e prevenindo o aparecimento de resistência parasitária (AGUIAR *et al.*, 2010; VAN GRIENSVEN *et al.*, 2010).

Nesse sentido, recentemente, o Ministério da Saúde preconizou a associação do Glucantime® com a pentoxifilina (fármaco da classe de vasodilatadores periféricos com propriedades hemorreológicas), mas, há outros estudos nessa linha de investigação que demonstraram que a associação de gel de paromomicina por via tópica e miltefosina oral apresentou-se como uma alternativa eficaz no tratamento da LC experimental em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (AGUIAR *et al.*, 2010).

Assim, observa-se que as pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de realizar reposicionamento de fármacos, buscar novos princípios ativos, desenvolver novas formulações farmacêuticas, investigar a associação de drogas já conhecidas ou recém-descobertas, sejam estas provenientes de produtos naturais, sintéticos ou semissintéticos (JAIN *et al.*, 2011).

2.2 Produtos Naturais

Os produtos naturais são conhecidos na farmacologia por terem aplicações potenciais como medicamentos terapêuticos, visto que estes contribuem para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos a partir das estruturas químicas (SCHMIDT *et al.*, 2012). Assim, diversas pesquisas têm concentrado esforços na busca por princípios ativos presentes em produtos naturais, pois estes são fontes potenciais de compostos biologicamente ativos (GARZON *et al.*, 2021)

Dentre os diversos produtos naturais estudados os vegetais recebem destaque, pois a biodiversidade de plantas no Brasil é considerada a maior do mundo, com uma estimativa de mais de 55 mil espécies descritas (22% do total de espécies do planeta) (LIMA; LIMA, 2021). Além disso, estas são utilizadas desde os primórdios com finalidades medicinais, compondo alternativas terapêuticas complementares ao tratamento de doenças, visto que estas apresentam um rico arsenal de produtos químicos (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021), com uma diversidade de metabólitos secundários estruturalmente únicos (JENSEN, 2020).

Os metabólitos secundários presentes nas raízes, caules, folhas, frutos, sementes e outras partes das plantas são um resultado da interação do ambiente com os mecanismos fisiológicos das plantas, sendo estes produzidos por determinadas espécies vegetais como um mecanismo de sobrevivência a determinadas condições ecológicas e perpetuação (SCHMIDT *et al.*, 2012).

Além dos benefícios as plantas, sabe-se que os metabólitos secundários podem ser biologicamente ativos quanto à atividade terapêutica, assim, há um crescente interesse em pesquisas com os vegetais, buscando desvendar possíveis fitoterápicos e/ou novas moléculas que possam atuar como princípio ativo para a produção de medicamentos (MOREIRA *et al.*, 2021).

A fitoterapia é uma prática da medicina popular desde os tempos mais remotos, sendo utilizada como terapia complementar a tratamentos instituídos, consistindo, de um modo geral, na utilização de plantas visando obter resultados terapêuticos, entretanto, estes são promovidos por meio da interação dos diversos componentes químicos biologicamente ativos existentes no vegetal (CASTRO *et al.*, 2004). Assim, é essencial o uso seja realizado de maneira racional e adequado, pois estas moléculas

podem ser benéficas ou apresentar um risco potencial à saúde (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Assim para que se tenha segurança e eficácia, bem como o uso de forma racional e sustentável de uma planta medicinal é necessário que seja realizada a identificação correta da planta e da parte que apresenta as propriedades terapêuticas, além de ser essencial o conhecimento sobre modo de preparo, uso e dosagem apropriada para consumo (COLET *et al.*, 2015).

Inclusive a Organização Mundial de Saúde tem incentivado pesquisas que buscam investigar os benefícios do uso de fitoterápicos para diversas enfermidades, incluindo as doenças negligenciadas que constituem um grupo de doenças que não recebem ou recebem poucos investimentos para o desenvolvimento de novas drogas, dentre essas doenças encontra-se a LT (SILVA *et al.*, 2018).

Inúmeras pesquisas tem demonstrado o potencial antileishmania *in vitro* de compostos químicos presentes em extratos vegetais, podendo ser citado principalmente os terpenos que são os compostos secundários mais abundantes em espécies do gênero *Casearia* (família Salicaceae) (MENEGUETTI *et al.*, 2015); os flavonoides que tem apresentado atividade leishmanicida e são abundantes em flores, frutos, grãos e chás (CARTER *et al.*, 2021); os alcaloides encontrados nas cascas de caule, flores e folhas de várias plantas como das famílias Rutaceae, Apocinaceae, Fabaceae, Moraceae e Euphorbiaceae) (SAKYI *et al.*, 2021); dentre outros.

Dentre as famílias dos vegetais, a família Fabaceae tem despertado o interesse quanto à investigação de seus metabólitos secundários, pois a mesma apresenta diferentes espécies de vegetais que possuem metabólitos secundários como flavonoides, alcaloides, terpenoides e esteroides, sendo estes conhecidos como possíveis princípios ativos para aplicação na medicina (JENSEN, 2020).

2.2.1 *Libidibia ferrea*

A família botânica Fabaceae é considerada a maior família em número de espécies e no Brasil apresenta grande importância quanto a sua diversidade, pois estima-se que essa família possua 2.700 espécies em mais de 200 gêneros (SOUZA; BASTOS; ROCHA, 2009; SOUZA; LORENZI, 2012). Atualmente essa família

apresenta-se dividida em três subfamílias, sendo elas Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae (IGNOATO, 2012).

Uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae que tem despertado o interesse da comunidade científica é a *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz var. *ferrea*, pertencente a subfamília Caesalpinioideae (Caesalpinioideae, leguminose) e tem como basônimo *Caesalpinia ferrea* Mart. ex. Tul. (CHASE *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2010).

A *L. ferrea* é uma espécie nativa do Brasil que se apresenta distribuída nas regiões norte e nordeste sendo conhecida de forma popular como jucá, pau ferro, ibirá-obi, imirá-itá (DI STASI, 1996; SOUZA, 2007). É classificada como uma planta arbórea (Figura 10A), com altura de 10 a 15 metros, e tronco curto de 40 a 60 cm de diâmetro (SOUZA; LORENZI, 2012), morfologicamente as folhas (7 a 20 cm) são compostas, folioladas e cobertas com pelos amarelos; as flores são amarelas, pequenas, em cachos e os frutos (8,3 x 1,8 x 0,8 cm) indeiscentes de cor marrom escuro, tipo legume (Figura 10B), com sementes (0,9 x 0,5 x 0,5 cm) escuras (Figura 10C) (FERREIRA; SOARES, 2015).



Figura 10 - *Libidibia ferrea* (Mart. ex. Tul.) L.P. Queiroz. (A) Frutificação da Espécie vegetal; (B) Fruto maduro; (C) Fruto triturado e sementes removidas. Fonte: Jensen (2020).

A *L. ferrea* é uma das plantas medicinais listadas como de interesse para o Sistema de Saúde Brasileiro, pois esta apresenta inúmeras indicações para fins terapêuticos como ação analgésica, antipirética, antiinflamatória e/ou antiespasmódica (BRASIL, 2006), dentre outras, podendo ser utilizado às folhas, cascas, semente, raízes e pedaços de madeira (DI STASI, 1996).

Possivelmente a vasta indicação terapêutica da *L. ferrea* está associada às diferentes moléculas biotivas nessa planta, visto que Gonzales, Barros e Bacchi (2004) demonstraram em um estudo fitoquímico que o extrato hidroalcóolico da casca e das folhas foi encontrado a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos.

Na literatura há relatos da *L. ferrea* apresentando atividade celulásica, anticoagulante e larvicida contra *Aedes aegypti* (CAVALHEIRO *et al.*, 2009), repelente (FERNANDES *et al.*, 2016), antidiarreicos, anticatarrais, cicatrizantes, antidiabético, prevenção do câncer (CARVALHO *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2012; MAIA; 2004), anti-inflamatória (FALCÃO *et al.*, 2019) e antileishmania (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017; JENSEN, 2017).

No estudo realizado por Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) e Jensen (2020) extratos e frações de *L. ferrea* foram avaliadas *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentando resultados promissores com redução da viabilidade parasitária; tendo sido também observado resultados promissores em ensaios *in vivo* com formulações de hidrogel contendo extrato de *L. ferrea* (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017) e microemulsão contendo extrato de *L. ferrea* (JENSEN, 2017) em hamsters infectados com *L. (L.) amazonensis*. Além disso, é relatada a ausência de citotoxicidade *in vitro* dos extratos e frações de *L. ferrea* em macrófagos peritoneais murinos (JENSEN, 2020) e macrófagos de linhagem J774 (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017), sugerindo que a *L. ferrea* apresenta potencial como um fitoterápico para o tratamento da LT.

Entretanto, é necessário ressaltar que não há necessidade somente de drogas alternativas para o tratamanento da LT, é necessário também que seja realizado desenvolvimento de novas formulações mais eficazes na entrega dessas drogas, melhorando assim a eficácia do tratamento e reduzindo a toxicidade ao paciente (NASSIF *et al.*, 2017).

2.3 Galato de metila

Moléculas bioativas podem ser extraídas de plantas medicinais e microrganismos (GARZON *et al.* 2021; JENSEN, 2020). O galato de metila é um composto fenólico que pode ser encontrado em plantas que apresentam atividade

antileishmania promissora, como *Libidibia ferrea* (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017), *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) (KAUR *et al.*, 2014), *Margaritaria nobilis* Lf (Phyllanthaceae) (MORAES *et al.*, 2015).

O galato de metila extraído de *L. ferrea* foi avaliado *in vitro* quanto à atividade antileishmania por Jensen (2020), e demonstrou atividade antileishmania em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e ausência de perfil citotóxico. Dias e cols. (2020) avaliaram o galato de metila adquirido comercialmente e relataram a capacidade da substância em inibir efetivamente o crescimento de promastigotas *in vitro* e reduzir a taxa de infecção de macrófagos por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

2.4 Nanomedicina e sistemas microemulsionados

Há alguns anos com os avanços tecnológicos a área da saúde passou a receber uma contribuição da nanotecnologia para o desenvolvimento de tecnologias em escala nanométrica que sejam recicláveis, sustentáveis, confiáveis e baratas, sendo esta uma área interdisciplinar que busca criar interações entre o conhecimento da nanociência, nanoengenharia e nanotecnologia (SANCHEZ *et al.*, 2011; BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

A nanomedicina é uma ciência interdisciplinar que tem como foco o desenvolvimento de produtos e/ou moléculas biológica em nanoescala podendo ter aplicabilidade no diagnóstico, tratamento e medicina regenerativa (PELAZ *et al.*, 2017). Dentre os diversos nanossistemas, destacam-se os lipossomas, nanopartículas, nanoemulsões e microemulsões (SILVA, 2004).

A utilização das microemulsões surge como uma formulação interessante, pois apresenta as vantagens de utilizar menor quantidade do princípio ativo e atuar por meio do mecanismo de liberação controlada, promovendo redução da toxicidade, melhor disponibilidade e entrega direcionada (BASTOS *et al.*, 2016a). Além disso, essa formulação pode ser administrada por diferentes vias como oral, parenteral, tópica, ocular, dentre outras (KOGAN; GARTI, 2006).

As microemulsões podem veicular fármacos hidrofílicos e lipofílicos, constituindo sistemas homogêneos, termodinamicamente estáveis, isotrópicos e

transparentes ou translúcidos, pouco viscosos, sendo considerados sistemas líquidos ideais para a liberação de fármacos (HO *et al.*, 1996).

A composição das microemulsões consiste basicamente em óleo, água, tenso ativo e cotensoativo, com suas proporções definidas por meio da construção de um diagrama de fases (EL MAGHRABY, 2008). De um modo geral, na microemulsão a fase oleosa está dispersa em um meio aquoso ou fase aquosa no meio oleoso (Figura 11A), gerando uma interface óleo/água (Figura 11B) e apresentando gotículas da fase interna na ordem de nanômetros (nm) (ZHU *et al.*, 2008), além disso, a utilização de princípios ativos de origem orgânica pode aumentar a eficiência desses produtos (BASTOS *et al.*, 2016a).

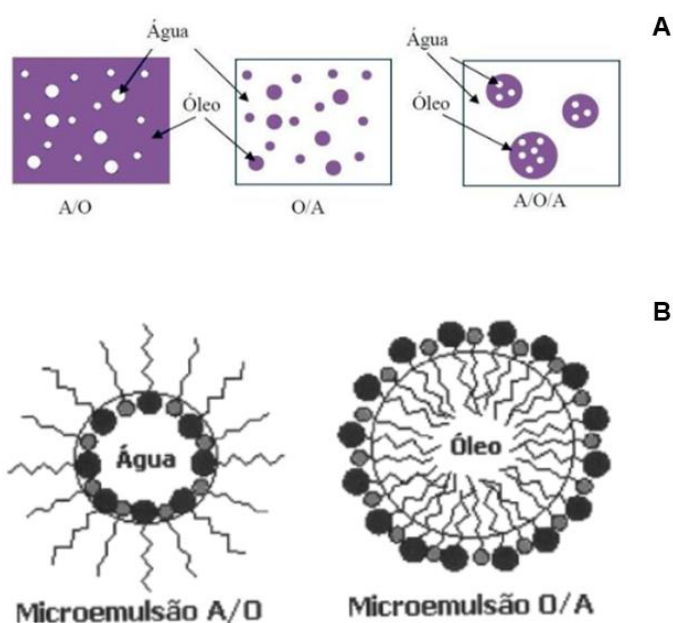


Figura 11 – Diferentes tipos de emulsões (A) e estrutura das microemulsões (B). Fonte: Santos (2011) e Oliveira *et al.* (2004).

Os sistemas nanoestruturados são promissores no tratamento de doenças nas quais os fármacos tradicionais não possuem ação ou apresentam ação baixa, entretanto o desenvolvimento de formulações que atendam as etapas para a produção de um novo medicamento tem sido ainda um dos maiores desafios da indústria farmacêutica e nesse sentido as microemulsões apresentam-se como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de fármacos para diferentes doenças como a LT (FONSECA *et al.*, 2013; PIRES, 2014).

Alguns estudos foram desenvolvidos visando avaliar a utilização de microemulsões como carreador de substâncias com potencial atividade antileishmania; no estudo realizado por Oliveira (2012) uma microemulsão contendo fluconazol foi avaliada quanto à eficácia na redução da viabilidade parasitária *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* e os resultados demonstraram ineficácia. Diferentemente deste, em estudo realizado por Veerareddy, Vobalaboina e Nahid, (2004) foi realizada a avaliação de uma microemulsão contendo uma substância derivada de *Piper nigrum* (pimenta preta) e esta induziu uma redução da carga parasitária de BALB/c infectados de *L. donovani* de 78% (fígado) e 75% (baço).

No estudo realizado por Jensen (2017) uma microemulsão contendo a fração diclorometanos de *L. ferrea* controlou o desenvolvimento da lesão e redução da carga parasitária em hamster infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Assim, é importante que novos estudos sejam realizados visando investigar as microemulsões como potenciais formulações para o tratamento da LT, porém é preciso analisar a performance das formulações em ensaios *in vitro* e *in vivo* (OLIVEIRA, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver formulações microemulsionadas contendo compostos bioativos (fração diclorometano de *Libidibia ferrea* e galato de metila) e realizar a avaliação pré-clínica como alternativa terapêutica para a leishmaniose cutânea em associação ao Glucantime®.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1: Current situation of Cutaneous Leishmaniasis and challenges of drug resistance: a narrative review

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre os aspectos gerais da leishmaniose cutânea (aspectos parasitários, epidemiológicos e diagnósticos);
- Apresentar o arsenal e esquema terapêuticos preconizados pelo Ministério da Saúde para tratamento da leishmaniose cutânea e os desafios de resistência a estas drogas.

Capítulo 2: Evaluation of the *in vivo* and *in vitro* effect of *Libidibia ferrea* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

- Avaliar a citotoxicidade do extrato MeOH e fração diclorometano (DCM) obtidos da *L. ferrea* em macrófagos de linhagem RAW 264.7;
- Avaliar a atividade antileishmania do extrato MeOH e fração DCM obtidos da *L. ferrea* em formas amastigotas interiorizadas em macrófagos de linhagem RAW 264.7;
- Averiguar a concentração *in vitro* da citocina IL-6 em sobrenadante de cultivo de células RAW 264,7 infectadas por *L. (L.) amazonensis* expostas ao extrato MeOH e fração diclorometano (DCM) obtidos da *L. ferrea*;
- Produzir a microemulsão tópica contendo a fração DCM de *L. ferrea*;

- Avaliar a atividade antileishmania de uma microemulsão contendo a fração DCM de *L. ferrea* de forma isolada e associada ao Glucantime® no tratamento experimental da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Capítulo 3: Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: an *in vivo* assay

- Produzir e caracterizar a microemulsão tópica contendo o composto fenólico galato de metila;
- Avaliar a atividade antileishmania de uma microemulsão contendo galato de metila de forma isolada e associada ao Glucantime® no tratamento experimental da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

4. METODOLOGIA GERAL

Esta pesquisa trata-se de um estudo experimental na área de tratamento para leishmaniose cutânea e foi desenvolvido nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pela Dra. Antonia Maria Ramos Franco;
- Laboratório de Química de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, coordenado pela Dra. Maria da Paz Lima;
- Laboratório Temático Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, coordenado pelo Me. Leonardo Brandão Matos;
- 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 Geraldi;
- Departamento de Microbiologia e Biologia Celular, Universidade da Flórida, sob a colaboração do Dr. Peter Kima.

4.1 REVISÃO DE LITERATURA

Foi realizada uma revisão narrativa por meio do levantamento de informações na literatura sobre aspectos relevantes da leishmaniose tegumentar, tendo sido investigado atualizações parasitológicas, epidemiológica, de diagnóstico e desafios quanto ao tratamento.

O levantamento de dados científicos referentes a temática foi realizado nas bases de dados *Scopus*, *Science Direct*, *Google Scholar*, *CAPES* e *PubMed*, no período de entre 1986 a 2020, tendo sido utilizado a combinação das palavras-chave: “Leishmaniose”, “tratamento”, “falha de tratamento” e “resistência a medicamentos”.

4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PARTIÇÃO DOS EXTRATOS – *LIBIDIBIA FERREA*

Amostras do fruto de *Libidibia ferrea* foram obtidas em Manaus, Amazonas, Brasil (3° 4'34 "S 60° 0'11" W). Foi feita uma exsicata da espécie vegetal, que foi depositado no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e identificados sob o número 246150 e cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número AF46200. Os frutos foram triados e, após a retirada das sementes, seco em estufa de circulação forçada, à temperatura de 40 °C. Após a secagem, foram pulverizadas e extraída com os solventes hexano e metanol.

A fração diclorometano (DCM) do extrato de *L. ferrea* foi obtida por partição líquido-líquido. Foram utilizados 20 g do extrato metanólico solubilizado em 200 mL de H₂O:MeOH e fez três extrações com cada um dos solventes utilizados na partição (hexano e diclorometano). Este procedimento permitiu uma separação preliminar dos constituintes químicos para a avaliação da atividade antileishmania usando a fração DCM. A fração foi concentrada usando um evaporador rotativo (Yamamoto®) (JENSEN, 2020).

4.3 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS *IN VITRO*

4.3.1 Manutenção dos parasitas e preparo de massa parasitária

A cepa utilizada nesse estudo foi *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), criopreservadas no criobanco de cepas do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/COSAS/INPA e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) criopreservadas no criobanco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, Universidade da Flórida, USA.

As formas promastigotas foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640 - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado - SFBi (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) e 50 µg/mL de gentamicina (Novafarma, Brazil), incubadas a 25 °C. Após amplificação dos parasitas as amostras foram centrifugadas na centrífuga 5702 (Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) a 4.400 rpm/15 minutos, foi realizado o descarte do sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo e direcionado para a utilização em ensaios biológicos.

4.3.2 Padrões de ensaios *in vitro*

Para o controle utilizou-se isetionato de pentamidina (Pentacarinat[®]) nas concentrações de diluição de 50 à 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) foi utilizado nas concentrações de 100 à 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.3.3 Ensaio biológico de citotoxicidade

O extrato metanólico da *L. ferrea* (100 à 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), fração DCM obtidos da *L. ferrea* (100 à 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e controles positivos (Glucantime[®] e Pentacarinat[®]) foram submetidas aos testes para a determinação da concentração letal para 50% da população celular (CE_{50}) de macrófagos não infectados. Os macrófagos murinos de linhagem RAW 264.7 (10^5 células/mL) foram cultivados e mantidos previamente em placa de 96 poços com meio RPMI 1640 com a suplementação de 10% de SFBi (Biosul), durante 24 horas. Após este período, as células foram expostas a diferentes concentrações das substâncias, sendo posteriormente incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após este período de incubação, os poços foram lavados com salina e em seguida foi adicionado o reagente MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Roche) na concentração de 10%. Os macrófagos foram incubados por mais 12 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras colorimétricas em espectrofotômetro (Bio-Tek), utilizando os comprimentos de onda de 570 nm.

4.3.4 Ensaio biológico com formas amastigotas

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram incubados em placa de 6 poços em uma concentração de 10^5 células/mL, em meio RPMI-1640 (Himedia) suplementado com 10% de SFBi, em estufa à 37°C por cerca de 48 horas. Após este período, os macrófagos (2×10^5 células/mL) foram infectados com 2×10^6 promastigotas/mL (1:10 célula/parasita) de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) por 24 horas. Em seguida, os macrófagos infectados com o parasita foram incubados na presença do extrato metanólico da *L. ferrea* (100 à 1,6

$\mu\text{g.mL}^{-1}$), fração DCM obtidos da *L. ferrea* (100 à $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e controles positivos (Glucantime[®] e Pentacarinat[®]). Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C o material biológico foi fixado e corado para a determinação da taxa de infecção, sendo esta realizada por meio da quantificação de macrófagos infectados em 30 campos por grupo.

4.3.4 Secreção de citocinas de macrófagos RAW264.7 durante a infecção

Os macrófagos foram plaqueados em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^5 células/mL, posteriormente as células foram infectadas na proporção de 1:20 com promastigotas estacionárias de *L. (L.) amazonensis* como descrito anteriormente. Após 24 horas, os poços infectados foram tratados com Glucantime[®] (50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou extrato metanólico de *L. ferrea* ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou fração diclorometano de *L. ferrea* ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou Retro-2 (20 nm) por 24 horas em DMEM completo suplementado com 100 ng.mL^{-1} ou 500 ng.mL^{-1} LPS e 100 ng.mL^{-1} IFN- γ . Os controles foram tratados com DMEM completo sozinho ou LPS/IFN- γ sem drogas ou com drogas sem estimulação LPS/IFN- γ . Após 24 horas os fluídos sobrenadantes de cada tratamento foram recuperados e seu teor de IL-6 determinado em ELISA específico para IL-6 e em seguida o material biológico foi fixado e corado para a determinação da taxa de infecção, sendo esta realizada por meio da quantificação de macrófagos infectados em 30 campos por grupo (CRAIG *et al.*, 2017).

4.4 ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS *IN VIVO* – ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

4.4.1 Preparação e caracterização da formulação – Microemulsão

A preparação e caracterização da microemulsão contendo o extrato diclorometano de *Libidibia ferrea* estão descritas no estudo de Jensen (2017) e Jensen (2020).

4.4.2 Procedência dos animais e infecção experimental

Foram utilizados 60 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, adultos, com peso médio de 120 g e com idade de 90 dias provenientes e mantidos no Biotério Central do INPA, mantidos em salas condicionadas com fotoperíodo, em condições de alimentação *ad libitum* e livre de patógenos. Os animais foram divididos em 10 grupos experimentais contendo 6 animais por grupo, destes 9 grupos foram infectados no focinho com o volume de 0,1 mL de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10^6 parasitas/mL).

4.4.3 Delineamento Experimental

Após o aparecimento das lesões os animais foram divididos em grupos contendo seis animais e receberam protocolos de tratamento diferenciados, que serão descritos nesta tese em maiores detalhes nos capítulos correspondentes. Durante o período de tratamento foi realizada a aferição do volume total da lesão (comprimento, largura e altura) em dias alternados utilizando paquímetro digital (Zaas® Precision) para análise da progressão da lesão e foi realizado também a fotodocumentação da evolução clínica das lesões.

4.4.4 Eutanásia

Ao final do tratamento foi realizada a eutanásia dos animais, conforme legislação para o uso de animais de experimentação e o procedimento foi realizado conforme descrito e aprovado no (CEUA-INPA) nº 023/2021. Após a eutanásia foi realizado a coleta de material biológico para diagnóstico parasitológico e avaliações teciduais.

4.4.5 Diagnóstico parasitológico

- **Método direto (impressão por aposição em lâmina - *imprint*)**

Pequenos fragmentos de lesão foram seccionados e com uma pinça estéril foram realizados movimentos de aposição dos fragmentos sobre lâminas previamente limpas; em seguida o material biológico foi fixado e corado na lâmina por meio de

Panótico Rápido. O diagnóstico foi realizado por meio de microscopia óptica (aumento 1000x), sendo considerado positivo quando houve identificação de formas amastigotas de *Leishmania* spp. Além disso, foi realizada a quantificação de formas amastigotas, macrófagos infectados e não infectados em 25 campos por lâmina, para determinar a taxa de infectividade (DOMINGOS, 2018; BRASIL, 2017).

– Método de cultivo

Pequenos fragmentos de lesão foram seccionados e com uma pinça estéril esses fragmentos foram colocados em tubos de NNN (Novy-MacNeal-Nicolle, 1908), sendo estes armazenados por um período de sete (7) dias, após esse período os tubos foram analisados em microscópio óptico (aumento 100x) para determinar a presença ou ausência de formas promastigotas. Os resultados do diagnóstico foram apresentados em positivo ou negativo para o reisolamento de promastigotas de *Leishmania* spp (DOMINGOS, 2018; BRASIL, 2017).

4.4.6 Diagnóstico bioquímico

A avaliação bioquímica foi realizada por meio da coleta de 2 mL de sangue de cada animal com posterior análise de função hepática (TGO e TGP), renal (ureia e creatinina) e marcadores cardíacos (CK e CK fração MB), no aparelho URIT 8031, método de ensaio de ponto final, cinético e possui como princípio colorimétrico fotoelétrica.

4.4.7 Análise Estatística

Os ensaios *in vivo* possuem delineamento experimental para verificação da influência de diferentes tratamentos e o teste estatístico foi baseado em modelo populacional para inferência de diferentes tratamentos. O programa utilizado foi o R Core Team (2020) versão 4.1.1 e Microsoft Office Professional Plus Excel 2019.

Os testes utilizados foram de *Kruskal-Wallis*, *Teste-T* e *Mann-Whitney* e o nível de significância adotado para os testes foi de 5%.

4.4.8 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê e Ética em Pesquisa Animal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CEUA-INPA) nº 023/2021.

Cadastrado no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob o número: AF46200.

5 CAPÍTULO 1

Current situation of Cutaneous Leishmaniasis and challenges of drug resistance: a narrative review

Thiago de Jesus Bacha^{1,2}, Claudia Dantas Comandolli-Wyrepkowski², Bruno Bezerra Jensen², Antonia Maria Ramos Franco².

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

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

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by a flagellated parasite of the genus *Leishmania*. It is a disease widely distributed in the world. It is primarily a zoonotic infection affecting men in a secondary way and transmission occurs through the bite of an infected sandflies. The disease has different clinical forms, but it can present as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and as Visceral Leishmaniasis (LV) or kala-azar, the latter being the most severe form of the disease. American Tegumentary Leishmaniasis has two main clinical forms, Cutaneous Leishmaniasis and Mucous Leishmaniasis and within this classification they still present a wide variety of clinical manifestations. There are more than twenty species that cause the disease and the clinical presentation is strongly associated with factors related to this parasite-host relationship and the type of immune response triggered. The treatment of leishmaniasis has undergone a great deal of variation over the years and since 1940 the standard treatment has been intramuscularly administered antimonials. However, its toxicity requires attention in the follow-up of the treatment and the cases of resistance to the drug have increased, ceasing to be used as a drug of choice in some regions of the world.

Keywords: Leishmaniasis, epidemiology, treatment, drug resistance.

INTRODUCTION

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a non-contagious vector-borne disease, caused by a mandatory flagellated and intracellular protozoan, which belongs to the family Trypanosomatidae, order Kinetoplastida, *Leishmania* genus. There are more than twenty species capable of causing disease in humans and more than 30 species of mosquitoes vectors of Leishmaniasis (DESJEUX, 2004; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). All species of *Leishmania* are transmitted by the bite of the infected female of dipterans of the subfamily Phlebotominae, belonging to the *Lutzomyia* genus in the New World, and *Phlebotomus* in the Old World (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Therefore, it is primarily a zoonotic infection, initially affecting other animals, and man may be secondarily involved (BRASIL, 2017). Most cases of cutaneous leishmaniasis in the Old World are localized and tend to spontaneously regress or progress to healing in a few weeks or months. In the New World, due to the different species of *Leishmania*, it presents a higher risk of developing the secondary mucous form (MOKNI, 2019).

The clinical presentation of Leishmaniasis can take two forms, Tegumentary Leishmaniasis (TL) and Visceral Leishmaniasis (VL). Leishmaniasis is present in 98

countries and three territories on five continents. It is estimated that in the world there are 200 to 400 thousand cases of VL and 0.7 to 1.2 million cases of Cutaneous Leishmaniasis (CL) annually. It is estimated that more than 90% of cases of VL occur in six countries: India, Bangladesh, Sudan, South Sudan, Brazil and Ethiopia. And about 70-75% of reported cases of CL come from ten countries: Afghanistan, Algeria, Colombia, Brazil, Iran, Syria, Ethiopia, North Sudan, Costa Rica and Peru (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2010). Among parasitic diseases, leishmaniasis represents the second leading cause of mortality worldwide, behind only malaria and is the third most common cause of morbidity in terms of years of life lost due to disability (in English, DALY's) behind malaria and schistosomiasis. With the increase in the occurrence of cases in countries considered non-endemic, an effect of greater global mobility, it is important to know the disease and realize the relevance that it has (DIAZ; PONTE-SUCRE, 2018; KARIMKHANI *et al.*, 2016).

Therefore, it is important to understand the different characteristics of the disease, the treatment options and their current situation in order to study new mechanisms to combat Leishmaniasis. The aim of this study was to provide a comprehensive review of the literature, followed by a critical analysis of current challenges. In this context, our main objective in this review was describes general characteristics associated with ATL, mainly in its cutaneous form, as well as its epidemiology, the methodologies currently used in the diagnosis and treatment of leishmaniasis and the current challenges to the problem, such as the development of drug resistance.

METHODOLOGY

This literature review addresses the main information about Leishmaniasis and the current challenges related to the disease, diagnosis and treatment. Bibliographic consultations were performed using Scopus, Science Direct, Google Scholar, CAPES and Pubmed Journals. The period of publications was from 1986 to 2020, and the keywords used were: "Leishmaniasis", "treatment", "treatment failure" and "drug resistance". In the analysis of the initial list, data not related to the purpose of this review were excluded.

The *Leishmania* sp. parasite

The species of the *Leishmania* genus are all morphologically similar, presenting two main stages of development in their life cycle: the amastigote and promastigote forms. The amastigote form is intracellular, not flagellated, immobile, which resides in the reticuloendothelial cells of the vertebrate host and is 2 to 6 µm in length. The promastigote form is flagellated and extracellular. It is presented in an elongated form, approximately 20 µm long and replicates freely in the digestive tract of the sandfly or in culture. They are digenetic organisms that have kinetoplast, glucosome, mitochondrial DNA. A unique feature of these parasites is the ability to change the number of copies of individual genes or groups of genes, chromosomes and even the entire genome. This genetic plasticity allows the parasite to amplify the number of copies of specific genes (DIAZ; PONTE-SUCRE, 2018; MOKNI, 2019).

Epidemiology

In the Americas, 18 countries are considered endemic for cutaneous and mucosal leishmaniasis. According to the Pan American Health Organization (PAHO) in 2017, 49.959 cases were reported by 17 endemic countries, with French Guiana reporting these data directly to France. Of these data, more than 70% of them were reported by four countries: Brazil, Costa Rica, Mexico and Ecuador. The most severe form, LV is considered endemic in 12 countries in the Americas. Nine countries reported more than four thousand cases of LV in 2017, with 97% of cases registered in Brazil (WHO, 2019).

The CL is divided according to its geographical distribution into CL from the Old World and the New World and different species of the disease in these two regions. Five species cause CL in the Old World, namely, *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. major* and *L. tropica* that occur in southern Europe, southwest Asia, Central Asia and Africa (GONTIJO; CARVALHO, 2003; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

In the New World, TL can be caused by different phylogenetically distinct species. And although a particular species or subgenus is commonly associated with certain clinical manifestations, they are not unique to a species. TL can be caused by

different species of the subgenus *Leishmania* (L) and *Viannia* (V), they are: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *guyanensis*, *L.* (V.) *panamensis*, *L.* (V.) *peruviana*, *L.* (V.) *lainsoni*, *L.* (V.) *lindenberg*, *L.* (V.) *shawii*, *L.* (L.) *Mexican*, *L.* (L.) *amazonensis* and atypically *L.* (L.) *infantum*, which despite being associated VL, there are cases of TL in Central America in endemic areas of VL (GRIMALDI; TESH, 1993; WHO, 2010; WHO, 2019).

Leishmaniasis have different transmission patterns with different vectors, reservoirs and agents, which makes it difficult to control the disease. In humans, after being bitten by the infected vector mosquito, ATL has an incubation period of two to three months, on average, and can vary from 10 days to two years (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Thereafter, the infection may progress asymptotically or progress to CL, progressing like an erythematous papule progressing slowly to nodules, plaques and ulcers with raised, hardened edges and coarse-grained tissue (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Clinical classification

There are different proposals for clinical classification for leishmaniasis. In the most widely adopted classification, ATL presents different clinical forms, including inapparent and lymphatic infection. Classically, it manifests itself in two clinical forms: as Cutaneous Leishmaniasis (CL), the most common, which can be disabling when presenting with multiple lesions and Mucous Leishmaniasis (LM) that in most cases occurs after skin lesions. These two forms still have a broad clinical spectrum, with different clinical manifestations. Thus, leishmaniasis can be classified according to the group to which they belong. In the group of cutaneous involvement or Cutaneous Leishmaniasis we have Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL), Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL), Disseminated Cutaneous Leishmaniasis, Cutaneous relapse CL (CRL). The mucosal involvement group or Mucous Leishmaniasis has the late mucous form, the mucous form without previous skin lesion, concomitant mucous form, contiguous mucous form and the primary mucous form. And finally, the group of lymph node involvement with Lymph Leishmaniasis (BRASIL, 2017; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MOKNI, 2019).

Cases of unapparent infection do not present a current or previous cutaneous lesion of TL. Detection is done by indirect methods through positivity in the Montenegro skin test, by detecting specific antibodies or by detecting the parasite's DNA using molecular methods. However, the use of serological methods to detect these cases is controversial, since no serological method has been validated for this purpose, mainly due to the risk of cross reactions.

Asymptomatic cases have no indication of specific treatment (BRASIL, 2017). Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) is the most common form of ATL, with a tendency to spontaneous cure and has a good response to treatment. It has a single lesion or some lesions that are usually ulcerative and close to the inoculation site. After the bite of the infected sandfly and the incubation period, which can vary from 10 days to three months, a small, low, pruritic inflammatory papule appears that progresses slowly to a nodule. The nodule has a rounded or oval shape and progresses to a central ulcer, with a raised, hardened border and satellite papules may appear around the central lesion. The localized form may have regional lymphadenopathy and nodular lymphangitis. In the northern region of Brazil, multiple injuries are mainly caused by *L. (V.) guyanensis*. In the state of Amazonas, five species are related to infection: *L. (L.) amazonensis*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) naiffi*, *L. (V.) lansonii* and the most prevalent species *L. (V.) guyanensis* (FIGUEIRA *et al.*, 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MOKNI, 2019; FRANCESCONI *et al.*, 2018).

There are many morphological variations described in the literature due to the remarkable polymorphism of the lesions, but this variation does not always have any relevance in the clinic. Among these there are impetigoid, lichenoid, tuberculous or lupoid, nodular, vegetative, erysipeloid, sporotrichoid, psoriasiform, mycetomatous, periungual, eczematous, ectimoid, zosteriform, annular, palmoplantar, cicatricial, squamous cell carcinoma like. This wide variation is generally related to the injury site, the species involved, the time of evolution and the type of inflammatory reaction triggered (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MOKNI, 2019).

The Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is a rare and severe clinical form, presenting multiple non-ulcerated lesions and formation of plaques and nodules that cover large skin extensions. And it is characterized as a long-term disease due to immunosuppression caused by the parasite. In Brazil, this clinical form is associated with the species *L. (L.) amazonensis*. Most cases of CDL arise from an infection

acquired in childhood, which due to the immaturity of the immune system, the parasite multiplies without control leading to an increase in the number of lesions and wide distribution in the skin extension (BRASIL, 2017).

In CDL, treatment is difficult or ineffective due to specific immunodeficiency and is characterized by frequent relapses. The Intradermorreption of Montenegro (IDRM) is negative and serology positive, this is due to the predominance of the secretory type response to the detriment of the cellular response, maintaining high levels of circulating antibodies (BRASIL, 2017; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Disseminated CL progresses with numerous lesions (more than ten lesions), usually small and ulcerative in two or more noncontiguous body segments, distant from the inoculation site. The species most commonly associated with this form is *L. braziliensis*, but also were reported cases of *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. amazonensis*. Skin relapse CL (CRL) leads to active nodular lesions around or within the scar of a previous lesion of CL. The therapeutic response is usually less than that of the primary lesion. Lymphatic Leishmaniasis is characterized by an increase in lymph nodes and other structures of the lymphatic system. The term ascending nodular lymphangitis refers to inflammation of the lymph cord and lymph nodes in the path from the injury site to the regional drainage lymph nodes. This form is also called sporotrichoid, similarly to sporotrichosis, but does not show a tendency to fistulization (BRASIL, 2017; BITTENCOURT, 1993; DESJEUX, 2004; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

The other form of TL, Mucous Leishmaniasis (ML), has a chronic evolution and greater destructive potential. If not treated properly, it can leave severe deformities and sequelae located in the mucous membranes of the upper airways, such as the mucous membranes of the oral, nasal, pharynx and larynx. There may also be a concomitant involvement with the cutaneous lesion, called cutaneomucosal leishmaniasis. Visceral Leishmaniasis (VL) is a systemic manifestation that usually leads to death when not treated (BRASIL, 2017; DESJEUX, 2004; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

Diagnostic methods

The diagnosis of ATL generally requires the association of epidemiological, clinical and laboratory elements due to the complexity of the clinical spectrum of

leishmaniasis and the diseases that make a differential diagnosis with TL (GONTIJO; CARVALHO, 2003; OPAS, 2019).

The diagnosis of certainty of TL is made in the detection of the parasite or its products in tissues or biological fluids of the host, through direct and indirect diagnostic methods. Direct methods are those that allow the detection of the parasite in the sample. Examples of direct methods are direct parasitological examination, culture, histopathological examination and Polymerase Chain Reaction (PCR). When it is not possible to visualize or isolate the parasite, the diagnosis is made with clinical data accompanied by an indirect diagnostic test. Indirect tests are those that allow the detection of specific antibodies against species of *Leishmania*, mainly those of the IgG type. Examples are indirect immunofluorescence (IIF), indirect enzyme immunoassay (ELISA) and IDRM (BRASIL, 2017; OaPS, 2019; ESPIR *et al.*, 2016).

In Brazil, the Ministry of Health recommends that the suggestive diagnosis should be accompanied by direct research of the parasite and/or IDRM. However, IDRM is in disuse due to low production, lack of trained professionals in health services to identify parasites in smears and lack of distribution of the antigen, the product essential for its execution. After these, if a conclusive diagnosis is not obtained, other diagnostic methods must be performed, such as serological, parasitological and molecular exams (BRASIL, 2017).

Laboratory diagnostic methods vary according to the limitations of each technique and vary with the experience of the health professional, quality of equipment, inputs, time of disease progression and the different types of etiological agents that cause leishmaniasis (BRASIL, 2017). Serological tests for the diagnosis of CL, for example, are of limited use because they have low sensitivity and varying specificity, but are very useful in the diagnosis of CL (OPAS, 2019).

The direct parasitological exam is the exam of first choice because it is a faster, cheaper and easier to perform technique. In this technique, it is possible to identify the amastigote forms, but it is not possible to identify the species (BRASIL, 2017).

Tissue samples can be subjected to histopathological analysis. TL presents a typical histopathological picture of diffuse ulcerated granulomatous dermatitis. In most cases, the granulomas observed are typified as “tuberculoids”, with associated lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate and, occasionally, necrosis. It is also characteristic of TL, malformed granulomas, characterized as poorly defined

aggregates of activated macrophages, also called “Montenegro glades”. In an extensive study conducted in Brazil, five histopathological patterns were identified: 1) Exudative cell reaction; 2) Exudative and necrotic reaction; 3) Exudative and necroticgranulomatous reaction; 4) Exudative and granulomatous reaction and 5) Exudative and tuberculoid reaction (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2008).

The TL is considered to be a chronic inflammatory disease, histiolinfoplasmocyte, with or without tissue necrosis and granulomatous reaction (MAGALHÃES *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2008). The diagnosis of certainty occurs in the visualization of amastigote forms of the parasite, characterized by being rounded or oval, with nucleus and kinetoplast. However, visualization of the parasite is not always obtained, making histopathological findings, in this case, only suggestive of Leishmaniasis. This technique also does not allow identification at the species level (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

The isolation in in vitro culture is a method of confirming the presence of the etiological agent of the disease, in addition to enabling subsequent identification at the species level. Here, the cutaneous or mucosal fragments obtained in the biopsy of the lesion's edge are inoculated in Novy and McNeal's blood agar culture medium modified by Nicolle (NNN) and Liver Infusion Triptose (LIT) between 24°C and 26°C. Promastigote forms can be found from the fifth day. However, you must wait a month before releasing a negative result (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

In vivo isolation, despite high sensitivity among other parasitological methods, is little used because it is more complex and expensive. The method consists of inoculation via Intradermal, the muzzle and/or hind legs of hamster (*Mesocricetus auratus*) of the material obtained by biopsy, already crushed in sterile saline. The animals are observed for a period of three to six months. The appearance of the first tissue lesions is usually noticed after the first month. Among the disadvantages of the technique are the long time until the result is released and the limitation of the insulation effectiveness, which is quite varied depending on the species of *Leishmania* (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Among the immunological tests, the Montenegro Intradermoreaction test (IDRM) is based on the delayed cell hypersensitivity response, which can be negative in the first four to six weeks after the appearance of the first skin lesion (BRASIL, 2017).

This test does not allow to differentiate a current disease from a previous one, as most of the time it remains positive after clinical cure. It also does not differentiate between disease and parasite exposure without disease (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

The technique consists of applying 0.1 mL of standardized antigen to the flexor surface of the forearm, with a concentration of 40 mg of protein nitrogen per ml. If after 48 or 72 hours a hardness of five mm or more is detected, the result is considered positive (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A positive IDRM, in endemic areas, can be interpreted as previous disease, previous application of IDRM antigen, infection, allergy to the test diluent or cross-reaction with other diseases. Thus, in these regions the positivity of the test varies from 20 to 30% (BRASIL, 2017).

Among the serological tests available for the diagnosis of TL, the most used are indirect immunofluorescence (IIF), immunoblotting (Western Blot) and the immunoenzymatic test (ELISA). Serological tests have varied sensitivity and specificity, depending on the technique adopted and the clinical form analyzed (GOMES *et al.*, 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Among these, the indirect immunofluorescence reaction is the most used. This technique, despite its good sensitivity, presents cross reactions with other diseases, especially with Chagas and Calazar's disease. The IIF result in TL varies with the parasite's reduced antigenicity or low levels of circulating antibodies. Despite generally presenting negative results in diffuse cutaneous form, its sensitivity was estimated at 71% in cutaneous forms and 100% in mucous form (GONTIJO; CARVALHO, 2003). As the levels of anti-Leishmania antibodies in TL do not remain high after treatment, a positive result usually indicates a current infection (PONTE-SUCRE, 2018).

Presenting a sensitivity of up to 100% in the diagnosis of LT, Western Blot is a sensitive technique, useful in identifying asymptomatic patients and is also much less invasive than the parasitological methods that require a skin biopsy. However, when compared to direct examination, for example, it is a more expensive technique and requires a larger laboratory structure to be performed (GOMES *et al.*, 2014; POMARES *et al.*, 2012; SZARGIKI *et al.*, 2009).

The serological tests are therefore of limited application in the diagnosis of leishmaniasis. In the literature, its use is indicated to complement the diagnosis made

through clinical findings and other exams (GOMES *et al.*, 2014; POMARES *et al.*, 2012; ROMERO *et al.*, 2005).

The polymerase chain reaction (PCR) is the most used technique for the detection of parasitic DNA in the sample and allows molecular typing without going through a previous culture step. It is more sensitive than traditional techniques, however attention is needed when choosing primers, as this can directly influence the sensitivity of the technique. Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) has also been useful in the diagnosis and monitoring of the therapeutic response as it performs quantitative analysis of the protozoa in ATL lesions (MOKNI, 2019; NEFFATI *et al.*, 2011).

Treatment

Currently, there is a regional variation in the treatment of ATL, based on the experience of the local scenario since different species respond differently to the available therapeutic options. In the Old World, most patients with CL can be treated topically. In the New World, these patients are treated systemically, since endemic species present in the region usually cause metastasis and can evolve to more severe forms, such as ML (SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

Pentavalent antimonials

In use since the 1920, antimonials have long been used as a drug of first choice and remain the main drugs used to treat different forms of leishmaniasis. Antimonials were first used by the Brazilian doctor Gaspar Viana, in 1912, describing the curative action of trivalent antimony (Sb^{III}) or emetic tartar, obtaining satisfactory results (VIANNA, 1912). From 1940 on, pentavalent antimonials (Sb^V), as well as aromatic diamidines (pentamidine) started to be used in the treatment of leishmaniasis. Pentavalent antimonials, such as Pentostam® and Glucantime®, are available in two forms, such as sodium stibogluconate (SSG) and meglumine antimoniate (MA), respectively (PONTE-SUCRE; PADRON-NIEVES, 2018; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

Currently, the WHO recommends, in the Americas, the administration of pentavalent antimonials, intramuscularly or intravenously, at a dose of 10 to 20 mg/kg/day, in a single dose for 20 or 30 days (OPAS, 2019; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). Intravenous SbV treatment for leishmaniasis is long-lasting, causes pain at the injection site, and can produce more serious adverse effects, from cardiac arrhythmias, abdominal pain, skin rashes, changes in liver and kidney function, pancreatitis, etc. Adverse reactions contribute for many to abandon treatment, totally or partially. This favors the development of drug resistance and the selection of more resistant parasites (PONTE-SUCRE; PADRONNIEVES, 2018).

Studies have shown a failure to respond to treatment of up to 30% in endemic areas and this resistance has paved the way for the use of new drugs, mainly in the Indian Subcontinent (ISC). Still, SbVs are still in use as a drug of choice in Latin America and East Africa (AREVALO *et al.*, 2007; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019). Amphotericin B an antimicrobial in the polyene class, Amphotericin B (AmB) targets the membrane of promastigotes and amastigotes and is administered mainly intravenously and is approved for use during pregnancy. Used in the last 70 years as intravenous deoxycholate (d-AmB) in the systemic treatment of fungal infections and since 1960 in the treatment of different forms of leishmaniasis, it is a very toxic medicine. Its nephrotoxicity is the main adverse effect associated with the use of d-AmB. Other known effects are acute infusion reactions, anemia, neutropenia, liver disorders and thrombocytopenia. Thus, dAmB has been progressively replaced by less toxic liposomal formulations (L-AmB) (FALCI; PASQUALOTTO, 2015; MOSIMANN *et al.*, 2018).

In order to improve bioavailability orally or topically and seek a cheaper, more efficient and safer drug, new bioavailability systems for amphotericin B have been created. The forms tested in recent years include liposomes, solid lipid nanoparticles, nanoparticles based on polymers and proteins, nanocapsules, nanococleates, complexes with the inclusion of cyclodextrins, dendrimers, emulsions, drug conjugates and microneedles. However, due to the complexity of these new formulations and the required safety and efficacy prerequisites, we do not yet have a nanoformulation available for clinical use (LANZA *et al.*, 2019).

As for the effectiveness of using L-AmB in the treatment of VL, 95 to 100% efficacy, caused by *L. donovani* and *L. infantum*, has been reported in the Indian

Subcontinent (ISC) and southern Europe, respectively (SUNDAR *et al.*, 2008). The effectiveness of L-AmB contributed to this medication becoming the main therapy against leishmaniasis in regions that are not responsive to antimonials. However, there is a geographical variation in the effectiveness of this drug, with low efficacy against VL in East Africa being reported. It is also unclear whether this variation is related to factors linked to the host or the parasite, or to a combination of both (LANZA *et al.*, 2019; PURKAIT *et al.*, 2012).

Few studies report the effectiveness of L-AmB in the treatment of CL and ML in the Old and New World, with some documented case reports. Today the clinical importance of amphotericin B is also threatened by the emergence of new cases of acquired resistance to the drug. Studies seek to understand the mechanisms that have led to resistance. Changes in membrane composition, in ABC transporters with MDR-1 overexpression and changes in thiol metabolic pathways, are some identified mechanisms that have been shown to influence the acquisition of amphotericin B resistance in clinical isolates of *L. donovani* (LANZA *et al.*, 2019; PURKAIT *et al.*, 2012). And despite the improved risk of toxicity, L-AmB still has a high cost, which in turn ends up restricting its use, especially in emerging countries and environments with limited resources, such as Brazilian public hospitals (FALCI; PASQUALOTTO, 2015).

Pentamidine

Another drug used is marketed in its lyophilized form of pentamidine isothionate. Pentamidine is an aromatic diamidine which comes in the form of two salts, pentamidine isothionate and mesylate. Isothionate is more widely used, as mesylate has greater pancreatic toxicity. This drug accumulates in the parasite's mitochondria and inhibits mitochondrial topoisomerase II, binding to sites rich in adenine-thymine (AT) sequences in the minor groove of mitochondrial DNA (in the kinetoplast), inhibiting the transcription process (BRASIL, 2017; NEVES *et al.*, 2011; SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

In Brazil, the cure rate was higher than 90%. It is especially reserved for the use of *L. guyanensis* and *L. panamensis*. Among the possible adverse effects, rhabdomyolysis is frequently observed, but usually without renal complications. And

the occurrence of transient diabetes can also be observed (CORREIA *et al.*, 1996; MOKNI, 2019).

Pentoxifylline

The Pentoxifylline is another drug with a potential leishmanicide that belongs to the class of peripheral vasodilators. It acts as a TNF- α modulated agent and is recommended by WHO and PAHO as an adjunct in the treatment of ATL. In Brazil it is recommended as an adjunct in association with meglumine antimoniate, reducing its toxicity and without indication as a single therapy. It has shown good results, decreasing the treatment time until the cure outcome in LMA. Although useful in the treatment of ML, it has shown no additional benefit in the treatment of CL in combination therapy with SbV, not being indicated in the treatment of CL. A tablet with 400 mg of Pentoxifylline is administered orally two or three times a day for 30 days. Its use is contraindicated in pregnancy and children (BRASIL, 2017; BRITO *et al.*, 2017).

Paromomycin

Paramomycin, a drug that belongs to the aminoglycoside family, is an aminoglycoside antibiotic extracted from cultures of *Streptomyces rimosus* var. *paramomicinus*, identical to the aminosidine produced by *Streptomyces chrestomyceticus* (SUNDAR *et al.*, 2007). It has proven leishmanicidal activity and is currently an alternative drug to the treatment of leishmaniasis and has been used in parenteral and topical administration. In ISC, it is used intramuscularly at a dose of 12, 16 or 20 mg of sulfate/ kg/21 days, showing good efficacy in the treatment of VL. However, the long period of intramuscular administration is a major challenge for correct adherence to treatment. In some countries they are used in association with pentavalent antimonials. As for its effectiveness, it presents controversial results depending on the clinical form of leishmaniasis and the route of administration of the paramomycin (SUNDAR *et al.*, 2007; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

In Brazil, its systemic use was more than 90% effective in treating primary skin lesions caused by *L. (V.) braziliensis*. And in India it presented results not inferior to the treatment of VL when compared to the treatment with amphotericin B. However, it

presented low efficacy in the cases of mucocutaneous leishmaniasis. The Paramomycin resistance is not known, as it has not yet been used extensively. However, on in vitro trials with two *L. aethiopica* isolates from relapsed CL patients, they were 3 to 5 times less sensitive to the drug after treatment. Few studies suggest that this resistance is related to decreased drug uptake, due to decreased synthesis of cytoplasmic proteins responsible for the initial binding to the cell surface and consequent reduction of drug accumulation (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; CORREIA *et al.*, 1996; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017).

Miltefosine

Miltefosine belongs to the class of alkylphosphocholines, which are phosphocholine esters of long chain aliphatic alcohols, and was initially developed for the treatment of cancer. In addition to acting against cancer cells, miltefosine has proven activity against many species of parasites, some pathogenic bacteria and fungi (DORLO *et al.*, 2012). The exact mechanism of molecular action of miltefosine against *Leishmania* is not yet fully understood, but it involves changes in phospholipid biosynthesis, changes in phospholipase activity, inhibition of cytochrome c oxidase activity, mitochondrial depolarization, intracellular ATP levels and cell death by apoptosis (DORLO *et al.*, 2012; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). It was registered in India in 2002 as the first oral medication available against leishmaniasis, with cure rates above 94% in the treatment of VL. Thereafter, it replaced the use of pentavalent antimonial (SSG) as the treatment of choice at ISC. However, only ten years after its adoption at the ISC, its effectiveness was reduced, presenting after 12 months of follow-up, relapse rates of 10% and 20% in India and Nepal, respectively (RIJAL *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2008; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019).

Because it has a long elimination half-life, which allows subtherapeutic levels to remain for a few weeks after standard treatment, it was predicted that mechanisms of resistance to miltefosine would soon appear in regions where it was widely used (PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; SUNDAR; OLLIARO, 2007).

With increasing reports of non-responsive or reduced efficacy of miltefosine in India and Nepal, a recent study confirmed in laboratory two clinical isolates resistant to miltefosine. In these findings, it was observed that the resistance mechanism was

associated with a lower internalization of miltefosine caused by mutations in the gene that encodes the protein responsible for the entry of miltefosine in the cell, LdMT, a member of the P4-ATPase subfamily. When this protein is overexpressed, internalization in the drug increases up to 20 times and also increases susceptibility in promastigotes (GAMARRO; SANCHEZ-CANETE; CASTANYS, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2017).

Prevention and control

Despite efforts to develop and analyze an effective vaccine, no vaccine candidate has emerged from clinical trials. Improvements in general sanitary and hygiene conditions help to reduce the vector population. In some regions preventive measures to eliminate the mosquito vector of malaria with the application of chemical insecticides helped to eliminate leishmaniasis in these places, returning with the interruption of this activity. Individual protection measures such as the use of repellents, clothes and mosquito nets with permethrin impregnation to reduce the contact of the transmitting mosquito and the human population at home also have some effectiveness, reducing the risk of disease transmission. Until today, disease prevention and control measures are associated with vector control measures and human reservoirs, the latter in relation to timely diagnosis and adequate treatment, in addition to strategies appropriate to each transmission pattern (BRASIL, 2017; MOKNI, 2019; OLIVEIRA; DUTHIE; PEREIRA, 2019).

CONCLUSION

Despite its relevance, leishmaniasis has been one of the most important neglected tropical diseases for decades. And even with the efforts of the scientific community aimed at the development of new drugs and vaccines, bringing good advances in this direction, there is no prospect of reaching the ideals of treatment in the near future. The first and second choice medications are for systemic treatments and are associated with toxicities that can limit the completion of a complete course of the therapeutic regimen. In addition, they are for parenteral administration, which makes patient compliance difficult. The standard treatment remains old, based on the

administration of pentavalent antimonials. Attention is also given to cases of resistance to drugs used in the treatment of leishmaniasis.

With increasingly frequent reports of resistance, it became urgently necessary to develop new drugs with less toxicity, non-parenterals and easy adherence to treatment. The combination of approaches that seek a better understanding of the action potential of emerging drugs, from preclinical trials to more advanced phases and those that aim to better understand the parasite-host relationship can accelerate the process of developing new leishmanicidal drugs.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- AREVALO, J. *et al.* Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 12, p.1846–51, 2007. Doi: <https://doi.org/10.1086/518041>.
- BITTENCOURT, A. L. *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis in american cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 32, n. 11, p. 802–5, 1993. Doi: 10.1111/j.1365-4362.1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília; 2017.
- BRITO, M.G.O. *et al.* Oral Pentoxifylline Associated with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p.1155–9, 2017. doi: 10.4269/ajtmh.16-0435.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p.1251–65, 2019. doi: 10.1080/14656566.2019.1609940.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Disease**, v. 2, n. 2:167, 2010. doi: 10.4103/0974-777x.62887.

CORREIA, D. *et al.* Estudo comparativo entre antimoniato de meglumina, isotianato de pentamidina e sulfato de aminosidine, no tratamento de lesões cutâneas primárias causadas por *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, n. 5, p. 447–53, 1996. doi: 10.1590/S0037-86821996000500007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 27, n. 5, p.305–18, 2004. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.

DÍAZ, E.; PONTE-SUCRE, A. **Leishmaniasis: The biology of a parasite. Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments**. Springer International Publishing. ISBN: 978-3-7091-1125-3. 2018.

DORLO, T. P. C., *et al.* Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p.2576–97, 2012. doi: 10.1093/jac/dks275.

ESPIR, T. T. *et al.* Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 167, p.1–6, 2016. doi: 10.1016/j.exppara.2016.04.010.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p.65–82, 2015. doi: 10.4322/2357-9730.56021.

FIGUEIRA, L. P. *et al.* Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 2, p.173–81, 2014. doi: 10.5216/rpt.v43i2.31137.

FRANCESCONI, V. A., *et al.* Failure of fluconazole in treating cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania guyanensis* in the Brazilian Amazon: An open, nonrandomized phase 2 trial. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 12, n. 2, p.1–11, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006225.

GAMARRO, F.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M.P.; CASTANYS, S. Mechanisms of miltefosine resistance in *Leishmania*. **Vienna: Springer Vienna**, p. 351–79, 2013. doi: 10.1007 / 978-3-7091-1125-3_17.

GOMES, C. M., *et al.* Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–9, 2014. doi: 10.1590/abd1806-4841.20142389.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.71–80, 2003. doi: 10.1590/S0037- 86822003000100011.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p.230–50, 1993. doi: 10.1128/CMR.6.3.230.

KARIMKHANI, C., *et al.* Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the global burden of disease study 2013. **Lancet Infectious Disease**, v. 16, n. 5, p.584–91, 2016. doi: 10.1016/S1473- 3099(16)00003-7.

LANZA, J.S., *et al.* Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 10, p.1063–79, 2019. doi: 10.1080/17425247.2019.1659243.

MAGALHÃES, A.V. *et al.* Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 253–62, 1986. doi: 10.1590/S0036-46651986000400008.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, (suppl 2), p.S359–75, 1994. doi: 10.1590/S0102-311X1994000800014.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v.146, n. 3, p. 232–46, 2019. doi: 10.1016/j.annder.2019.02.002.

MOSIMANN, V. *et al.* Liposomal amphotericin b treatment of old world cutaneous and mucosal leishmaniasis: a literature review. **Acta Tropica**, v. 182, p. 246–50, 2018. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.03.016.

NEFFATI, A., *et al.* Choix des amorces: élément déterminant dans le diagnostic moléculaire de la leishmaniose cutanée. **Pathologie Biologie**, v. 59, n. 6, 2011. doi: 10.1016/j.patbio.2009.06.011.

NEVES, *et al.* Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 6, p.1092–101, 2011. doi: 10.1590/S0365-05962011000600005.

OLIVEIRA, B. C.; DUTHIE, M. S.; PEREIRA, V. R. A. Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for american tegumentary leishmaniasis. **Human**

Vaccines & Immunotherapeutics, v. 1, p.1–12, 2019. doi: 10.1080/21645515.2019.1678998.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C. 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50524>. Acesso em: 10 jan. 2020.

POMARES, C. *et al.* Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 7, p. 452–4, 2012. doi: 10.1016/j.trstmh.2012.03.001.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 11, n. 12, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.

PONTE-SUCRE, A.; PADRÓN-NIEVES, M. **Drug resistance in *Leishmania* parasites: Consequences, molecular mechanisms and possible treatments**. Springer International Publishing, 2018. ISBN: 978-3-319-74186-4.

PURKAIT, B. *et al.* Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p.1031–41, 2012. doi: 10.1128/AAC.00030-11.

RIJAL, S. *et al.* Increasing failure of miltefosine in the treatment of kalaazar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Disease**, v. 56, n. 11, p.1530–8, 2013. doi: 10.1093/cid/cit102.

ROMERO, G. A. S. *et al.* Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, n. 1, p. 49–56, 2005. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.09.005.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com nfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p.9– 20, 2008.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. **Frontier in Immunology**, v. 5, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00296.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEONM L.; GENESTRA, M. Recent advances on leishmaniasis chemotherapy: intracelular molecules as a drug target. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p.139–49, 2004. doi: 10.1590/S1516-93322004000200003.

SRIVASTAVA, S. *et al.* confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasite Vectors**, v. 10, n. 1:49, 2017. Doi: 10.1186/s13071-017-1969-z.

SUNDAR, S. *et al.* Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571–81, 2007. doi: 10.1056/NEJMoa066536.

SUNDAR, S. *et al.* New treatment approach in indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short- course oral miltefosine. **Clinical of Infectious Disease**, v. 47, n. 8, p.1000–6, 2008. doi: 10.1086/591972.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p.1–10, 2019. doi: 10.1080/21678707.2019.1552853.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p.733–40, 2007.

SZARGIKI, R., *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p.47–52, 2009. doi: 10.1590/S1413-86702009000100011.

VIANNA, G. **Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético**. Anais do 7 o Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia. 466–8, 1912.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**. 2010. Disponível e: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=BE76A405735C8FF05EF6F0B47C51F1D3?sequence=1. Acesso em: 15 jan. 2021.

WHO/PAHO. World Health Organization. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**. 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>. Acesso em: 12 jan. 2021.

6 CAPÍTULO 2

Evaluation of the *in vivo* and *in vitro* effect of *Libidibia ferrea* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Thiago de Jesus Bacha^{1,2}, Bruno Bezerra Jensen², Amanda Silva de Jesus², Pamela Emily Torres Iwabuchi², Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi³, Francimeire Gomes Pinheiro², Peter Kima³, Antonia Maria Ramos Franco².

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

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

³Departamento de Microbiologia e Biologia Celular, Universidade da Flórida.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is caused by the protozoa of the genus *Leishmania*; however, the therapeutic arsenal available for the treatment of this disease is limited. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial efficacy of the methanolic extract and the dichloromethane fraction of *Libidibia ferrea*. To accomplish this goal, the cytotoxicity of these extracts in *in vitro* assays was initially determined. Thereafter, their effects on a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection of RAW264.7 macrophages were assessed. *In vivo* studies were performed with golden hamsters infected with *L. (L.) amazonensis*, which were treated with a microemulsion containing the dichloromethane fraction of *L. ferrea* (DCM). In addition, this fraction was also evaluated in combination with Glucantime®. The extracts reduced macrophage infections and induced the reversal of IL-6 suppression in infected cells incubated with lipopolysaccharide (LPS). A significant reduction was observed in the lesion volume of the animals intralesionally treated with the combination of DCM+20 mg/Sb^V/kg/day. Taken together, the results obtained show that the *L. ferrea* (DCM) extracts were not cytotoxic to macrophages, and that they limited infection of the macrophages. Although the treatment of the infection did not result in clinical and parasitological cure, the microemulsion containing the dichloromethane fraction of *L. ferrea* augmented the curative effects of Glucantime®.

Keywords: Natural products. Microemulsion. Leishmaniasis treatment.

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a disease of worldwide distribution, and affects at least 92 countries (WHO, 2021). A recent report stated that most cases occur in Afghanistan, Algeria, Colombia, Iran, Syria and Brazil (DNDi, 2018). This disease is caused by the protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted to mammalian hosts through the bites of sandflies (Blanco, 2017). The therapeutic arsenal and treatment regimen for CL in Brazil follows the recommendations of the Brazilian Ministry of Health, and consists of the use of meglumine antimoniate (Glucantime®), pentamidine isethionate (Pentacarinat®) or amphotericin B (Ambiosome®) (Brasil,

2017). However, the efficacy of these drugs is compromised by the occurrence of parasitic resistance, the lengthy treatment period, and drug toxicity in patients (Bastos *et al.*, 2016).

According to Brazil (2017), CL is characterized by a single or multiple skin ulcer, which may have metastasis through the hematogenous spread as its main complication, and causes destruction of mucous tissue, especially in the nasopharynx, which is known as mucosal leishmaniasis. Some studies have shown that the increase in the cytokine IL-6 may be associated with the risk of development of the mucosal form, and it is therefore essential to investigate the modulation of this cytokine in the different treatments used for cutaneous leishmaniasis.

To address the need for new therapeutic compounds, several studies have concentrated efforts on the search for active ingredients from natural products (Garzon *et al.*, 2021). Among these natural products, plant-derived products have attracted attention because they include unique secondary metabolites that have a diversity of chemical structures (Jensen *et al.*, 2017).

In this context, the plant species *Libidibia ferrea* has attracted the interest of the scientific community due to reports of its antidiarrheal, anticatarrhal, anti-inflammatory (Falcão *et al.*, 2019), and antileishmanial (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017) properties, among others. Previous studies have demonstrated the potential of using *L. ferrea* in the treatment of CL via topical formulations (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017).

In the study conducted by Jensen (2020), the characterization of dichloromethane was carried out, and methyl gallate and a phenylpropanoic acid derivative were isolated. According to the study, the substances indicated promising antileishmanial activity and no cytotoxic profile. These promising observations indicate that additional studies need to be carried out to identify and evaluate the antileishmanial bioactive substances found in *L. ferrea* and optimize skin permeation of these compounds (Jensen, 2020).

Studies on the use of microemulsion systems have shown promise, and some of the advantages of these systems include the possibility of optimizing the permeation and the controlled release of bioactive molecules (Ghorbanzadeh *et al.*, 2019). In addition, Jensen (2020) suggests that further studies should be developed that combine the standard treatment for CL (Glucantime®) with microemulsion-based

formulations containing *L. ferrea* in order to investigate a possible augmentation of the effectiveness of Glucantime®.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* antileishmanial efficacy of the methanolic extract and the dichloromethane fraction of *L. ferrea* in infections of macrophages. A microemulsion was developed containing the dichloromethane fraction of *L. ferrea*, which was evaluated in *in vivo* studies for its effectiveness alone and in association with Glucantime® in the experimental treatment of cutaneous leishmaniasis.

MATERIAL AND METHODS

Origin and maintenance of parasites

The strains used in this study were *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584), cryopreserved in the bank of strains at the Laboratory of Leishmaniasis and Chagas Disease/COSAS/INPA and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), cryopreserved in the Laboratory of Microbiology and Cell Science, University of Florida, USA. For the biological assays, the parasites were grown in Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) and culture was expanded in complete RPMI medium 1640 (Himedia), which was supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (iFCS) and gentamycin (40 µg.mL⁻¹).

Plant material and fractionation

The collection of *Libidibia ferrea* was carried out on a private property in the Parque Dez de Novembro neighborhood, Manaus, Amazonas, (3° 4' 34" S 60° 0' 11" W), during the fruiting period (June and July). The specimens were sent to the Botany Department of the Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), identified as *Libidibia ferrea* (Mart. ExTul.) LP Queiroz – Fabaceae: Caesalpinoideae, and deposited in the INPA herbarium under voucher specimen number 2461509.

The fruits were sorted, the seeds were removed and the other parts of the fruit were dried in a forced circulation oven at a temperature below 45 °C. After drying, the material was pulverized, macerated and extracted with the solvents hexane and

methanol (VETEC®), with three extractions being carried out with each of the solvents (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017). The dichloromethane fraction (DCM) of the *L. ferrea* extract was obtained by liquid-liquid partition, using 20 g of the methanolic extract solubilized in 200 mL of H₂O:MeOH, then the fraction was concentrated using a rotary evaporator (Yamamoto®) (Jensen, 2020).

Preparation of topical formulations

Two microemulsions were prepared. The first was a microemulsion containing the DCM fraction of *L. ferrea* (DCM) at 2% and the second was a placebo microemulsion without the fraction. Both microemulsions were developed using isopropyl alcohol, Tween® 20, distilled water, oleic acid, with or without the DCM fraction of *L. ferrea*, and kept under agitation for 2 minutes until a homogeneous solution was obtained (Jensen, 2020). The patent for the formulation is registered at the National Institute of Industrial Property (INPI) Brazil, under process number BR 10 2019000809 1.

***In vitro* biological cytotoxicity assay**

Murine RAW 264.7 macrophages, cryopreserved in the Laboratory of Microbiology and Cell Science, University of Florida, USA, were cultured (10⁵ cells/mL) in 96-well plates in RPMI 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA), which was supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum - FBS (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) and 50 µg mL⁻¹ gentamicin (Novafarma, Brazil) for 10 hours. After this period, the cells were exposed to different drug preparations: methanolic extract of *L. ferrea* (EXT); dichloromethane fraction of *L. ferrea* (FRA); Glucantime® (GL) and Pentacarinat® (PTM). All compounds were tested at 0, 50 and 1.6 µg.mL⁻¹, and were incubated at 37 °C for 24 hours. After this incubation period, the MTT reagent (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Roche®) was added at a concentration of 10%. The macrophages were incubated for an additional 12 hours, after which the formazan product was solubilized and read in a spectrophotometer (Epoch, Bio-Tek®, USA) at 570 nm (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017).

***In vitro* biological assay with amastigote forms**

RAW 264.7 macrophages were incubated in 6-well plates at a cell density of 10^5 cells/mL, in RPMI-1640 medium (Himedia) supplemented with 10% HI FBSi, at 37 °C for 48 hours. After this period, the macrophages were infected with 2×10^6 promastigotes/mL (1:10 cell/parasite) of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) for 24 hours at 37 °C. The methanolic extract of *L. ferrea* (EXT); dichloromethane fraction of *L. ferrea* (DCM); Glucantime® (GL) and Pentacarinat® (PTM) – at 100, 50 and $1.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ were subsequently added to the infected cells. After 24 hours of incubation at 37 °C, the cells were fixed. Nucleated cells were labeled with DAPI (Thermo Fisher Scientific) to determine the infection rate. Quantification of the infection was determined by enumerating infected macrophages in at least 30 infected fields per group (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017).

Production of IL-6 cytokines

Macrophages were plated in 6-well plates at 5×10^5 cells/mL per well and, subsequently, cells were infected with stationary *L. (L.) amazonensis* promastigotes (5×10^7 promastigotes/mL) as described above. After 24 hours, the infected cells were treated with Glucantime® (GL) (50 and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) or the methanolic extract of *L. ferrea* (EXT) ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) or the dichloromethane fraction of *L. ferrea* (DCM) ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) or Retro-2 (20 nm) or a combination of GL ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + DCM ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) for 24 hours in complete DMEM supplemented with LPS (100 ng.mL^{-1} or 500 ng.mL^{-1}) and IFN- γ (100 ng.mL^{-1}). Controls were treated with complete DMEM alone or LPS/IFN- γ without drugs or with drugs without LPS/IFN- γ stimulation. After 24 hours, the supernatants of each treatment were recovered and their IL-6 content determined in an ELISA specific for IL-6. The cells in each well were processed for enumeration of the infection as described above (Croft; Coombs, 2003).

***In vivo* experiments**

A total of 60 adult male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), with an average weight of 120 g and aged 60 days were used. These were obtained from the

vivarium at INPA and kept in conditioned rooms with a photoperiod of 12/12 hours, free of pathogens and fed *ad libitum*. The animals were divided into ten experimental groups (six animals per group), of which nine groups were infected in the snout with a volume of 0.1 mL of promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHO/BR/2009/IM5584) (10^6 parasites/mL).

After the appearance of the lesions, the groups were treated according to the following experimental design: I) DCM Group: infected and treated topically with the microemulsion of the DCM fraction (DCM) of *L. ferrea* (50 mg/kg/day); II) placebo microemulsion (MPL) group: infected and treated topically (50 mg/kg/day); III) GLIM20 Group: infected and treated intramuscularly with 20 mg/Sb^V/kg/day; IV) GLIL20 group: infected and treated intralesionally with 20 mg/Sb^V/kg/day; V) DCM+GLIM10 group: infected and treated IM with 10 mg/Sb^V/kg/day and topically with DCM (50 mg/kg/day); VI) DCM+GLIM20 Group: infected and treated IM with 20 mg/Sb^V/kg/day and topically with DCM (mg/kg/day); VII) DCM+GLIL10 Group: infected and treated IL with 10 mg/Sb^V/kg/day and topically with DCM (mg/kg/day); VIII) DCM+GLIL20 Group: infected and treated IL with 20 mg/Sb^V/kg/day and topically with DCM (mg/kg/day); IX) IST group: infected and untreated and X) NIST group: uninfected and untreated.

The animals treated topically with DCM or intramuscular Glucantime[®] were treated daily for a period of 30 days. The animals that were treated with intralesional Glucantime[®] received a total of 3 doses, which was applied on the 1st, 15th and 30th days. After treatment, three animals from each experimental group were euthanized for the collection of biological material, and the other three animals from each group remained under observation until the 135th day. During the treatment period, the measurement of the total volume of the lesion (length, width and height) was performed on alternate days using a digital caliper (Zaas[®] Precision) to analyze the progression of the lesion. Photo-documentation of the clinical evolution of the lesions was also performed.

At the end of the treatment, the animals were euthanized with Vetnil[®] (ketamine hydrochloride 10%) and Syntec[®] (xylazine 2%), as recommended by the INPA Animal Research Ethics Committee, and biological material was collected for parasitological and biochemical evaluation. For the parasitological evaluation, a tissue sample sectioned from the lesion area of each animal was used for printing on glass slides and, later, the biological material contained in the slides was fixed with methanol and

stained with Giemsa (Sigma). The analysis was performed by quantification of the amastigotes and macrophages present in 25 fields of each slide. The biochemical evaluation was performed by collecting 2 mL of blood from each animal for subsequent analysis of kidney function via the evaluation of urea (Ureia UV Liquid Stable, LaborLab, REF1770300) and creatinine (LaborLab, REF1770100) values and a cardiac marker test (CK Total, InterKit, batch 12213040) using an automatic biochemical and turbidimetric analyzer (MH Lab, URIT 8031).

Statistical analysis

The *in vivo* assays used an experimental design to verify the effects of the different treatments, and the statistical test was based on a population model to infer differences between treatments. The program used was the R Core Team (2016) version 4.1.1 and Excel 2019 (Microsoft Office Professional Plus). The tests used were the Kruskal-Wallis, the t-test and Mann–Whitney, and the significance level adopted for the tests was 5%.

Ethical aspects

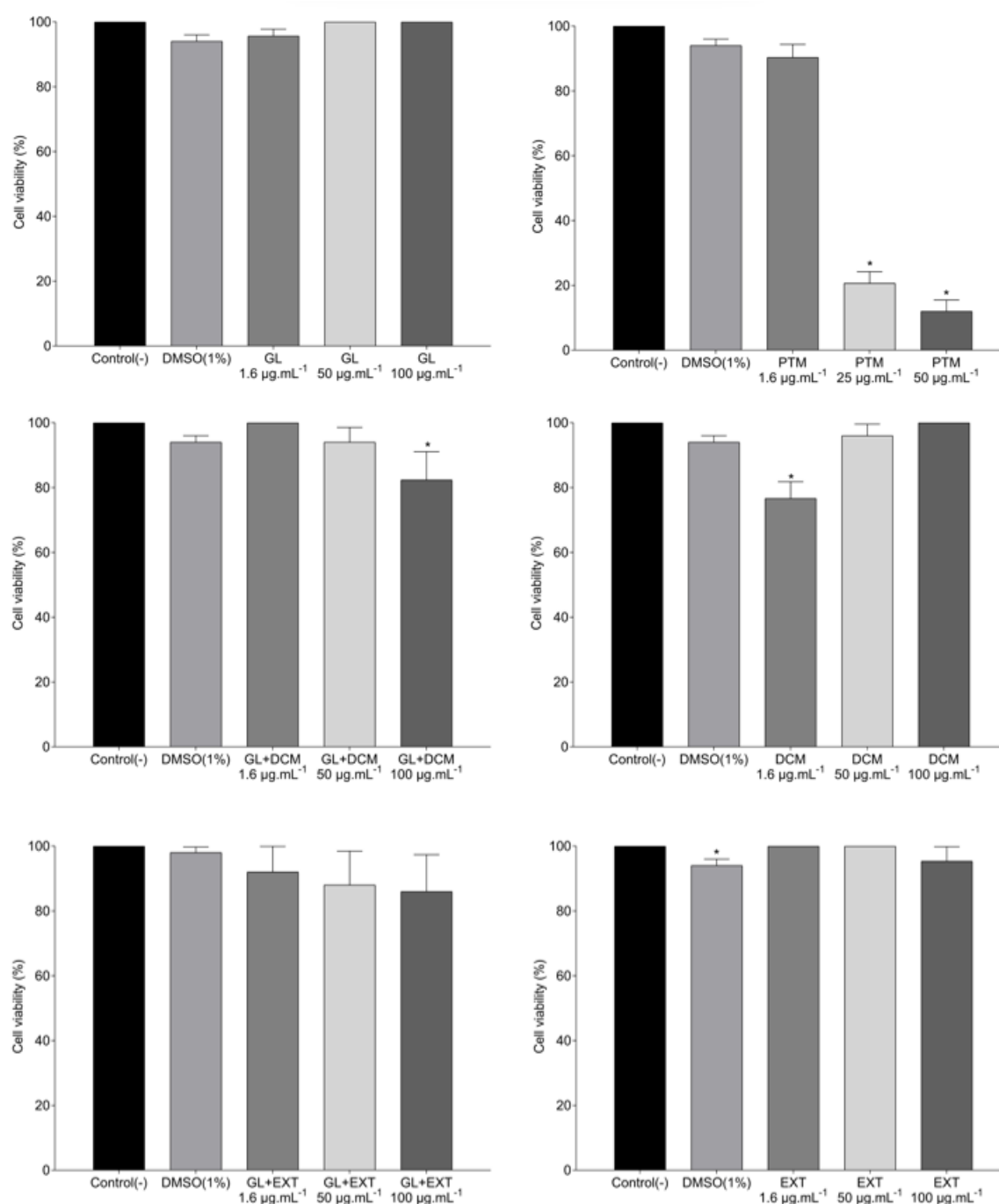
This study was submitted to and approved by the Animal Research Ethics Committee of the National Institute for Amazonian Research (CEUA-INPA) under process No. 023/2021.

RESULTS

In order to begin the *in vitro* studies with the methanolic extract and the dichloromethane fraction of *L. ferrea*, their cytotoxicity to macrophages was evaluated. Cell viability was assessed in MTT assays after incubation of cells with a range of concentrations of the methanolic extract (EXT) and the dichloromethane fraction (DCM) of *L. ferrea*. The cytotoxicity of these compounds was compared to the toxicity of a range of concentrations of Glucantime® (GL) and pentamidine (PTM), which are well known drugs that are currently used to treat leishmaniasis. The results show that, at up to 100 µg/ml of Glucantime®, cell viability was equivalent to cell viability in the

medium alone and in the medium supplemented with the diluent (DMSO) (Figure 1). Neither the EXT nor the DCM of *L. ferrea* at concentrations of up to 100 ug/ml were toxic to cells. No significant effect on cell viability was observed when Glucantime® was combined with EXT or when Glucantime® was combined with DCM. In contrast, only 20% of cells were viable after incubation in 25 ug/ml pentamidine.

Figure 1. Cytotoxicity in RAW cells at 24 hours. Glucantime® (GL); Pentamidine (PTM); *Libidibia ferrea* dichloromethane fraction (DCM), association of Glucantime® and *L. ferrea* dichloromethane fraction (GL+DCM), *L. ferrea* extract (EXT) and association of Glucantime® and *L. ferrea* extract (GL+EXT), dimethylsulfoxide (DMSO). * indicates significant difference for the control (-) – untreated cells.



The antileishmanial activity of the drugs and extracts discussed above were evaluated via incubation with RAW264.7 macrophages infected with *L. (L.) amazonensis*. Pentamidine (PTM) reduced infection rates by over 50% (Figure 2). The *Libidibia ferrea* dichloromethane fraction (DCM) also effectively reduced the infection of RAW264.7 cells (Figure 3). Considering the cytotoxicity of pentamidine at the concentration tested, it is likely that the effects of pentamidine were non-specific. Infected cells treated with GL and also with a combination of treatments (GL + DCM and GL + EXT) were less effective, since these infected cells presented higher infection rates, with an average of over 35%, and showed no significant difference in relation to the negative control ($p > 0.05$).

Figure 2. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection rate in RAW cells after 24 hours. Glucantime® (GL); Pentamidine (PTM); *Libidibia ferrea* dichloromethane fraction (DCM), association of Glucantime® and *L. ferrea* dichloromethane fraction (GL+DCM), *L. ferrea* extract (EXT) and association of Glucantime® and *L. ferrea* extract (GL+EXT), dimethylsulfoxide (DMSO). * indicates significant difference for control (-) – infected and untreated cells.

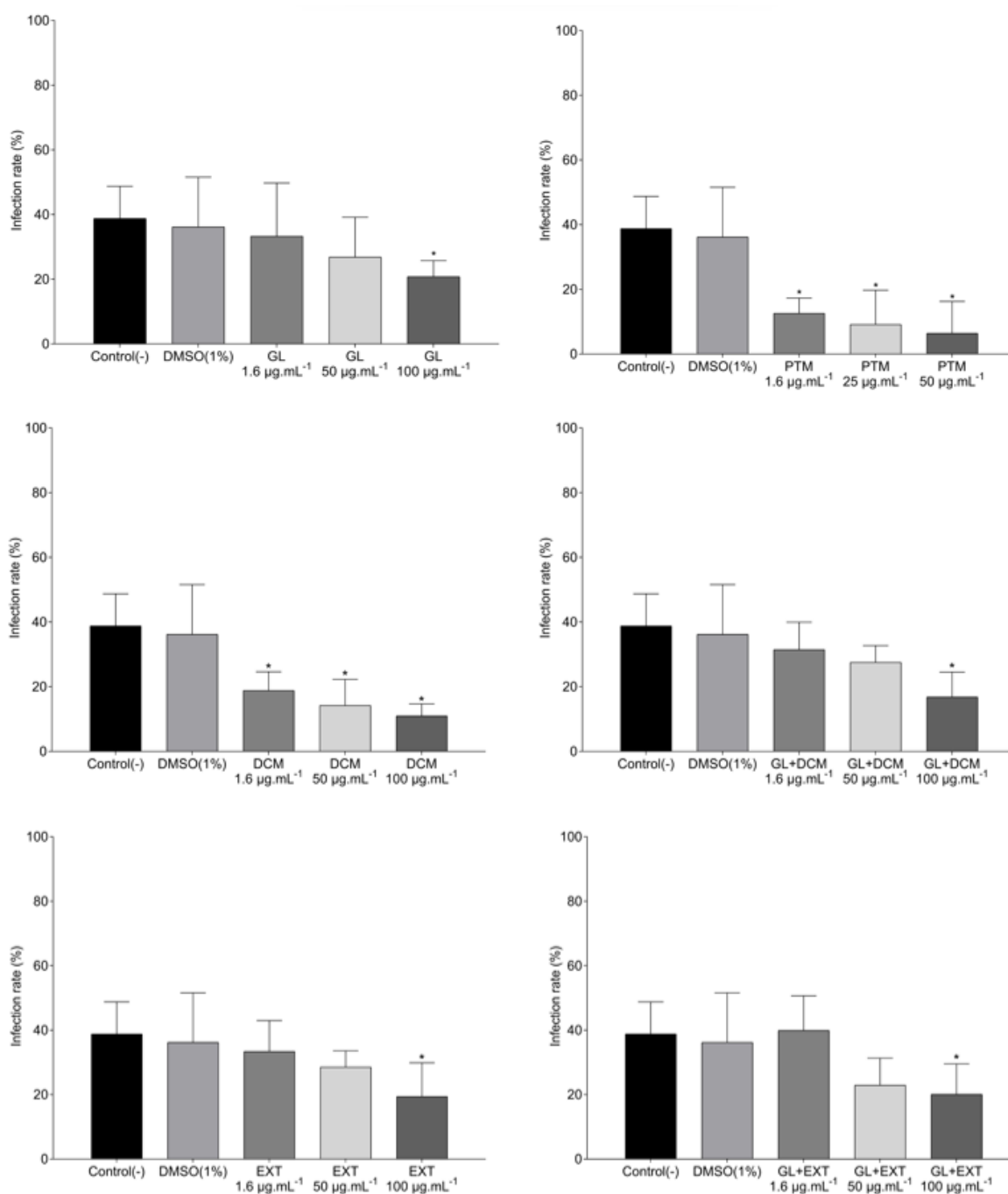
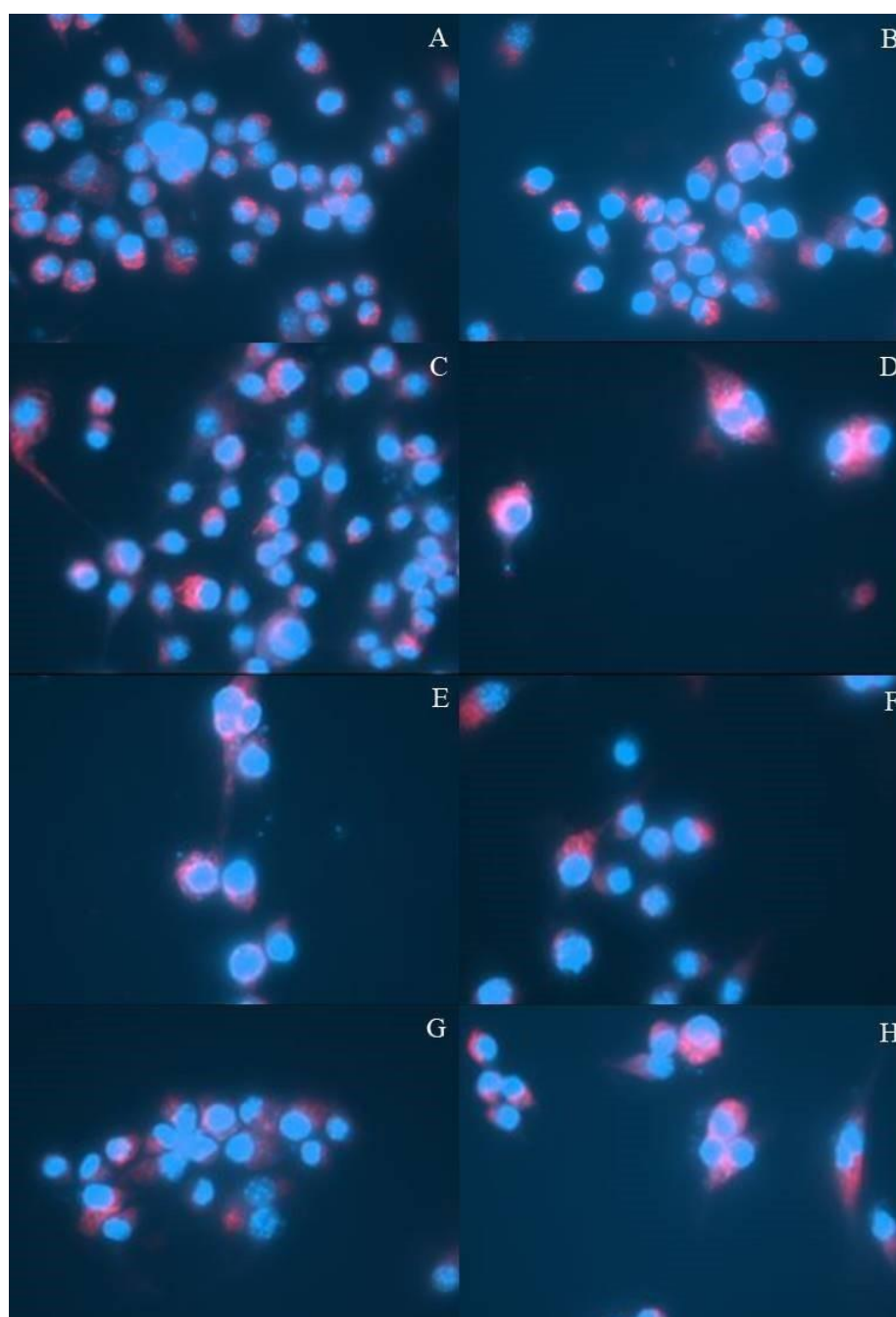
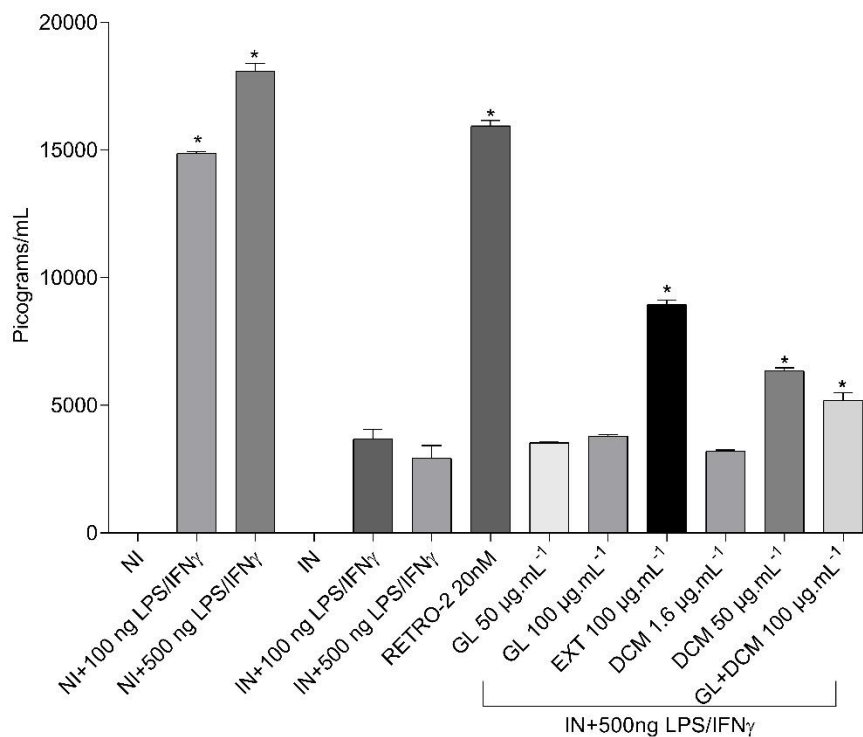


Figure 3. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection rate in RAW cells after 24 hours. A - control (-) – infected and untreated cells; B – DMSO (1%); C – Glucantime® (100 µg. mL⁻¹); D – Pentamidine (50 µg. mL⁻¹); E – *Libidibia ferrea* dichloromethane fraction and association of Glucantime® (100 µg. mL⁻¹); F – *L. ferrea* dichloromethane fraction (100 µg. mL⁻¹); G – *L. ferrea* extract and association of Glucantime® (100 µg. mL⁻¹); H – *L. ferrea* extract (100 µg. mL⁻¹).



Leishmania infection is known to inhibit signal transduction pathways in infected cells, therefore a biological assay was performed to determine whether the *L. ferrea* extract and fraction exhibit the ability to reverse the inhibition of IL-6 secretion. RAW264.7 macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* were incubated with LPS/IFN γ and the *L. ferrea* extract, fraction or Glucantime[®].

Figure 4. Cytokine secretion in RAW264.7 macrophages infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. NI – uninfected, IN – infected, LPS – lipopolysaccharide, IFN γ – interferon-gamma, GL – Glucantime[®], EXT – *Libidibia ferrea* extract and DCM – *Libidibia ferrea* fraction.



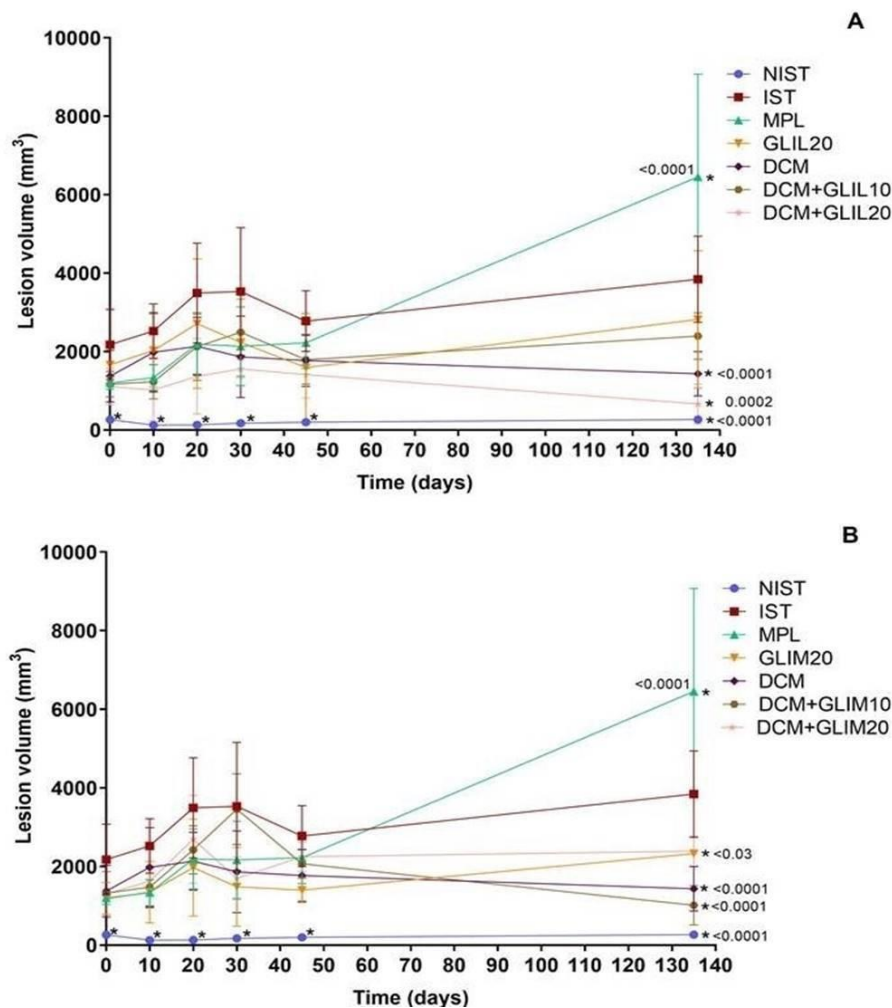
As shown in Figure 4, levels of IL-6 in the infected cell medium were significantly lower when compared to levels of IL-6 in the uninfected cell medium treated with LPS/IFN γ , as shown previously. Incubation with increasing concentrations of *L. ferrea* extract and fraction reversed the suppression of IL-6 release. The *L. ferrea* fraction was deemed to be more potent than the extract since it was more effective at lower concentrations. Glucantime[®] had no effect on parasite-induced IL-6 secretion.

To evaluate the *in vivo* effects of these compounds, their effects were determined via a topical microemulsion formulation in combination with intralesional Glucantime®. Cutaneous lesions in hamsters were evaluated after 30 and 135 days of treatment (Figure 5). The DCM+GLIL20 group had the lowest mean lesion volume, which was significantly lower than the uninfected control group (Kruskal-Wallis test, p-value<0.001). This demonstrated that, during the entire period, the treatment performed on the DCM+GLIL20 group was more effective in reducing the volume of the lesions on the snouts of the animals infected with *L. (L.) amazonensis* (Figure 5A).

When evaluating the effects of the combined treatment with IM Glucantime® and the topical microemulsion of the *L. ferrea* DCM fraction, it was noted that, after the 30th day, the treatment group that presented the lowest mean lesion volume was the GLIM20 group when compared to the IST (infected and untreated) group (Kruskal-Wallis test, p-value<0.001). On the 135th day, there was a significant increase in the mean volume of the lesions in the GLIM20 group; however, in the same period, there was a significant reduction in the mean volume of the lesions in the DCM+GLIM10 group, which was significantly different when compared to the IST group (Kruskal-Wallis test, p-value<0.001). Thus, it can be inferred that treatment with DCM+GLIM10 was more effective in reducing the volume of the lesions on the snouts in the animals infected with *L. (L.) amazonensis* (Figure 5B).

Figure 5. Snout volume of uninfected hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. (A) Infected animals treated with the microemulsion containing the *L. ferrea* DCM fraction (topical route) and intralesional Glucantime®. (B) infected animals treated with the microemulsion containing the DCM fraction of *L. ferrea* (topical route) and intramuscular Glucantime®. * indicates significant difference for IST group. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/Kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with

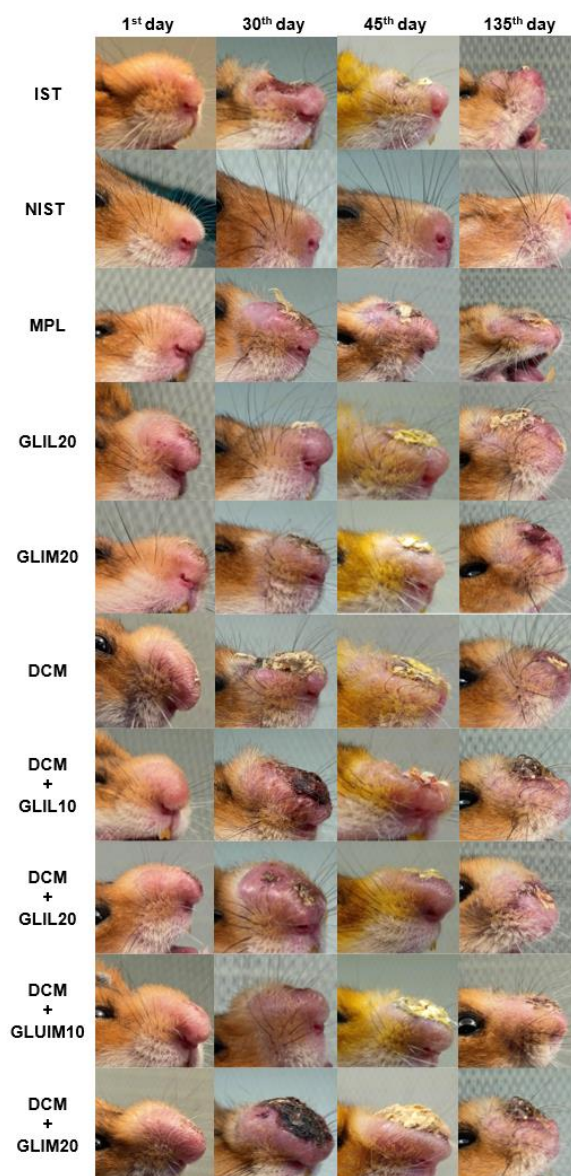
Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.



The clinical evaluation of the lesions on the snouts of the hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *L. (L.) amazonensis* demonstrated a reduction in the edema in the DCM+GLIM10 group; however, there was no clinical cure in any of the treatment groups (Figure 6).

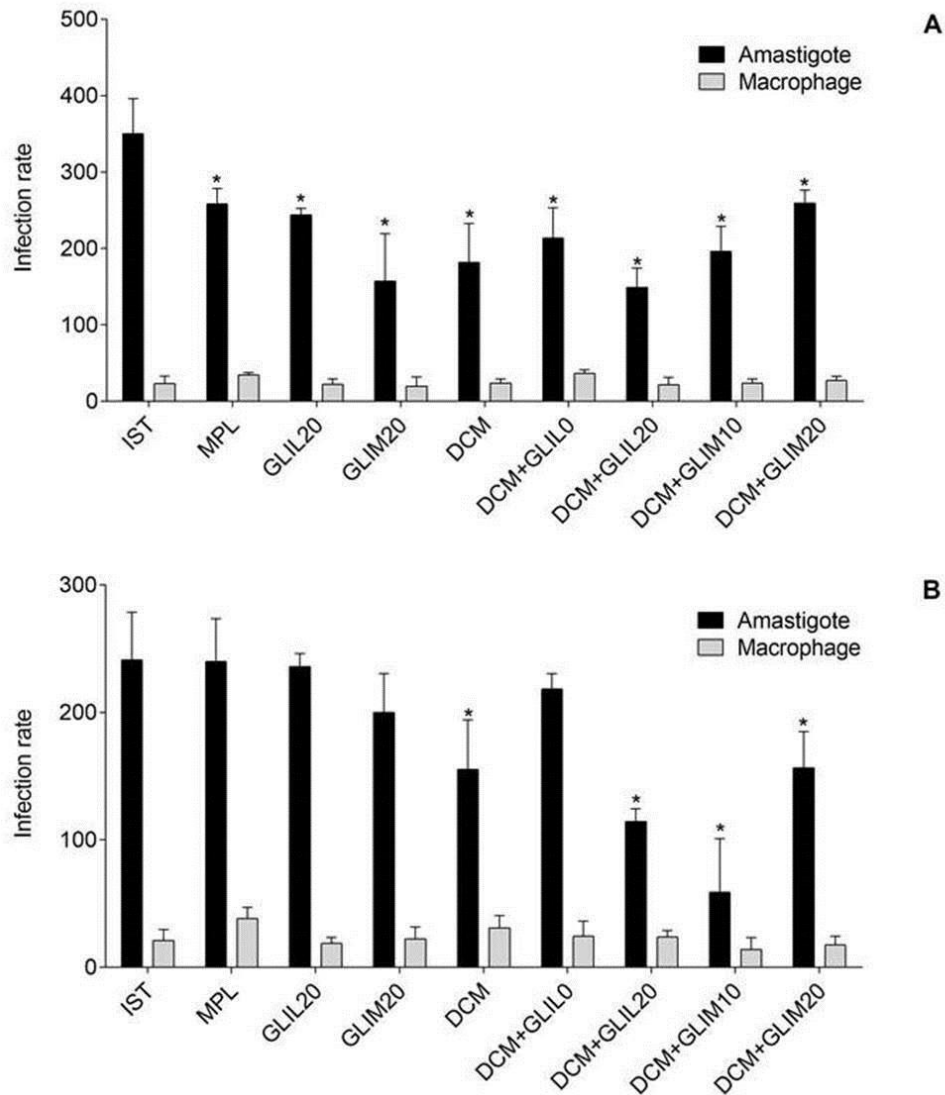
Figure 6. Clinical aspects of snout lesions of the hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM:

infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.



The infection rate in all the experimental groups was determined via the quantification of macrophages and amastigotes from the imprint of the lesion biopsy. This analysis revealed that, after the 30th day of treatment, the group that presented the lowest infection rate was DCM+GLIL20, which presented the lowest number of amastigotes per infected macrophages, and a significant difference was observed for the IST group (Figure 7A). The analysis performed after the 135th day of treatment revealed that the group that had the lowest infection rate in this period was DCM+GLIM10 (significant difference for the IST group ($p < 0.001$), which presented a lower number of amastigotes per infected macrophages.

Figure 7. Infection rate in hamsters on the 30th day (A) and 135th day (B) of treatment. * indicates significant difference for IST group. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.

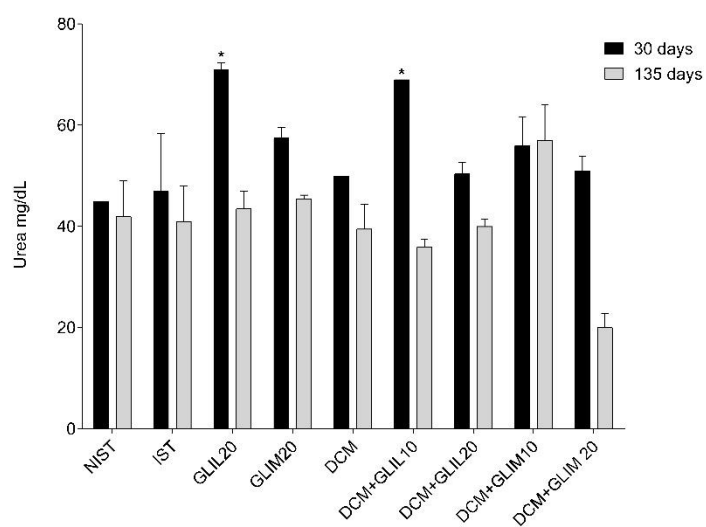
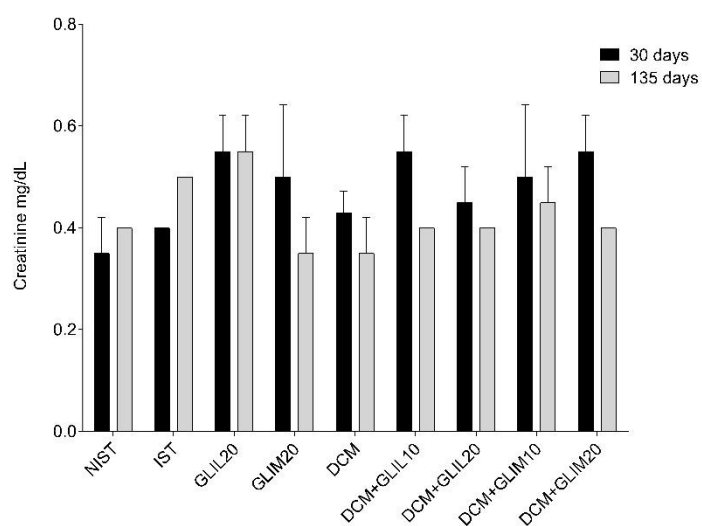
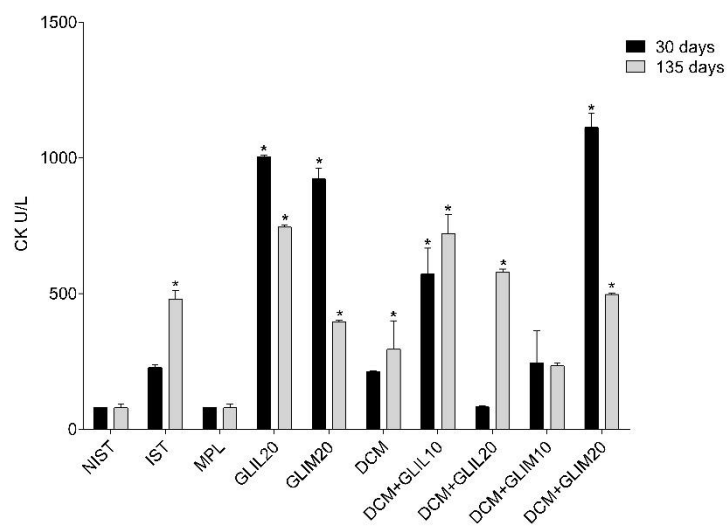


A biochemical analysis of the infected animals was performed, and the creatine kinase (CK) value for the NIST control group was 79.5 on the 30th and 135th day. The CK value for DCM+GLIL20 group was 83 on the 30th day and 234.5 on the 135th day (Figure 8). After performing the t-test, it was found that there was a significant difference ($p < 0.001$) between the means of CK on the 30th and 135th day of treatment.

Urea analysis of the NIST control group revealed values of 45 and 42 on the 30th and 135th day of treatment, respectively. The treatment group with values closest to this group was the IST group with a value of 47 and 41 on the 30th and 135th day, respectively (Figure 8). After performing the t-test, it was found that there was a significant difference ($p < 0.001$) between the mean urea values on the 30th and 135th day of treatment.

For creatinine analysis, the value for the NIST control group was 0.35 and 0.4 on the 30th and 135th day of treatment, respectively. The IST group had a value of 0.4 on the 30th day and the DCM+GLIL10, DCM+GLIL20 and DCM+GLIM20 groups had values of 0.4 on the 135th day (Figure 8). After performing the t-test, it was found that there was no significant difference ($p < 0.066$) between the mean creatinine values on the 30th and 135th day of treatment.

Figure 8. Biochemical values of creatine kinase (CK), urea and creatinine in hamsters on the 30th and 135th day of treatment. * indicates significant difference for NIST group. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with placebo microemulsion; GLIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL; DCM: infected and treated with DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIL20: IL infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IL and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) IM; DCM+GLIM10: infected and treated with Glucantime® (10 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically; DCM+GLIM20: infected and treated with Glucantime® (20 mg/SbV/kg/day) via IM and DCM microemulsion (50 mg/kg/day) topically.



DISCUSSION

In Brazil, the standard drug of choice for CL is meglumine antimoniate (Glucantime®). Several treatment regimens are offered according to the patient's needs and their response to treatment⁴; however, geographic location and the infecting species must be taken into account in order to determine the therapeutic regimen (Croft; Coombs, 2003).

In this study, the use of Glucantime® on its own and in association with the methanolic extract and the dichloromethane fraction of *L. ferrea* was evaluated *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* assays, it was observed that Glucantime®, the methanolic extract and the dichloromethane fraction of *L. ferrea* presented low cytotoxicity in RAW264.7 cells in contrast to pentamidine, which was cytotoxic for RAW264.7 cells. These results corroborate the studies by Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) and Jensen *et al.* (2017), in which extracts of *L. ferrea* (>500 µg.mL⁻¹) and fractions of *L. ferrea* (>74.1 µg.mL⁻¹) were not found to be cytotoxic to J774 macrophages and murine peritoneal macrophages, respectively.

In the evaluation of the antileishmanial activity against amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, pentamidine and the dichloromethane fraction of *L. ferrea* were more effective in inhibiting the infection of RAW264.7 cells. These studies corroborate the observations of Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017) and Jensen *et al.* (2017), who found that the extracts and fractions of *L. ferrea* reduced the infection rate of *L. (L.) amazonensis* amastigotes by 54% and 21.5%, respectively.

The occurrence of abnormality in the expression of the IL-6 gene may be associated with the risk of developing mucosal leishmaniasis, since this cytokine is related to a pro-inflammatory profile (Shehadeh *et al.*, 2019). In this context, some studies have shown that there are substances that can act to suppress or increase the expression of the IL-6 cytokine, an illustration of which are the Retro-2 derivatives that reversed the inhibition of IL-6 production in infected cells treated with LPS (Craig *et al.*, 2017).

Thus, this study sought to investigate the action of the substances on IL-6 expression and the infection rate, and observed that treatment with the methanolic extract of *L. ferrea* restored LPS responsiveness with increased IL-6 secretion. Intriguingly, the restoration of IL-6 secretion in response to LPS treatment appears to

be independent of the cell's parasite load. Although cells treated with the combination of the *L. ferrea* fraction and Glucantime® had a lower rate of infection, the reversal of IL-6 expression was modest. These results are consistent with those of Craig *et al.* (2017), who showed that although treatment with miltefosine resulted in a significant reduction of cells infected by *L. (L.) amazonensis*, the suppression of IL-6 was not reversed.

In the evaluation of the *in vivo* treatments, Glucantime® was administered intramuscularly and intralesionally, as determined by the Brazilian Ministry of Health, whose recommendations include a 30-day treatment regime with adaptations according to the route of administration, and a daily dose of 20 mg/Sb^V/kg/day via the IM route and 20 mg/Sb^V/kg/day every 15 days via IL (Brasil, 2017). Glucantime® was evaluated as to its individual application and the topical application combined with the microemulsion with the DCM fraction of *L. ferrea* (50 mg/kg/day). It was observed that the treatment performed with only 20 mg/Sb^V/kg/day via the IL route individually showed less efficacy in reducing the leishmaniasis lesion and parasite viability when compared to the treatment with the combination of 20 mg/Sb^V/kg/day IL + the microemulsion. These results are similar to those observed when the treatment was performed with only 20 mg/Sb^V/kg/day via IM route individually. However, in the combination, the greatest efficacy was obtained with 10 mg/Sb^V/kg/day IM + the microemulsion.

The difference in the effectiveness of the tested drugs may have occurred due to the different routes of administration, association and dosage, since each route of administration has advantages and disadvantages. In addition, special circumstances and particular situations can determine which route is most appropriate, as well as the properties and dosage of the drug to be administered (Schellack, 2005). This demonstrates the need to continue the investigation of different therapeutic regimens in order to define a regimen that can provide the greatest efficacy and the least toxicity.

To the best of our knowledge, there are no published studies that have evaluated the combined use of Glucantime® with formulations containing bioactive substances of *L. ferrea*. However, in the literature, there are reports of *in vivo* antileishmanial activity via the topical use of hydrogels containing *L. ferrea* extract, and these have shown a significant reduction in leishmaniasis lesions (42.78%) and parasite loads in hamsters infected with *L. (L.) amazonensis*. This suggests that *L.*

ferrea may become an alternative natural product in the treatment of CL (Comandolli-Wyrepkowski *et al.*, 2017).

The study developed by Jensen (2020) also reported on the antileishmanial activity of *L. ferrea*. In this study, microemulsions containing the dichloromethane fraction (DCM) of *L. ferrea*, used to evaluate its antileishmanial activity in hamsters infected with *L. (L.) amazonensis*, resulted in a similar efficacy of the microemulsion containing *L. ferrea* and Glucantime® via the IL and IM routes, with control of the evolution of the lesions, presence of a moderate inflammatory profile and reduction of the parasite load being observed.

As for the biochemical evaluation, the dosage and analysis of urea and creatinine concentrations can both serve as indicators of renal failure, especially when levels are very high, with concentrations ranging between 0.4-1 mg/dL of creatinine and 12-26 mg/dL of urea in blood serum being considered as a reference value for hamsters (Thrall *et al.*, 2015).

In the biochemical evaluation, it was observed that the greatest increase in urea concentrations occurred in the group treated with 20 mg/Sb^V/kg/day IL in relation to the uninfected and untreated group. These data corroborate the study by Brustolin *et al.* (2022), who observed a significant increase in urea in mice infected with *L. (L.) amazonensis* that were treated intraperitoneally with different doses of Sb^V (20, 100 and 200 mg/kg/day) for 30 consecutive days.

Regarding creatinine, the greatest increase in concentrations was observed in the groups treated with 20 mg/Sb^V/kg/day IL alone and associated with topical microemulsion with the DCM fraction of *L. ferrea*. Despite the increased values, there was no significant difference regarding the control group, unlike what was observed in the study by Brustolin *et al.* (2022), in which mice infected and treated with different doses of Sb^V showed a reduction in creatinine.

Creatine kinase (CK) is an enzyme that is present in high concentrations in skeletal, cardiac and smooth muscle, as well as in the brain, with smaller amounts being present in several other organs, such as the intestine, liver and spleen (Carpenter; Marion, 2018). No reference values were found for golden hamsters; however, Melo *et al.* (2008) describe that the value of the reference interval for the CK index in mice is 20-220 (U/L), so it is possible to infer that, in general, for rodents, all

groups presented increased values when compared to the reference values and the NIST group.

It is noteworthy that the groups that received treatment with Glucantime® alone or in combination, especially the GLIL20 and DCM+GLIL20 groups, showed a significant increase in CK. Glucantime® is known to cause cardiac disorders in a dose-dependent manner, though these are generally reversible, so it is necessary that new studies reassess this association and that infected animals treated with Glucantime® and any possible associations remain under observation for a longer period after the end of the treatment in order to investigate the possible reversal of these CK levels.

The results obtained in this study with *L. ferrea* and in other studies described in the literature demonstrate that there is potential for the use of natural products. This is due to the presence of bioactive molecules in *L. ferrea*, which means that it can be used on its own or in combination with standard CL drugs. However, it is worth mentioning that there is still a need to investigate different formulations containing *L. ferrea*, as well as different therapeutic regimens, since these may present more effective results in terms of parasitological cure.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained, it was determined that the extract and the fraction of *L. ferrea* were not cytotoxic. The *L. ferrea* fraction showed greater efficacy in inhibiting the infection of RAW cells by *L. (L.) amazonensis*. In the *in vivo* evaluation, the treatments performed in combination with Glucantime® and the microemulsion with the DCM fraction of *L. ferrea* were more effective in limiting the increase in lesions produced by *L. (L.) amazonensis* in golden hamsters. They also resulted in a reduction in the parasitic load, when compared to the groups that received treatment with the standard drugs alone.

Thus, we can conclude that the microemulsion with the combination of the DCM fraction of *L. ferrea* and Glucantime® is promising for a future treatment of CL caused by *L. (L.) amazonensis*. Nonetheless, it is recommended that further studies be carried out to improve the formulations containing bioactive substances of *L. ferrea*. In addition, the potential of different drug combinations should be evaluated in light of the

limited toxicity of these compounds, as well as the evaluation of new therapeutic regimens on other species of the genus *Leishmania*.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEM) for supporting the study via the call HORIZON/2020.

REFERENCES

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA A. P. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 2072. 2016.

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novo Protótipos e Vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 861. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual da Leishmaniose*. 2017. Available at: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Accessed: 14 nov. 2022.

BRUSTOLIN, A. A.; FRANZOI, N.M.; RAMOS-MILARE A. C. F. H.; TANOSHI C. A.; MOTA C. A.; DEMARCHI I. G.; LONARDONI M. V. C.; SILVEIRA T. G. V. A. standardized intraperitoneal Glucantime™ for experimental treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis* in BALB/c mice. **Exp. Parasitol.**, v. 236–237, p. 108259. 2022.

CARPENTER, J. W.; MARION, C. J. *Exotic Animal Formulary* (Elsevier Inc). 2018.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C. D.; JENSEN, B. B.; GRAFOVA, I.; SANTOS, P. A.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; BARCELLOS, J. F. M.; SILVA, A. F.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. **Acta Amazonica**, v. 47, p. 331. 2017.

CRAIG, E.; HUYGHUES-DESPOINTS, C.E.; YU, C.; HANDY, E. L.; SELLO, J. K.; KIMA, P. E. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. e0005556. 2017.

CROFT SL, COOMBS GH. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502. 2003.

DNDi. *Best Science for the Most Neglected*. 2018. Available in: www.dndi.org/.

FALCÃO, T. R.; RODRIGUES, C. A. O.; ARAÚJO, A. A.; MEDEIROS, C. A. C. X.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; VASCONCELOS, R. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, R. F.; LOPES, M. L. D. S.; GUERRA, G. C. B. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p. 1. 2019.

GARZON, L. R.; FRACASSO, M.; VIANA, A. R.; GIACOMETI, M.; SAMOEL, G. V. A.; SOUZA, L.; BALDISSERA, M. D.; PETRY, L. S.; KRAUSI, L. M. F.; MONTEIRO, S. G. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 82837. 2021.

GHORBANZADEH, M.; FARHADIAN, N.; GOLMOHAMMADZADEH, S.; KARIMI, M.; EBRAHIMI, M. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, p. 393. 2019.

JENSEN, B. B.; WYREPKOWSKI, C. D. C.; BARROS, A. M. C.; SOARES, F. V.; GRAFOVA, I.; GRAFOV, A.; FRANCO, A. M. R. **Acta Brasiliensis**, v. 1, p. 33. 2017.

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

MELO, M. M.; VERÇOSA-JÚNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ V, E. C. C. O. R.; PAES, P. R. O. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 631. 2008.

SHEHADEH, F. V. B.; SANTOS, R. R.; SILVA, L. A. D.; SILVA JÚNIOR, W. V.; RIBAS-SILVA, R.; RIBAS, A. D.; SILVEIRA, T. G. V.; BORELL, S. D.; ARISTIDES, S. M. A. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 52, p. e20170415. 2019.

SCHELLACK, G. *Farmacologia uma abordagem didática* (São Paulo: Fundamento Educacional). 2005.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALISSON, R. W.; CAMPBELL, T. W. *Hematologia e Bioquímica. Clínica Veterinária* (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan). 2015.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. 2021. Available at: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Accessed 11/14/2022.

7 CAPÍTULO 3

Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: an *in vivo* assay

Thiago de Jesus Bacha^{1,2}, Bruno Bezerra Jensen², Daniele de Carvalho Rodrigues¹,
Messe Elmer Torres da Silva², Amanda Araújo², Katia Solange Cardoso Rodrigues
dos Santos Geraldi¹, Robson Cabral Valadão², Francimeire Gomes Pinheiro²,
Antonia Maria Ramos Franco²

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

²Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas (Coordenação de Saúde e Bem Estar Social - COSBE/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA), Manaus, Amazonas, Brazil.

Abstract

Cutaneous leishmaniasis, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, presents diverse clinical manifestations, and current therapeutic options have limitations, including long treatment periods, potential hospitalization, and excessive pain during treatment. Methyl gallate, a phenolic compound found in plants such as *Libidibia ferrea*, presents promising antileishmanial activity. Combining this compound with existing leishmaniasis medications could lead to reduced dosages and the minimization of side effects. This study aimed to assess the efficacy of a microemulsion containing methyl gallate, either on its own or in combination with Glucantime®, for the experimental treatment of cutaneous leishmaniasis in a 30-day in vivo assay using golden hamsters infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. The control groups included an untreated positive control and an uninfected, untreated negative control. After treatment, the study evaluated clinical, parasitological, and biochemical parameters. While none of the treatments achieved clinical or parasitological cure, notable improvements were observed in the combined group, with significant reductions in snout skin lesions and parasite load when compared to the control. Biochemical parameters such as creatinine, CK-MB, GOT, and GPT remained unchanged, but urea and CPK levels significantly increased in all the experimental groups relative to the control. In conclusion, the integration of a topical methyl gallate microemulsion with intralesional Glucantime® showed potential as an effective treatment for cutaneous leishmaniasis. Further investigations into optimal dosages and therapeutic schemes are warranted in order to enhance treatment outcomes.

Keywords: natural product, gallic acid derivatives, biological assay, neglected diseases.

Resumo

A leishmaniose cutânea, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta diversas manifestações clínicas e as opções terapêuticas atuais têm limitações, incluindo longos períodos de tratamento, possível hospitalização e dor excessiva durante o tratamento. O galato de metila, um composto fenólico encontrado em plantas como *Libidibia ferrea*, mostra atividade antileishmania promissora. A combinação deste composto com os medicamentos existentes para leishmaniose pode levar a dosagens reduzidas e à minimização dos efeitos colaterais. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de uma microemulsão contendo galato de metila,

isoladamente ou em combinação com Glucantime®, no tratamento experimental da leishmaniose cutânea em um ensaio in vivo de 30 dias em hamsters sírios infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Os grupos de controle incluíram um controle positivo não tratado e um controle negativo não infectado e não tratado. Após o tratamento, o estudo avaliou parâmetros clínicos, parasitológicos e bioquímicos. Embora nenhum dos tratamentos tenha alcançado cura clínica ou parasitológica, melhorias notáveis foram observadas no grupo combinado, com redução significativa nas lesões cutâneas do focinho e na carga parasitária em comparação com o controle. Parâmetros bioquímicos como creatinina, CK-MB, TGO e TGP permaneceram inalterados, os níveis de ureia e CPK aumentaram significativamente em todos os grupos experimentais em relação ao controle. Em conclusão, a integração da microemulsão tópica de galato de metila com Glucantime® intralesional mostrou potencial como um tratamento eficaz para a leishmaniose cutânea. Mais investigações sobre dosagens ideais e esquemas terapêuticos são necessárias para melhorar os resultados do tratamento.

Palavras-chaves: produto natural, derivados do ácido gálico, ensaio biológico, doenças negligenciadas.

Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by the protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted by the bites of sandflies and cause different clinical manifestations in humans. Some of the main species from the New World are *Leishmania Mexicana* (Biagi, 1953), *Leishmania amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972) and *Leishmania venezuelensis* (Bonfante-Garrido, 1980) (Bailey and Lockwood 2007). According to the latest epidemiological survey, CL has been reported in 92 countries (WHO 2021). In Brazil, CL has significant importance, and is regarded as a crucial public health issue. Due to its tropical climate and the presence of suitable vectors, such as sandflies, the Amazon region provides favorable conditions for the transmission of the parasite responsible for the disease. Moreover, the expansion of human activities, such as deforestation and disorderly occupation, contributes to the rise in the number of cases of cutaneous leishmaniasis in the region (Souza *et al.* 2021).

Due to the diversity of *Leishmania* species and the associated clinical manifestations of CL, the Brazilian Ministry of Health recommends different drugs (meglumine antimoniate, pentamidine isethionate or amphotericin B) and different therapeutic schemes that can be used in the treatment of this disease (Brasil 2017). However, despite the different protocols, there are reports of parasite resistance and difficulties in carrying out the treatment due to the longevity and toxicity of the indicated drugs (Bastos *et al.* 2016). An alternative medication for the treatment of CL is miltefosine (hexadecylphosphocholine), which is administered orally, but can cause harm to the fetus, including fetal death in in vivo models, and therefore should not be used by pregnant women (CONITEC 2018).

Considering these negative aspects of existing treatments, it is necessary to search for new active ingredients and different, less invasive, pharmaceutical formulations as an alternative to the currently available treatments for CL. A potential source for new treatments are bioactive molecules extracted from medicinal plants and microorganisms (Jensen *et al.* 2017; Garzon *et al.* 2021). Methyl gallate is a phenolic compound that shows promising antileishmanial activity and is found in plants such as *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) (Comandolli-Wyrepkowski *et al.* 2017), *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) (Kaur *et al.* 2014), and *Margaritaria nobilis* Lf (Phyllanthaceae) (Moraes *et al.* 2015).

Methyl gallate extracted from *L. ferrea* was evaluated in vitro for antileishmanial activity by Jensen (2020), and demonstrated leishmanicidal activity in promastigotes and amastigotes of *L. (L.) amazonensis* and the absence of a cytotoxic profile. Commercially purchased methyl gallate effectively inhibited the growth of promastigotes in vitro and reduced the rate of infection of macrophages by amastigotes of *L. (L.) amazonensis* (Dias *et al.* 2020).

There are no reports in the literature regarding the evaluation of methyl gallate on its own or in combination with Glucantime® for the experimental in vivo treatment of CL, but the topical use of a microemulsion containing the dichloromethane fraction of *L. ferrea* containing methyl gallate showed in vivo antileishmanial activity in hamsters, with control of the evolution of the lesions, presence of a moderate inflammatory profile and reduction of the parasitic load (Jensen 2020).

Regarding pharmaceutical formulations, microemulsified systems have advantages such as an increased stability of compounds, bioavailability, and the

improved permeation of bioactive molecules and their release, in addition to being less painful, easy to apply, and quickly absorbed by the skin (Callender *et al.* 2017; Ghorbanzadeh *et al.* 2019).

Acknowledging the challenges posed by current treatments in terms of difficulty, discomfort and cytotoxicity, this study pursued the primary objective of formulating a novel microemulsified solution that incorporates methyl gallate for the experimental *in vivo* treatment of cutaneous leishmaniasis. We determined the microemulsion's particle size, pH, and zeta potential was determined, and evaluated its efficacy when administered on its own or in combination with Glucantime® at various concentrations and biochemical dosages.

Material and Methods

Origin and maintenance of parasites

The strain used in this study was *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (MHO-BR-2009-IM5584). The sample used was cryopreserved in the strain cryobank of the Leishmaniosis and Chagas Disease Laboratory at Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Preparation and characterization of microemulsions

The active ingredient used in the study was methyl gallate (gallic acid methyl ester, methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate), linear formula (HO)₃C₆H₂CO₂CH₃, CAS 99-24-1, purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Two microemulsions were prepared in May 2022, one with 2% methyl gallate (MMG) and a placebo microemulsion (MPL) without the active ingredient. Both were developed based on isopropyl alcohol, Tween® 20, distilled water, oleic acid and 2% methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (Sigma-Aldrich®) as described by Jensen (2020). The reagents were stirred for about 2 minutes, until a homogeneous, transparent and monophasic solution was obtained. The two microemulsions were stored at room

temperature in amber tubes in the Leishmaniasis and Chagas Disease Laboratory at INPA.

Particle size, viscosity and zeta potential were assessed with a light-scattering particle size analyzer (Zetasizer, Malvern Panalytical®). The pH was measured using a pH and ORP meter (pH 21, Hanna®).

In vivo experiment

The treatment protocol was developed following Comandolli-Wyrepkowski *et al.* (2017), using golden hamsters (*Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839) as an experimental model for this specific disease. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* was chosen due to its widespread occurrence in Brazil, making it a relevant and representative target. The dosage of the topical microemulsion that was applied to the golden hamsters was calculated based on preliminary studies conducted by Jensen (2020), while the dosage of Glucantime® followed the therapeutic recommendation of 10 to 20 mg kg⁻¹ day⁻¹ by the Brazilian Ministry of Health (Brasil 2017).

We used 48 male, adult golden hamsters, with an average weight of 120 ± 6 g and aged 60 days, were obtained from and kept in the Central Animal Facility at INPA in air-conditioned rooms (photoperiod 12-12), with ad libitum feeding conditions and free of pathogens. The animals were divided into eight experimental groups containing six animals per group; seven groups were inoculated in the snout with a volume of 0.1 mL of stationary phase promastigotes (106 parasites mL⁻¹) of *L. (L.) amazonensis* and one group was not inoculated. Fifteen days after inoculation, when leishmaniasis lesions appeared, the treatment of the animals was started according to the following experimental design:

I) **Group MMG** (methyl gallate microemulsion): infected and treated with the methyl gallate microemulsion (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically;

II) **Group MPL** (placebo microemulsion): infected and treated with topical placebo microemulsion;

III) **Group GIL10** (intralesional Glucantime® 10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹): infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally (IL);

IV) **Group GIL20** (intralesional Glucantime® 20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹): infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL;

V) **Group MMG+GIL10:** infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically;

VI) **Group MMG+GIL20:** infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically;

VII) **Group IST:** infected and untreated (positive control);

VIII) **Group NIST:** uninfected and untreated (negative control).

The microemulsions (MMG and MPL) and Glucantime® were administered to the animals in a volume of 0.15 mL over the epidermis. The animals treated topically with the methyl gallate microemulsion received daily treatment for a period of 30 days. The animals that were treated intralesionally with Glucantime® received a dose on the 1st, 15th and 30th day (total of three applications). Subsequently, all animals remained under observation for another 15 days (without any treatment), totaling 30 days of treatment and 15 days of follow-up.

During the treatment period, the total volume of the lesion (length, width and height) was measured on alternate days using a digital caliper (Zaas® Precision) to analyze the progression of the lesion, and photodocumentation of the clinical evolution of the lesions was also performed.

After completing the treatment, the animals were euthanized with Vetnil® (ketamine hydrochloride 10%) and Syntec® (xylazine 2%), as recommended by the INPA Animal Research Ethics Committee, and biological material was collected for parasitological and biochemical evaluation. For the parasitological evaluation, a tissue sample extracted from the lesion area of each animal was used for imprinting onto glass slides. Subsequently, the biological material present on the slides underwent fixation using methyl alcohol and staining with Giemsa solution (Sigma). The infection rate was evaluated from the count (optical microscope with 100x objective) of amastigotes and macrophages present in the 25 fields of each rectangular glass slide (Comandolli-Wyrepkowski *et al.* 2017).

Parasite viability was assessed by sowing another part of the lesion sample in Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium and left for seven days at 25 °C. The confirmation of the presence or absence of parasite was performed by identifying parasites in the cultures, were considered negative only when there was total absence of parasites. The parasite count was performed under an optical microscope with an

objective of 100 and quantified by score, the absence of a parasite was considered a score of 0, from 1 to 9 parasites score 1, from 10 to 100 parasites score 2 and score 3 for > 100 parasites (Comandolli-Wyrepkowski *et al.* 2017).

The biochemical response was analyzed by collecting 2 mL of blood from each animal. Indicators of kidney function (urea and creatinine), the cardiac markers creatine phosphokinase (CPK) and creatine phosphokinase fraction MB (CK-MB) and the liver markers glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamate-pyruvic transaminase (GPT) were analyzed with an automated biochemistry analyzer (URIT 8031, MHLab®). CPK and CK-MB indicate potential cardiac or skeletal muscle damage, and creatinine and urea indicate renal impairment as adverse reactions to drug toxicity (Thrall *et al.* 2015).

Statistical analysis

The Kruskal-Wallis test extended the analysis of variance (ANOVA) to compare the volume of lesions in the experimental groups. For paired comparisons between a treatment and its control, as in parasite viability, biochemical analysis, infection rate, the t-test was used, or the non-parametric Mann-Whitney test in cases of non-normality. The significance level used was 5% in all statistical comparisons. All analyzes were performed in the R program (R Core Team 2020) version 4.1.1 and Microsoft Excel Professional Plus 2019.

Ethical aspects

This study was submitted to and approved by the Animal Research ethics committee on research with animals (CEUA) at INPA (approved under protocol # 023-2021 CEUA-INPA).

Results

Microemulsion characterization

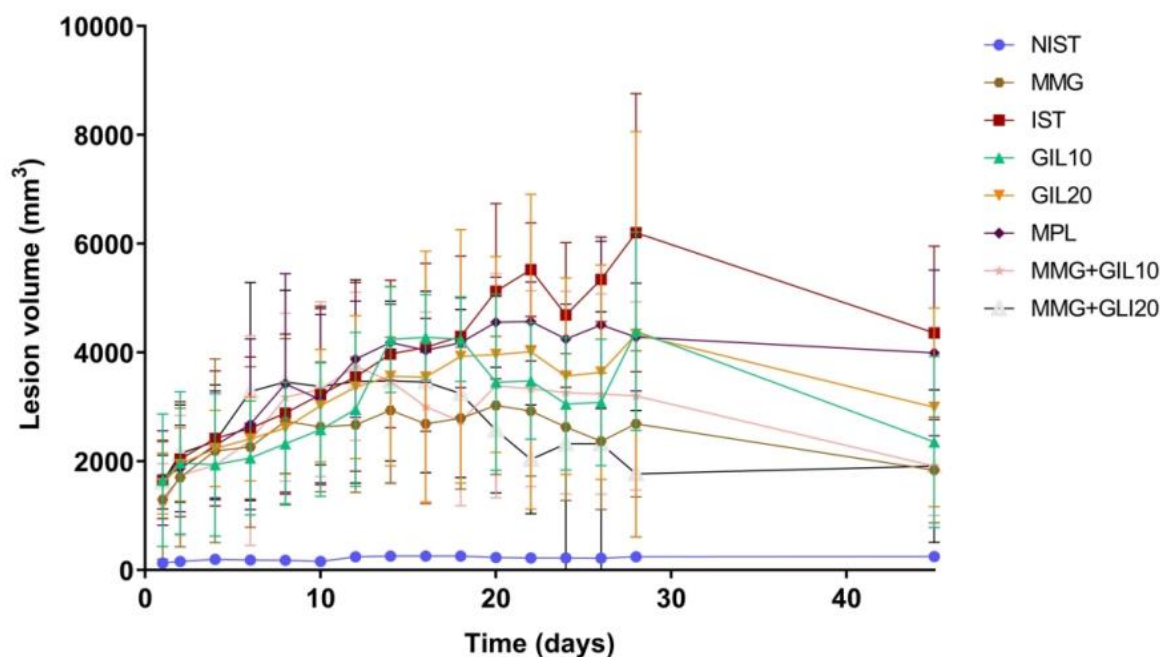
The microemulsions were optically clear, odorless, both had a mean particle size of ~5 nm. MMG had a viscosity of 0.88 cP, magnitude of zeta potential -10.7 mV and pH of 5.5, while MPL had a viscosity of 0.78 cP, magnitude of zeta potential -11.6 mV and pH 5.8.

In vivo experiment

At the end of the experimental period (45 days), all treatments and the IST control showed a 94% increase in the volume of leishmaniasis lesions when compared to the NIST control. In the treatment groups, there was an average reduction of 42.2% in lesion volume in MMG ($p < 0.0001$), 56.1% in MMG+GLI10 ($p < 0.0001$), 56.1% in MMG+GLI20 ($p < 0.0001$), 45.9% in GLI10 ($p = 0.0004$) and 31.3% in GLI20 ($p = 0.0103$), when compared to the IST control (Figure 1).

Figure 1. Evolution of the lesion volume (mm³) of the snout of treated experimental animals and of the control groups not infected and infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

NIST: uninfected and untreated (evolution of the size of the uninfected snout) ; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally ; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally and with a microemulsion of methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) intralesionally and with a microemulsion of methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically.



There was no clinical and parasitological cure in any of the treatment groups and all groups of infected animals had snouts with edema, redness and crust formation during and after the completion of the experimental treatments (Figure 2). We did not observe any reaction that caused irritation on the skin of the animals when topically treated with the microemulsion.

Figure 2. Evolution of lesions caused by cutaneous leishmaniasis in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically .

The lack of standardization in image capture may affect the accuracy of comparing lesion sizes in different images. However, efforts have been made to mitigate this issue

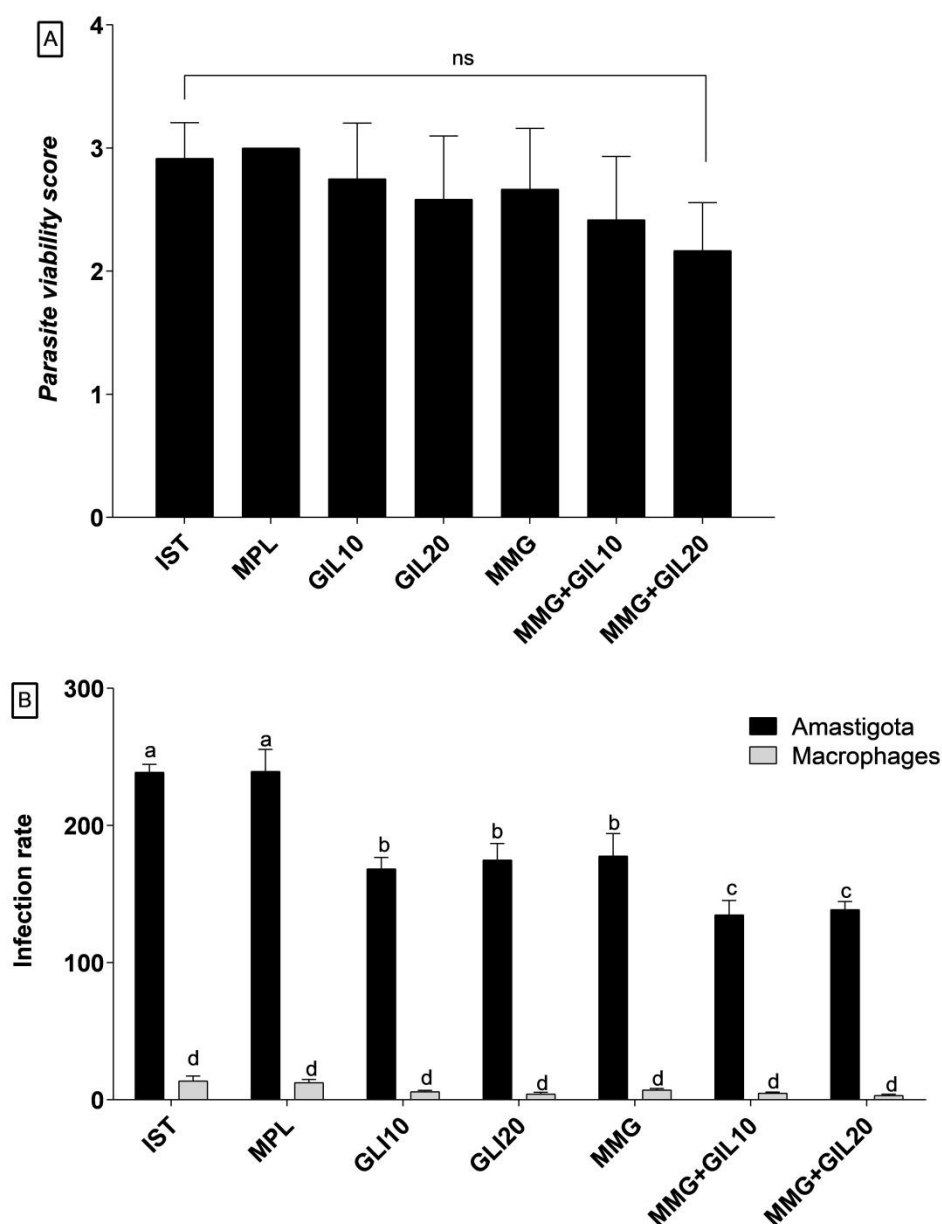
by placing 6 mm scale bars in the NIST group (NIST group mean muzzle width) to provide better muzzle sizing. scale between images.



After 30 days of treatment and 15 days of post-treatment, all experimental groups presented viable parasites after re-isolation of promastigote forms in biphasic NNN medium, with the lowest parasite viability (score 2) for MMG+GIL20. However, there was no significant difference in viability scores between the treatments and the positive control (IST) (Figure 3a). In terms of the amastigote index, the groups treated with MMG+GIL20 and MMG+GIL10 displayed the lowest values, showcasing a statistically significant distinction from the IST positive control ($p < 0.0001$) (Figure 3b).

Figure 3. Parasite viability score (A) and infection rate (B) in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* after treatment.

IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) via IL; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹ day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically.

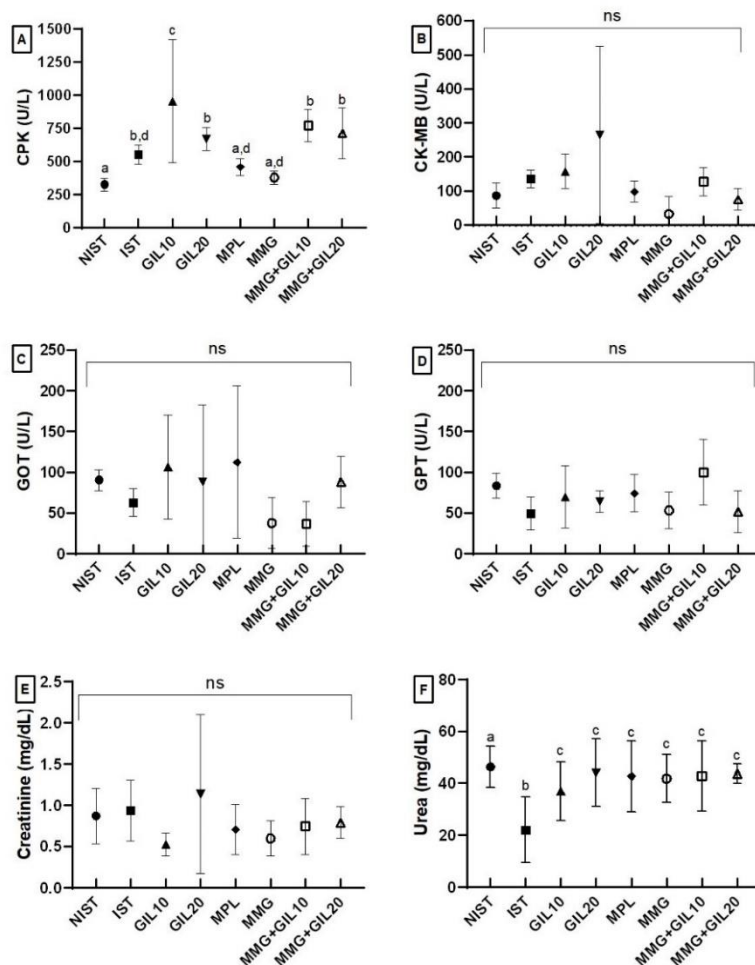


Regarding the biochemical indicators of cardiac function, CK-MB (Figure 4B) did not vary significantly among groups, while the levels of CPK did not differ significantly from NIST only for MPL and MMG (Figure 4A). There was no significant difference in the levels of GOT and GPT among the experimental groups (Figure 4C and 4D). Likewise, no significant difference was observed in the levels of creatinine among the groups (Figure 4E), while urea was significantly higher in NIST and significantly lower in IST compared to all treatment groups (Figure 4F).

Figure 4. Biochemical indicators in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* after treatment.

A - CPK; B - CK-MB; C - GOT; D - GPT; E - creatine and F - urea.

NIST: uninfected and untreated; IST: infected and untreated; MPL: infected and treated with topical placebo microemulsion; GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) via IL; GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) via IL; MMG: infected and treated with microemulsion incorporated with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL10: infected and treated with Glucantime® (10 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically; MMG+GIL20: infected and treated with Glucantime® (20 mg SbV kg⁻¹day⁻¹) IL and with methyl gallate (10 mg kg⁻¹ day⁻¹) topically.



Discussion

Our results indicate that the dimensions of the particles obtained in the microemulsions tested in here are aligned with the criteria established for microemulsions (less than 100 nm) by Tartaro *et al.* (2020). The stability of microemulsions is considered strong when the zeta potential is between 30 mV to -30 mV (Honary *et al.* 2013). In the context of this study, the magnitude of the zeta potential presented in both microemulsions are within the stability range. According to Auston (2015), the ideal pH of a formulation is standardized according to the stability pH of the active components used and the biological tolerance for skin products, with a pH of 5.0 to 8.0 as a reference. The formulations developed in this study in this research showed a pH completely compatible with the skin tissue. The results of these tests indicate a characteristic profile of a stable microemulsion.

Melo e col. (2022) showed the *in silico* binding affinity mechanism involves the inhibition of Leishmania pteridine reductase (PTR1) and oligopeptidase B (OPB) targets by an isopropyl gallate derivative, which had a high power of comparison with amphotericin B. This evidence suggests that it is a promising alternative for the treatment of leishmaniasis.

We observed that the experimental groups with the associated treatment (MMG+GLI 10 and MMG+GLI 20) had a lower infection rate when compared to the other infected groups, and that both groups and the treatment with only methyl gallate (MMG) presented a lower lesion volume when compared to the other groups, corroborating the studies by Dias *et al.* (2020) and Jensen (2020), who demonstrated that methyl gallate has *in vitro* efficacy in reducing the viability of promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis*. Dias *et al.* (2020) also inferred that methyl gallate presented a higher selectivity index when compared to meglumine antimonate and amphotericin B and stimulation of TNF- α , IL-12, ROS and NO production, in addition to showing a decrease in IL-10 and macrophage activation, with an impact on the infection rate. In addition, Jensen (2020) demonstrated that methyl gallate did not show cytotoxicity in murine peritoneal macrophages and J774 lineage cells.

The mechanism of action of Glucantime®, as well as other medications used in the treatment of cutaneous leishmaniasis is still unknown; however, several studies have sought to investigate possible therapeutic targets (Yang *et al.* 2007). In BALB-c

mice, opsonized amastigotes of *L. (L.) amazonensis* induce the activation of MAPK-ERK and a consequent superinduction of IL-10 in infected macrophages, contributing to the exacerbation of the disease, and when these pathways are deactivated, there is a reduction in the lesion and parasitic load in (Yang *et al.* 2007).

Another route with significant importance in the control of parasitic load is reactive oxygen species (ROS), which has no effect on the death of *L. (L.) amazonensis*, but may be associated with the control of lesion size in the early stages of infection, regulating the inflammatory response and the amount of neutrophils in the lesions (Roma *et al.* 2016). Other studies report that quercetin, a molecule from natural products, has antileishmanial activity against promastigotes and amastigotes due to its ability to induce the production of ROS and the disruption of the mitochondrial function of the parasite (Fonseca-Silva *et al.* 2011; Fonseca-Silva *et al.* 2013).

Methyl gallate can exert pharmacological effects through multiple pathways and targets, such as PI3K-Akt, ERK1-2, Caspase, AMPK-NFkB, Wnt- β -catenin, TLR4-NFkB, MAPK, p53, NLRP3, ROS, EMT (Liang *et al.* 2023). It is thus possible that the reduction of the leishmaniotic lesion and the parasitic load in our study in the golden hamsters treated with the methyl gallate microemulsion on its own or in combination with Glucantime® may be related to activation or deactivation of any of these pathways. Further studies should aim to elucidate the mechanisms of action of this molecule against *L. (L.) amazonensis*.

Despite being a traditional model for studying various *Leishmania* species, the golden hamster also has drawbacks, such as its high susceptibility to *L. (L.) amazonensis* infection, which hampers lesion control for parasitological cure. Additionally, each of the traditionally chosen inoculation sites (snout and paw) has disadvantages. Lesion size can be difficult to measure on the paw and can hinder animal mobility, while lesions on the snout can hinder feeding and breathing, and can lead to inconsistency in the results in both cases. Hence, while these studies should persist for comparative reasons, alternative experimental models should also be explored (Robledo *et al.* 2012).

The reference values for renal function indicators in hamsters are 0.4 -1.0 (mg dL) for creatinine and 12-26 (mg dL) for urea, both dosed in blood serum (Carpenter and Marion 2018). Although creatinine values were within the normal range in all our treatments, mean urea values were above the acceptable limit in all experimental

groups, including the NIST control, suggesting that some interference may have occurred and that urea should be dosed in subsequent studies. For the CPK index, as a reference, we used the normal range of 20-220 (U L) determined for mice (Melo *et al.* 2008), as there is no description for the golden hamster. Therefore, the fact that all experimental groups presented values above the reference (> 250 U L) may be related to physiological differences between the species.

However, significant difference in CPK levels between the NIST control and all treatments containing Glucantime® indicates the need for further studies to investigate possible skeletal muscle injuries caused by the treatment. Overall the biochemical changes observed, especially in the groups treated with Glucantime® on its own or in combination with methyl gallate are in accordance with what is described in the Glucantime® package insert, which states that rare alterations in kidney function (elevated creatinine and urea levels), pancreatitis (inflammation in the pancreas) and severe arrhythmias may occur (Sanofi-Aventis 2011).

Our results regarding the synergistic activity of methyl gallate and Glucantime® suggest that future studies be carried out aiming at the use of methyl gallate as an adjuvant drug in the treatment of CL. The Brazilian Ministry of Health currently provides recommendations regarding drugs that can be administered concomitantly with Glucantime®, such as pentoxifylline for the treatment of CL (Brasil 2017). Methyl gallate can be used in topical form, is painless, can be used outside the hospital environment, and enhances the effect of traditional treatments, potentially reducing the treatment period.

The insights gleaned from our study regarding the clinical trajectory of the ailment, coupled with the parasitological and biochemical gauges observed in methyl gallate-treated animals, highlight the latent utility of this compound as an adjunctive component in addressing cutaneous leishmaniasis. Subsequent research endeavors ought to scrutinize varied dosages and treatment schemas, integrating the methyl gallate microemulsion with Glucantime®, while also exploring alternative therapeutic protocols.

Conclusions

Our results suggest that the microemulsion formulation containing methyl gallate ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) has antileishmanial activity in golden hamsters infected with *L. (L.) amazonensis*, and its combined use with Glucantime® ($20 \text{ mg SbV kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) via IL is more effective in controlling the progression of leishmanial lesions, while also reducing parasite load when compared to groups receiving individual drug treatments. We conclude that the combination of the methyl gallate microemulsion and Glucantime® shows potential as a complementary treatment of CL. Further in vitro and in vivo studies are needed to explore the antileishmanial activity of this drug in other *Leishmania* species, its in vitro cytotoxicity, in vivo toxicity, biochemical effects, new therapeutic approaches and to determine its potential for clinical and parasitological cure.

References

- Auton, M. E. 2005.; Delineamento de Formas Farmacêuticas, 2a ed. Pág. 269.
- Bailey, M.S.; Lockwood, D.N. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 25: 203-211.
- Bastos, M.M.; Boechat, N.; Hoelz, L.V.B.; De Oliveira, A.P. 2016. Quimioterapia antileishmania: uma revisão da literatura. *Revista Virtual de Química* 8: 2072-2104.
- Brasil. 2017. Ministério da Saúde. Manual da Leishmaniose. (https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf) Accessed on 30 Jul. 2021.
- Callender, S.P.; Mathews, J.A.; Kobernyk, K.; Wettig, S.D. 2017. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 526: 425-442.
- Carpenter, J.W.; Marion, C.J. 2018. Exotic Animal Formulary. 5th ed. Elsevier Inc., Philadelphia, PA, 776 p.

Comandolli-Wyrepkowski, C.D.; Jensen, B.B.; Grafova, I.; Santos, P.A.; Barros, A.M.C.; Soares, F.V.; *et al.* 2017. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of in vitro and in vivo tests. *Acta Amazonica* 47: 331-340.

CONITEC. 2018. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias ao SUS, Ministério da Saúde, Brasil. Miltefosina para o Tratamento da Leishmaniose Tegumentar, Relatório de recomendação (technical recommendation report) nº 365. (https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/relatorios/2018/relatorio_miltefosina_leishmaniosetegumentar.pdf). Accessed on 08 Jul 2023.

Dias, C.N.; Nunes, T.A.L.; Sousa, J.M.S.; Costa, L.H.; Rodrigues, R.R.L.; Araújo, A.J.; *et al.* 2020. Methyl gallate: selective antileishmania activity correlates with host-cell directed effects. *Chemico-Biological Interactions* 320: 1-8.

Fonseca-Silva F.; Inacio, J.D.F.; Canto-Cavalheiro, M.M.; Almeida-Amaral E.E. 2013. Reactive Oxygen Species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigote. *Journal of Natural Products* 76: 1505-1508.

Fonseca-Silva F.; Inacio, J.D.F.; Canto-Cavalheiro, M.M.; Almeida-Amaral E.E. 2011. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 6:1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>

Garzon, L.R.; Fracasso, M.; Viana, A.R.; Giacometti, M.; Samoel, V.G.; Souza, L.; *et al.* 2021. In vitro activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines. *Brazilian Journal of Development* 7: 82837-82855.

Ghorbanzadeh, M.; Farhadian, N.; Golmohammadzadeh, S.; Karimi, M.; Ebrahimi, M. 2019. Formulation, clinical and histopathological assessment of microemulsion based hydrogel for UV protection of skin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 179: 393-404.

Honary, S.; Zahir, F. 2013. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2: 265-273.

Jensen, B.B. 2020. Avaliação da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae) em estudos pré-clínicos da leishmaniose cutânea. Doctoral thesis. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Brazil, 148p. (<https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7969>).

Jensen, B.B.; Comandolli-Wyrepkowski, C.D.; Barros, A.M.C.; Soares, F.V.; Grafova, I.; Grafov, A.; *et al.* 2017. Evaluation of the in vitro antileishmania activity of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae). *Acta Brasiliensis* 1: 33-37.

Kaur, A.; Kaur, P.K.; Singh, S.; Singh, I.P. 2014. Antileishmanial compounds from *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Biosciences: Zeitschrift für Naturforschung C (ZNC)* 69:110 – 116.

Liang, H.; Huang, Q.; Zou, L.; Wei, P.; Lu, J.; Zhang, Y. 2023. Methyl gallate: Review of pharmacological activity. *Pharmacological Research* 194: 1-13.

Melo, D.S.; Nery Neto, J.A.; Santos, M.S.; Pimentel, V.D.; Carvalho, R.C.; Sousa, V.C.; *et al.* 2022. Isopropyl gallate, a gallic acid derivative: In silico and in vitro investigation of its effects on *Leishmania major*. *Pharmaceutics* 14: 2701. doi: 10.3390/pharmaceutics14122701.

Melo, M.M.; Verçosa Júnior, D.; Pinto, M.C.; Silveira, J.B.; Ferraz, V.; Ecco, R.; *et al.* 2008. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 631-640.

Moraes, L.S.; Donza, M.; Rodrigues, A.P.; Silva, B.; Brasil, D.; Zoghbi, M.; *et al.* 2015. Leishmanicidal activity of (+)-phyllanthidine and the phytochemical profile of *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae). *Molecules* 20: 22157-22169.

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<https://www.R-project.org/>). Accessed on 05 Aug 2021.

Robledo, S.M.; Carrillo, L.M.; Daza, A.; Restrepo, A.; Muñoz, D.; Tobón, J.; *et al.* 2012. Cutaneous Leishmaniasis in the Dorsal Skin of Hamsters: a Useful Model for the Screening of Antileishmanial Drugs. *Journal of Visualized Experiments* 62: 1-8. DOI: 10.3791/3533

Roma, E.H.; Macedo, J.P.; Goes, G.R.; Gonçalves, J.L.; Castro, W.; Cisalino, D.; *et al.* 2016. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasites & Vectors* 9: 1-13.

Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Glucantime®: Antimoniato de Meglunima. São Paulo: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Farm. Resp.: Silvia Regina Brollo - CRF - SP nº 9.815. Bula de remédio. 2011. Available at: <https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/glucantime.pdf>.

Santiago, A.S.; Pita, S.S.R.; Guimarães, E.T. 2021. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. *Research, Society and Development* 10: e29510716543.

Souza, T.S.; Figueira, L.P.; Costa, S.C.G.; Santos, T.V.M. 2021. Leishmaniose cutânea na região amazônica: panorama epidemiológico e desafios para o controle. *Revista de Saúde Pública da Amazônia* 10: 45-56.

Tartaro, G.; Mateos, H.; Schirone, D.; Angélico, R.; Palazzo, G. 2020. Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review. *Nanomateriais* 10: 1657. DOI: 10.3390/nano10091657

Thrall, M.A.; Weiser, G.; Allison, R.W.; Campbell, T.W. 2015. Hematologia e Bioquímica. Clínica Veterinária. 2nd ed. Editora Guanabara Koogan, São Paulo, 688p.

WHO. 2021. World Health Organization. Leishmaniasis. Number of cases reported by country. (<https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>). Accessed on 05 Aug 2021.

Yang, Z.; Mosser, D.M.; Zhang, X. 2007. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *Journal of Immunology* 178: 1077-1085.

8 DISCUSSÃO GERAL

As doenças tropicais negligenciadas necessitam de maior atenção quanto ao desenvolvimento de recursos terapêuticos e dentre essas doenças pode-se destacar a leishmaniose tegumentar que apesar de apresentar medicamentos disponíveis, as mesmas apresentam desvantagens como tratamento prolongado, invasivo, que pode vir necessitar de hospitalização, bem como diversas reações adversas e possível resistência parasitária (BRASIL, 2017; DNDi, 2019; FILHO *et al.*, 2020). Assim, entende-se que há uma urgência no desenvolvimento de novos medicamentos que possam substituir as atuais medicações ou atuar como coadjuvante, sendo este um dos estímulos para as pesquisas voltadas para essa área (LEITE *et al.*, 2023).

Nesse contexto, são necessários esforços para encontrar novos princípios ativos e os produtos naturais tem sido uma das principais fontes, pois possuem uma diversidade de moléculas que podem ser biologicamente ativas, dentre os produtos naturais, destacam-se as plantas que possuem diversos metabólitos secundários que podem ser amplamente estudados em ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* visando elucidar o potencial para a atividade antileishmania (VARRICCHIO *et al.*, 2019; LEITE *et al.*, 2023).

Nesse contexto, verificou-se por meio da literatura que o extrato (COMANDOLLI-WYREPKOWSKI *et al.*, 2017) e a fração diclorometano obtido por meio da *L. ferrea* (JENSEN, 2020) apresentaram potencial para o tratamento da leishmaniose cutânea experimental em *Mesocricetus auratus*, além disso, outros estudos isolaram e determinaram que a molécula galato de metila isolada da *L. ferrea* (JENSEN, 2020; DIAS *et al.*, 2020) também apresentou atividade antileishmania em estudos *in vitro*, assim esse estudo teve como proposta levar adiante esses estudos e investigar essas substâncias (extrato e fração diclorometano de *L. ferrea* e galato de metila) contra a espécie *L. (L.) amazonensis* que apresenta circulação na região Amazônica.

Por meio dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se inferir que o extrato de *L. ferrea*, a fração diclorometano de *L. ferrea* e o galato de metila mostraram-se promissores nos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, além disso, o estudo demonstrou que há potencial na utilização dessas substâncias utilizando uma formulação tópica inovadora, que pode viabilizar maior eficiência e segurança.

No segundo capítulo desse estudo apresentou-se o potencial do extrato e da fração diclorometano obtidos da *L. ferrea*, podendo enfatizar que a fração apresentou maior eficácia na inibição da infecção *in vitro* de células RAW por *L. (L.) amazonensis*, além disso, comprovamos que essas substâncias não apresentaram citotoxicidade *in vitro*. Com base nesses resultados, foi realizada a produção de uma formulação farmacêutica que foi caracterizada como uma microemulsão, essa formulação apresentou-se estável tanto na presença do extrato quanto na presença da fração diclorometano, permitindo assim o desenvolvimento de ensaios biológicos *in vivo* com *Mesocricetus auratus*.

Os ensaios *in vivo* dessas formulações foram realizados por meio de protocolos que visavam investigar a atividade da microemulsão de forma isolada ou combinada com o tratamento padrão (Glucantime®) para a leishmaniose cutânea, desse modo foi possível determinar que o protocolo que consista na combinação de Glucantime® com a microemulsão contendo a fração diclorometano obtida a partir de *L. ferrea* foi mais efetivo em controlar o aumento das lesões produzidas por *L. (L.) amazonensis* em hamsters dourados, com consequente redução da carga parasitária.

Apesar do hamster dourado ser tradicionalmente utilizado como modelo experimental para estudos com diferentes espécies de *Leishmania*, é sabido que há diversas desvantagens na utilização dos mesmos, como a alta suscetibilidade a infecção por *L. (L.) amazonensis*, dificultando assim o controle das lesões e a obtenção de cura parasitológica, ainda, a escolha do sítio de inoculação (focinho e pata) possui desvantagens como aferição de tamanho da lesão, dificuldade na mobilidade, alimentação e respiração dos animais, com consequente impossibilidade de padronização nos resultados e fotografias, desse modo, a continuidade desses estudos deve ser realizada averiguando a possibilidade de utilização de outros modelos experimentais (ROBLEDO *et al.*, 2012).

Seguindo com essa linha de investigação, o terceiro capítulo desse estudo visou investigar o potencial do galato de metila em ensaios biológicos *in vivo* com *Mesocricetus auratus* infectado com *L. (L.) amazonensis*. Essa investigação se deu após os resultados obtidos por Jensen (2020) e Dias *et al.* (2020) que demonstraram que o galato de metila é uma substância presente na *L. ferrea* e que a mesma possui atividade promissora *in vitro* contra espécies de *Leishmania*.

Os resultados obtidos a partir dessa investigação, permite inferir que a formulação de microemulsão com galato de metila apresenta estabilidade e o uso combinado com Glucantime® por via intralesional foi eficaz no controle da evolução das lesões leishmanióticas em hamsters dourados infectados com *L. (L.) amazonensis*, bem como na redução da carga parasitária.

A observação da atividade sinérgica nos permite sugerir que os estudos futuros sejam realizados visando à utilização do galato de metila como um adjuvante, visto que atualmente o Ministério da Saúde do Brasil já possui indicações de medicamentos que podem ser administrados concomitantemente ao Glucantime®, sendo esta a situação da pentoxifilina para o tratamento da LC (BRASIL, 2017). Ainda cabe ressaltar que a utilização do metil galato na forma tópica pode proporcionar diversos benefícios, como a utilização de uma medicação indolor, que poderá ser utilizada fora do ambiente hospitalar, potencializando os tratamentos tradicionais e reduzindo o tempo de tratamento da doença.

Esses resultados tornam-se relevantes visto que a escolha da formulação é um ponto crucial para o desenvolvimento de novos fármacos, pois segundo o DNDi (2019) a evasão de pacientes e o abandono do tratamento para a leishmaniose cutânea se dá especialmente porque os tratamentos atuais são dolorosos, prolongados e não condizem com a realidade dos pacientes, assim, a microemulsão se torna uma alternativa segura, eficaz e não invasiva (BASTOS *et al.*, 2016a).

A literatura demonstra que alguns estudos já estão sendo desenvolvidos visando explorar essas propriedades e benefícios das microemulsões, alguns autores como Oliveira (2012), Veerareddy, Vobalaboina e Nahid, (2004) e Jensen (2020) já investigaram a utilização de microemulsões como carreadores de substâncias como fluconazol, substância derivada de *Piper nigrum* (pimentapreta) e a fração diclorometano de *L. ferrea*, respectivamente, para o tratamento de leishmaniose cutânea; demonstrando que é essencial que novos estudos possam dar continuidade na investigação de novos princípios ativos e a sua utilização na forma microemulsionada.

Assim, considerando os resultados obtidos neste estudo apresentamos um protocolo de ensaio clínico toxicológico randomizado utilizando a microemulsão contendo galato de metila (ANEXO I), visando investigar a segurança toxicológica. A proposta foi protocolada no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) tendo

como intenção a participação de indivíduos saudáveis visando identificar possíveis efeitos tóxicos advindos da microemulsão contendo galato de metila. Espera-se que com a realização desse ensaio clínico seja possível dar continuidade na investigação dessa substância com o intuito de avaliar a eficácia no tratamento da leishmaniose tegumentar, seja utilizando a microemulsão de forma isolada ou em combinação com o Glucantime®.

Por fim, pode-se inferir que a realização e a continuidade das pesquisas com produtos naturais para o tratamento da leishmaniose cutânea são essenciais para a descoberta de novas alternativas terapêuticas, seja por meio da descoberta de novos princípios ativos que possam substituir as medicações atuais ou que possam atuar de forma concomitante, visto que essa doença apresenta graves consequências físicas, psicológicas e sociais para os pacientes, visando assim melhorar a qualidade de vida dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual para notificação de eventos adversos e monitoramento de segurança em ensaios clínicos gerência Geral de Medicamentos**. GGMed Coordenação de Pesquisa Clínica em Medicamentos e Produtos Biológicos – COPEC. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/notivisa/manual/ea_medicamento_profissional.pdf. 2016.
- BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160139>.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 861-876, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20170055>.
- CARPENTER, J. W.; MARION, C. J. **Exotic Animal Formulary**. 5º ed. Elsevier Inc. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual da Leishmaniose**. 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 30 jul. 2021.
- COMENTO. Comento Pesquisa de Mercado. **Calculadora digital de amostra**. 2022. Disponível em: <https://comentto.com/calculadora-amostal/>. Acesso em: 22 jul. 2022.

GARZON, L. R., *et al.* *In vitro* activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 82837- 82855, 2021. doi: 10.34117/bjdv7n8-475.

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.

JENSEN, B. Z. **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.

NEVES, L. O., *et al.* Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol.**, v. 86, n. 6, p. 1092-101. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/BhTgxxg6L97vmnRSn36Wd9Mz/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 22 jul. 2022;

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. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.0.

IBGE. Índice Brasileiro de Geografia e Estatística. **População Rio Preto da Eva.** 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/rio-preto-da-eva/panorama>. Acesso em: 22 jul. 2022.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas.** República Dominicana: OPAS; 2005.

VASCONCELOS, B. C. E. **O cegamento na pesquisa científica.** Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, v. 16, n. 1. 2016. Disponível em: http://revodontobvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-52102016000100001. Acesso em: 22 jul. 2022.

9 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho trouxeram contribuições para o desenvolvimento de medicamentos complementares para a leishmaniose cutânea, permitindo a conclusão dos seguintes aspectos:

- Efeitos adversos, administração invasiva e extensos períodos de aplicação são questões frequentemente associadas aos medicamentos atualmente disponíveis. Esses desafios podem levar ao abandono do tratamento, favorecer o desenvolvimento de resistência por parte do parasito e diminuir a eficácia da terapia;
- Novos compostos bioativos estão sendo testados em ensaios clínicos, para que novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos sejam desenvolvidos;
- O extrato e a fração de *L. ferrea* não apresentaram citotoxicidade *in vitro*;
- A fração *L. ferrea* apresentou eficácia na inibição da infecção de células RAW 264.7 por formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
- A combinação de Glucantime® com a microemulsão contendo fração DCM de *L. ferrea* foi mais efetiva em limitar o aumento das lesões produzidas por *L. (L.) amazonensis* em hamsters dourados e reduzir a carga parasitária quando comparado aos demais tratamentos testados, demonstrando ser viável a combinação terapêutica;
- A microemulsão com galato de metila apresenta estabilidade e eficácia no controle da evolução das lesões leishmanióticas e carga parasitária em hamsters dourados infectados com *L. (L.) amazonensis* quando comparado aos demais grupos de tratamento.
- O uso de terapias combinadas, que envolvem a administração de diferentes medicamentos em conjunto, poderá ser explorada como uma estratégia para melhorar a eficácia do tratamento e reduzir o desenvolvimento de resistência parasitária.
- É essencial prosseguir com este estudo, dado que as microemulsões contendo galato de metila e a fração de DCM de *Libidibia ferrea* demonstraram resultados excelentes tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo*.

10 PERSPECTIVAS

Os resultados neste trabalho demonstraram que a utilização da fração DCM de *L. ferrea* e galato de metila na forma microemulsionada mostraram potencial para ser incluída na terapia da leishmaniose cutânea, assim sugere-se que seja realizado o prosseguimento do estudo com as seguintes etapas:

- Investigação da atividade antileishmania do galato de metila em outras espécies de *Leishmania* sp. responsáveis pela leishmaniose cutânea;
- Estudo do perfil da permeação cutânea das formulações farmacêuticas;
- Avaliação dos efeitos toxicológicos das formulações farmacêuticas em animais de experimentação;
- Realização do ensaio clínico toxicológico de fase I utilizando uma microemulsão contendo galato de metila.

REFERÊNCIAS

ABAMOR, E. S.; ALLAHVERDIYEV, A. M. A nanotechnology based new approach for chemotherapy of Cutaneous Leishmaniasis: TIO2AG nanoparticles - Nigella sativa oil combinations. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 150–163, 2016. doi: 10.1016/j.exppara.2016.04.008.

AGUIAR, M. G.; PEREIRA, A. M.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (L.) amazonensis*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v. 11, p. 4699-704, 2010. doi: 10.1128/AAC.00809-10.

ALAVI-NAINI, R. *et al.* Topical treatment modalities for old world cutaneous leishmaniasis: a review. **Prague Medical Report**, v.113, n. 2, p. 105-18, 2012. doi: 10.14712/23362936.2015.26.

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n.3, p. 497-506, 2011. doi: S0365-05962011000300012.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J., *et al.* Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombiana. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, n. 3, p. 853-882, set./dez. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v10n3/19303.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2021.

AMBIOSOME. **ANFOTERICINA B**. São Paulo: União Química Farmacêutica Nacional S/A Farm. Resp.: Florentino Jesus Krencas CRF-SP nº 49136. **Bula de remédio**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9032052015&pIdAnexo=2892182. Acesso em: 05 jul. 2021.

BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Review article cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 18, p. 42-48, 2008. Disponível em: <http://www.jpap.com.pk/index.php/jpap/article/viewFile/564/537>. Acesso em: 05 jul. 2021.

BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A., ARANHA, M. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004. doi: 10.1590/S1415-790X2004000300010.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 2072-2104, 2016a. doi: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160139>.

BASTOS, S. R. L., *et al.* Emulsão e microemulsão: novos sistemas de liberação controlada de fármacos no tratamento veterinário. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.10, n.1-4, p.25-33, 2016b.

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

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 27, p. 916–920, 1985. doi: 10.1128/aac.27.6.916.

BLUM, J.A.; HATZ, C.F. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of travel Medicine**, v.16, n.2, p.123-131, 2009. doi: 10.1111/j.1708-8305.2008.00286.x.

BOISSEAU, P.; LOUBATON, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine Nanomédecine et nanotechnologies pour la médecine. **Comptes Rendus de**

l'Académie des Sciences, v. 12, n. 7, p. 620-636, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual da Leishmaniose**. 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 30 jul. 2021.

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. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1 ed. Brasília. 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerall1edicao.pdf. Acesso em: 22 jul. 2021.

BRILHANTE, A.; SÁBIO, P.; GALATI, E. A New Species of Sand Fly, *Psathyromyia elizabethdorvalae* sp. n. (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), From Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n.1, p. 76-81, 2017. doi: 10.1093/jme/tjw150.

CARTER, N.S. *et al.* Natural products that target the arginase in *Leishmania* parasites hold therapeutic promise. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 267, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020267>.

CARVALHO, S. H., *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 2019. doi: 10.1111/tmi.13210.

CASTELLUCCI, L., *et al.* IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p.519-527. 2006.

CASTRO, H. G. de, *et al.* **Contribuição ao estudo das plantas medicinais. Metabólitos secundários.** 2 ed. – Visconde do Rio Branco. 2004.

CAVALHEIRO, M.C. *et al.* 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. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400014>.

CHAKRAVARTY J.; SUNDAR S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167-176. 2010.

CHAGAS, A. F. D. S. **Estudo pré-clínico com complexos e nanopartículas metálicas para o tratamento da leishmaniose cutânea.** 2021. Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2021.

CHASE, M. *et al.* 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.

COLET, Cristiane F. *et al.* Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 331-339, Jun. 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_027.

COMANDOLLI-WYREPKOWSKI, C.D. *et al.* Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. **Acta Amazonica**, v. 47, p. 331-340, 2017. doi: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201700871>.

CONCEIÇÃO-SILVA, F. **Leishmanioses do continente americano.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

CRAIG, E. *et al.* Structurally optimized analogs of the retrograde trafficking inhibitor Retro-2cycl limit Leishmania infections. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p e0005556. 2017. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005556>.

DIAS, C.N. *et al.* Methyl gallate: selective 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. **Best Science for the Most Neglected**. 2018. Disponível em: www.dndi.org/. Acesso em: 05 jul. 2021.

DNDi. **Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses**. 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf.

EL MAGHRABY, G. M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1, p. 285-292, 2008. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.12.022.

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. doi: 10.1186/s12906-019-2454-3.

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. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150727>.

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. doi: <http://dx.doi.org/10.5897/JMPR2014.5706>.

FIGUEIRA, L. P., *et al.* Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, p. 512-514, 2008. doi: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500016>.

FILHO, R. A. S. Tratamento das lesões causadas pela leishmaniose tegumentar. **Revista Liberum Acessum**, v. 3, n. 1, p. 29-36. 2020.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Nova espécie de flebotomíneo é descoberta em cavernas por pesquisadores do IOC**. 2015. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/nova-esp%C3%A9cie-de-flebotom%C3%ADneo-%C3%A9-descoberta-em-cavernas-por-pesquisadores-do-ioc>. Acesso em: 10 jan. 2022.

FONSECA, B. da. *et al.* Desenvolvimento de um medicamento brasileiro nanoencapsulado para o tratamento da esquistossomose. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 1, n. 4, p. 85-91, 2013. doi: 10.3395/vd.v1i4.111pt

FREITAS, C.C. *et al.* Biological Activities of *Libidibia* (*Caesalpinia*) *ferrea* var. *parvifolia* (Mart.exTul.) L. P. Queiroz Pod Preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012. doi: 10.1155/2012/514134.

FRÉZARD, F. SCHETTINI, D. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio, **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005. doi: 10.1590/S0100-40422005000300025.

GARZON, L. R., *et al.* *In vitro* activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 82837- 82855, 2021. doi: 10.34117/bjdv7n8-475.

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.

HARDY, K. *et al.* Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. **Naturwissenschaften**, v. 99, p. 617-626, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0942-0>.

HO, H. O; HSIAO, C. C.; SHEU, M. T. *et al.* Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactante for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 2, p. 138-143, 1996. doi: 10.1021/js950352h.

HOLANDA, V. N., *et al.* Challenges and perspectives in the treatment of tegumentary leishmaniosis: Review. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 6, n. 17, p. 140–157, 2018. doi: 10.1590/s1678-9946201860003.

IGNOATO, M. C. **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, 2012.

JAIN, G.K. *et al.* Microscopic and spectroscopic evaluation of novel PLGA-chitosan Nanoplexes as na ocular delivery system. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, vol. 82, n.2, p. 397-403, 2011. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.09.010.

JENSEN, B. B. **Atividade antileishmania da fração diclorometano de *Libidibia ferrea* (Fabales: Fabaceae).** 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2017.

JENSEN, B. Z. **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.

KAUR, A. *et al.* Compostos antileishmania da *Moringa oleifera* Lam. Z. Naturforsch. **Journal of Bioscience**, v. 69, p. 110-116, 2014.

KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.123, p.369-385, 2006. doi: 10.1016/j.cis.2006.05.014.

LAINSON, R. Espécies neotropicais 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.

LEITE, A. M. C., *et al.* O uso de plantas medicinais associadas ao tratamento de leishmaniose em pacientes atendidos na regional de saúde do município de Pinheiro – MA. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 5, e18612541681, 2023.

LIMA, H.C. *et al.* **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.

LIMA, R. F. de; LIMA, R. A. Levantamento bibliográfico do gênero *Piper* (piperaceae) para uso medicinal. **Revista EDUCamazônia**, v. XIII, n. 2, p. 155-170. 2021.

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

MAIA, M. S., *et al.* Virtual screening and the *in vitro* assessment of the antileishmanial activity of lignans. **Molecules**, v. 25, p. 2281, 2020. doi: 10.3390/moléculas25102281.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 107, p. 7-14. 2014. doi:10.1093/qjmed/hct116.

MENEGUETTI, D. U. O., *et al.* Plantas da Amazônia brasileira com potencial leishmanicida *in vitro*. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 44, n. 4, p. 359-374, 2015. doi: <https://doi.org/10.5216/rpt.v44i4.39236>.

MENEZES, J. P. B., *et al.* Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2015. doi: 10.1155/2015/815023.

MESQUITA, J. T. **Terapias alternativas e combinadas para o tratamento da Leishmaniose Cutânea Americana: uma abordagem experimental *in vitro* e *in vivo***. 2018. Tese (Doutor em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2018/ses-37614/ses-37614-6995.pdf>. Acesso em: 4 jan. 2022.

MORAES, L.S. *et al.* Leishmanicidal Activity of (+)-Phyllanthidine and the Phytochemical Profile of *Margaritaria nobilis* (Phyllanthaceae). **Molecules**, v. 20, p. 22157-22169, 2015.

MOREIRA, S. C. S. *et al.* Colorimetria dos metabólitos secundários de três tinturas diferentes do *Curcuma longa* L. Adjuvante do tratamento do diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 10, p.100818-100832, 2021. doi: 10.34117/bjdv7n10-409.

MOREIRA, V. R. **Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) causa danos ao DNA por estresse oxidativo e induz superexpressão de genes envolvidos na defesa antioxidante e reparo do DNA**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Maranhão, 2017.

NASSIF, P. W. *et al.* Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. **Parasitology**, v. 144, p. 995-1004, 2017. doi: 10.1017/S0031182017000385.

NEVES, D. P. **Parasitologia dinâmica**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

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. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000600005>.

OLIVEIRA, A. G. de, *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100023>.

OLIVEIRA, M. B. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo fluconazol para o tratamento da leishmaniose tegumentar**. 2012. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2012.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C. 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56832>. Acesso em: 10 jan. 2023.

PEDROSO, R. do S.; ANDRADE, J.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, p. e310218, 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>.

PELAZ, B. *et al.* Diverse applications of nanomedicine. **ACS Nano**, v. 11, p. 2313–2381, 2017. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>.

PIRES, E. A. M. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para a avaliação da qualidade de matérias-primas e microemulsões com atividade leishmanicida**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

RIBEIRO, M. A. *et al.* Novel targeting using nanoparticles: an approach to the development of an effective anti-leishmanial drug-delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 877–890, 2014. <https://dx.doi.org/10.2147%2FIJN.S55678>.

REIS, L. *et al.* Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Caderno de Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 1-14, 2019. doi: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00047018>.

REIS, L. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos casos de Leishmaniose visceral no município de Sobral, Ceará, no período de 2013 a 2017**. 2018. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Teresina, 2018.

ROBLEDO, S.M. *et al.* Leishmaniose cutânea na pele do dorso de hamster: um modelo útil para o rastreamento de drogas leishmanicidas. **Journal of Visualized Experiments**, v. 62, p. 1-8, 2012.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111. 2017. doi: [10.1093/intimm/dxx07](https://doi.org/10.1093/intimm/dxx07).

SACHDEVA, H. *Tinospora cordifolia* as a protective and immunomodulatory agent in combination with cisplatin against murine visceral leishmaniasis. **Exp. Parasitol.** v. 137, p. 53–65, 2014. doi: [10.1016/j.exppara.2013.12.006](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.12.006).

SACKS, D. L.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews of Immunology**, v. 2, p. 845-857. 2002.

SAKYI, P.O. *et al.* The search for putative hits in combating leishmaniasis: the contributions of natural products over the last decade. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, n. 5, p. 1-56, 2021. doi: [10.1007/s13659-021-00311-2](https://doi.org/10.1007/s13659-021-00311-2).

SANCHEZ, C.; SHEA, K. J.; KITAGAWA, S.; Recent progress in hybrid materials science. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 471-472, 2011. doi: 10.1039/c1cs90001c.

SANTOS, F. R. A. **Emulsões múltiplas: formulação, caracterização, estabilidade e aplicações**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

SANTOS, I. *et al.* Leishmanicidal and immunomodulatory activities of the palladacycle complex DPPE 1.1, a potential candidate for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-16, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01427>.

SAUDAGAR, P. *et al.* Carbon nanotube based betulin formulation shows better efficacy against *Leishmania* parasite. **Parasitology International**, v. 63, n. 6, p. 772–776, 2014. doi: 10.1016/j.parint.2014.07.008.

SCHMIDT, T. J. *et al.* The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - Part I. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p. 2128–2175, 2012. doi: 10.2174/092986712800229023.

SHIO, M. *et al.* Drug delivery by tattooing to treat cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4156, p. 1-7, 2014. doi:10.1038/srep04156.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurol.**, v. 61, p. 216-220, 2004. doi: 10.1016/j.surneu.2003.09.036.

SILVA, G.C. **Estratégias em reposicionamento de fármacos**. 2015. Monografia (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.

SILVA-JUNIOR, I. A. S. **Avaliação da metaciclogênese *in vitro* de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis***. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

SILVA, P. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de riparinas I, II e III sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis***. 2018. Dissertação (mestrado Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SILVA, T. G. *et al.* Medicamentos fitoterápicos: uma nova alternativa no tratamento das doenças negligenciadas. **Open Journal of Aging Research**, v. 1, n. 5, p. 1, 2018.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Leishmaniose Tegumentar**. 2019. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan.net/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 30 jul. 2021.

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. doi: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000400008>.

SOUSA, N. *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose visceral em Sobral-CE de 2011 a 2015. **SANARE**, Sobral - v.17, n. 1, p. 51-57, 2018.

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.

STERVENDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 82, p. 2-10, 2017. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2376078/>. Acesso em: 08 jun. 2021.

TELES, G.B.C. *et al.* Phebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of american cutaneous leishmaniasis human cases along the brazilian with Peru and Bolívia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1678-8060. 2016. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762016000700423&script=sci_abstract. Acesso em: 05 jul. 2021.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1 ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ. Editora Rio de Janeiro. 64p. 2013.

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421-428, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n4/v80n4a15>. Acesso em: 20 jun. 2021.

VARRICCHIO, M. C. B. N. *et al.* Saúde Ambiental: Leishmaniose, Produtos Naturais, Biotecnologia Vegetal e Desenvolvimento Sustentável. **Intervozes: trabalho, saúde, cultura**. Petrópolis, v.4, n. 1, p 56-68, mai. 2019.

VAN GRIENSVEN, J., *et al.* Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 184-94, 2010. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70011-6.

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.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis**. 2022. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>. Acesso em: 05 ago. 2023.

ZHU, W. *et al.* Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 184-190, 2008. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.04.008.

ANEXO I – PROPOSTA DE ENSAIO CLÍNICO

Ensaio clínico toxicológico de fase I utilizando uma microemulsão contendo 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila: uma proposta de protocolo

Thiago de Jesus Bacha^{1,2}, Bruno Bezerra Jensen², Daniele de Carvalho Rodrigues¹,
Messe Elmer Torres da Silva², Amanda Araújo, Katia Solange Cardoso Rodrigues
dos Santos Geraldí¹, Francimeire Gomes Pinheiro², Maria da Paz Lima², Antonia
Maria Ramos Franco²

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

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

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que apresenta diferentes manifestações clínicas, diversos estudos buscam a descoberta de novos princípios ativos, podendo ser citado a molécula 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila que demonstra potencial antileishmania, entretanto, é essencial realizar estudos toxicológicos visando investigar a segurança da utilização dessas moléculas para o tratamento de leishmaniose cutânea. Desse modo, o nosso objetivo é propor um protocolo de ensaio clínico toxicológico randomizado utilizando uma microemulsão contendo 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila, visando investigar a segurança toxicológica. A proposta consiste no estudo com 70 voluntários sadios que residem no município Rio Preto da Eva, localizado no Amazonas, estes serão randomizados em dois grupos que consistirão na aplicação por via tópica da microemulsão contendo 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila ou microemulsão placebo, ressaltando a utilização do procedimento duplo-cego. Espera-se que com a realização desse protocolo seja possível identificar possíveis efeitos adversos advindos dos tratamentos investigados.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença ocasionada por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos aos hospedeiros por meio de flebotomíneos, tendo como principal característica o desenvolvimento de diferentes manifestações clínicas, dificultando o diagnóstico e tratamento do paciente (BLANCO, 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde possui um arsenal e esquema terapêutico padronizado para o tratamento da LC, consistindo na utilização de antimoniato de meglumina (Glucantime®), isetionato de pentamidina (Pentacarinat®) ou anfotericina B (Ambiosome®) (BRASIL, 2017). No entanto, no decorrer dos anos tem sido observada a ineficácia dos tratamentos disponíveis, visto que há relatos de resistência parasitária, necessidade de maior tempo de tratamento e toxicidade para o paciente (BASTOS *et al.*, 2016).

Assim, diversas pesquisas buscam novos princípios ativos que possuam atividade biológica visando o combate desses parasitas; e recebem destaque moléculas isoladas de produtos naturais, principalmente de vegetais, pois estes possuem alta diversidade química de metabólitos secundários, sendo fontes potenciais de compostos biologicamente ativos (GARZON *et al.*, 2021).

Nesse contexto, diversas moléculas extraídas de espécies vegetais têm sido estudadas visando elucidar as atividades biológicas das mesmas, podendo assim ser citado o 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila, também denominado como galato de metila, que foi isolado por Silva *et al.* (2013) e Jensen (2020) da espécie vegetal *Libidibia ferrea*. Ademais, Jensen (2020) demonstrou que o galato de metila apresenta baixa citotoxicidade em macrófagos de linhagem J774 e macrófagos peritoneais murinos, além de atividade antileishmania em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

É importante ressaltar que além da descoberta de novos princípios ativos é necessário também realizar o desenvolvimento de formulações que proporcionem um tratamento eficaz, portanto, a utilização de formulações microemulsionadas podem ser interessantes, visto que estas proporcionam diferentes vantagens como a otimização da permeação e liberação de moléculas bioativas (GHORBANZADEH *et al.*, 2019).

Diante desses apontamentos, desenvolvemos uma proposta de protocolo de ensaio clínico toxicológico de fase I utilizando uma microemulsão contendo 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila, visando investigar, de modo inicial, o potencial toxicológico dessa molécula.

METODOLOGIA

Este estudo trata-se de um ensaio clínico de fase I, fechado e controlado para avaliação de toxicológica. Este ensaio clínico será conduzido respeitando as normas e diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos em consonância com a Resolução nº 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde e o guia de Boas Práticas Clínicas (BPC) no Documento das Américas e no Manual de Boas Práticas Clínicas da Conferência Internacional de Harmonização.

Ensaios clínicos de fase I objetivam avaliar a segurança e toxicologia de um novo fármaco, geralmente em indivíduos saudáveis com um pequeno número de participantes (20 a 100 indivíduos) (OPAS, 2005).

Desenvolvimento das formulações microemulsionadas

As formulações das microemulsões (MMG) serão desenvolvidas à base de álcool isopropílico, Tween® 20, água destilada, ácido oleico e 3,4,5- trihidroxibenzoato de metila a 2% isolados previamente de *Libidia ferrea* como descrito por Jensen (2020). Os reagentes serão agitados por cerca de 2 minutos, até a obtenção de uma solução homogênea, transparente e monofásica. Duas microemulsões serão preparadas, sendo uma microemulsão com 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila a 2% (MMG) e uma microemulsão placebo sem 3,4,5-trihidroxibenzoato de metila a 2% (MPLA).

Local da pesquisa

O estudo será realizado na Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão e na Unidade Hospitalar Thomé de Medeiros Raposo localizada no município de Rio Preto da Eva, Amazonas e os exames hematológicos e bioquímicos serão realizados no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA).

População de estudo

Participarão do ensaio clínico de fase I um total de 70 voluntários de ambos os sexos, considerados saudáveis após avaliação clínica e laboratorial e que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO 2). Nesta etapa serão avaliadas a segurança e a ocorrência de efeitos adversos associados ao novo fármaco, se houver.

Critérios de inclusão e exclusão

- **Critérios de inclusão:** indivíduos com idade entre 18 e 70 anos, considerados sadios após avaliação clínica e laboratorial iniciais, que não apresentam histórico médico de LV ou LT, que concordarem e assinarem de forma voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou apresentarem comprometimento em seguir o protocolo experimental;
- **Critérios de exclusão:** indivíduos que apresentarem alterações na avaliação clínica e/ou laboratorial pré-tratamento, possuírem alguma disfunção hepática, renal, diabetes ou alterações cardíacas, que apresentarem alergia ao tratamento experimental, grávidas e lactantes, indivíduos alcoólatras, fumantes ou em uso de alguma medicação, pacientes portadores de doenças crônicas e/ou doenças infectocontagiosas (tuberculose, hanseníase, HIV/AIDS, Leishmaniose Visceral ou LTA, entre outros), pacientes com histórico médico de LV ou LT, que apresentarem incapacidade ou recusa em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e/ou impossibilidade de cumprir o protocolo experimental.

Avaliação clínica e laboratorial

Os voluntários serão avaliados através da história clínica, exames hematológicos e bioquímicos antes do início do tratamento. O tratamento experimental terá duração de quatro semanas. Semanalmente, em dias pré-determinados em agenda de acompanhamento, os voluntários serão avaliados individualmente e responderão a um questionário (ANEXO 3) para registro de efeitos adversos. Após o término da utilização das formulações tópicas os pacientes serão submetidos a exames laboratoriais finais. Para isso, ao todo serão realizadas duas coletas de sangue venoso ou arterial periférico, sendo a primeira coleta de 10 mL de sangue periférico, realizada antes do início do tratamento, a segunda coleta após o término do tratamento. Os exames laboratoriais que serão realizados antes e após o período de tratamento são:

- Hemograma, incluindo eritrograma e plaquetograma;
- Dosagem sérica de glicose, potássio, sódio, cloreto, amilase, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas e fosfatase alcalina e;
- Para mulheres em idade fértil também será solicitado β – HCG (gonadotrofina coriônica beta).

Condução do estudo

Durante o período de tratamento experimental os voluntários serão acompanhados individualmente por uma ficha clínica para registro da história clínica, agenda de acompanhamento, dias de realização de exames e os resultados dos exames laboratoriais. Serão selecionados 70 (setenta) voluntários. Estes voluntários serão randomizados em dois grupos na proporção 1:1, sendo ele:

- **Grupo 1 (grupo experimental):** indivíduos tratados diariamente, no mesmo horário, com 0,05 mL da microemulsão incorporada com 2% de 3,4,5 trihidroxibenzoato de metila, por um período de 30 dias, na face posterior do braço esquerdo ou direito;
- **Grupo 2 (grupo placebo):** indivíduos tratados diariamente, no mesmo horário com 0,05 mL da microemulsão placebo (sem 3,4,5 trihidroxibenzoato de metila), na face posterior do braço esquerdo ou direito.

Os dados coletados antes do início do tratamento experimental nos dois grupos também serão utilizados como controle, pois serão comparados com os dados obtidos durante e após o tratamento. Semanalmente, nos dias fixados na agenda de acompanhamento, será aplicado um questionário (ANEXO 2) para investigação de eventos adversos. Serão registrados quaisquer eventos adversos, sendo eles dermatológicos ou não.

Definições adotadas

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), evento adverso é qualquer ocorrência médica adversa apresentada pelo paciente ou participante de um ensaio clínico de administração de um fármaco, independente de apresentar uma relação causal ao tratamento. Desta forma, um evento adverso pode ser qualquer sinal, sintoma, doença desfavorável e não intencional associado ao uso do produto investigado, mesmo que não esteja a ele relacionado (ANVISA, 2016).

Evento adverso grave é definido como qualquer ocorrência desfavorável que, independente da dosagem possa resultar em morte, ameace a vida ou exija/estenda a hospitalização do paciente, envolva hospitalização resultando em incapacidade persistente ou significativa.

Aspectos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, CAAE: 31857120.4.0000.5020 e cadastrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos, RBR-249zxxh.

Análise estatística

Para a análise dos dados será realizada utilizando o teste t-pareado, utilizando o programa GraphPad Prism® versão 6.0 sendo considerado resultados significativos quando obtiver um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

ANEXO II – TCLE DE FASE I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do estudo: Desenvolvimento e avaliação de uma formulação tópica contendo produto de jucá (*Libidibia ferrea*) para tratamento da Leishmaniose Tegumentar.

Pesquisadores: Antonia Maria Ramos Franco e Thiago de Jesus Bacha.

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, situado na sede Av. André Araújo, 2936, Aleixo.

Telefone: (92) 36433065, Ramal: 3068, Laboratório de Leishmanioses e Doença de Chagas.

Convite e objetivo: Você é convidado a participar de um estudo para avaliar a segurança de uma pomada contendo produto de jucá (*Libidibia ferrea*) para tratamento da Leishmaniose Tegumentar (Ferida “braba”, “Leshe” ou úlcera de Bauru).

Este estudo se faz necessário em função da necessidade de se desenvolver um tratamento para Leishmaniose cutânea mais eficaz e que supere uma série de problemas, incluindo a resistência do parasito (capacidade do parasita de sobreviver mesmo sofrendo os efeitos da medicação), elevado efeitos colaterais. Além disso, todas os medicamentos atualmente disponíveis são de administração parenteral, que é a administração do medicamento através de injeções por via muscular (no músculo), endovenosa (na veia), subcutânea (na camada de gordura logo abaixo da pele) e intradérmica (cerca de 2 milímetros abaixo da pele). Atualmente, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda como primeira escolha para o tratamento desta doença o Antimoniato de meglumina (Glucantime®), em injeções diárias, por via endovenosa (na veia) ou intramuscular (no músculo), pelo mínimo de 20 dias consecutivos. A taxa de cura deste tratamento é de 75%. O desenvolvimento de uma formulação tópica (de aplicação local) de novas drogas oferecem inúmeras vantagens para o tratamento de Leishmaniose cutânea. O hidrogel é um gel que possui cerca de 70 a 90% de água em sua composição e possui diversas aplicações. Na medicina, os hidrogéis são usados em tratamentos tópicos (de aplicação local) de outras doenças e apresentam flexibilidade semelhante aos tecidos naturais, o que minimiza a irritação das membranas ou tecidos vizinhos ao local de aplicação, com uma melhor adesão do paciente.

O objetivo geral deste estudo é avaliar a segurança e a resposta ao tratamento da Leishmaniose Cutânea (Ferida “braba”, “Leshe” ou úlcera de Bauru) com hidrogel contendo extrato de *Libidibia ferrea* e comparar essa resposta com o Glucantime®. Esta planta tem sido utilizada no tratamento de diversas infecções, tendo apresentado resultados promissores nos ensaios de atividade anti-leishmania, com redução significativa das lesões cutâneas em animais e nas doses estudadas, não provocou qualquer prejuízo à saúde dos animais.

Rubrica do participante ou
representante legal

Rubrica do investigador
responsável

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é voluntária, podendo se recusar a participar ou dela se retirar em qualquer etapa deste estudo, sem qualquer tipo de constrangimento ou penalidade. Se você concordar e decidir participar voluntariamente após o convite, a leitura e explicação deste termo de consentimento, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa realizarão avaliações clínicas e laboratoriais, além de consultar dados que constam no seu histórico médico.

Procedimentos: Concordando com a participação no estudo realizaremos uma consulta inicial. Na primeira consulta, será realizada a coleta de sangue para a realização de exames (hematológicos e bioquímicos) antes do início do tratamento e logo após o seu término. Este procedimento inicial é necessário para uma avaliação correta do seu estado de saúde, pois somente indivíduos saudáveis e que atenderem aos critérios de inclusão e exclusão poderão ser convidados a participar deste estudo. Os exames laboratoriais que serão realizados antes e após o período de tratamento são: Hemograma (para saber se o indivíduo tem alguma infecção ativa ou alguma doença sanguínea como anemias e leucemia) ; Dosagem sérica de glicose (para saber se possui diabetes), potássio, sódio, cloreto, amilase, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubinas e fosfatase alcalina (para avaliar o funcionamento do fígado e dos rins); Para mulheres em idade fértil também será solicitado β – HCG (exame para saber se está grávida).

A coleta de sangue implica em dor pela inserção da agulha no ato da coleta, podendo haver um pequeno sangramento, normalmente evitado pela compressão da veia no local onde foi realizada a coleta. Se você for mulher em idade reprodutiva, será realizado um exame para teste de gravidez antes do início do estudo. Se estiver grávida, não poderá participar do estudo. Ao final do tratamento será realizada a segunda e última coleta de sangue para repetição dos exames, a fim de avaliar a ocorrência de alterações.

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele os discutirá com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos mesmos.

O número aproximado de participantes nesta fase do estudo (fase I) será de 70 participantes de ambos os sexos, idade entre 18 e 70 anos, que forem considerados saudáveis após avaliação clínica e laboratorial (realização dos exames), que nunca tiveram Leishmaniose Visceral (ou Calazar) ou Leishmaniose Tegumentar (ferida “braba”, “Leshe” ou úlcera de Bauru), sem discriminação de cor ou classe social. Serão adotados como critérios de exclusão: participantes que na primeira avaliação apresentarem alterações laboratoriais nos exames que revelarem disfunção hepática, renal, diabetes, disfunção cardíaca, grávidas e lactantes, fumantes, alcoólatras ou que fazem uso de qualquer outra medicação, histórico de Leishmaniose Visceral (ou Calazar) ou Leishmaniose Tegumentar Americana (ferida “braba”, “Leshe” ou úlcera de Bauru), alergia ao tratamento experimental, portadores de doenças crônicas e/ou doenças infectocontagiosas (tuberculose, hanseníase, HIV/AIDS, Leishmaniose Visceral ou LTA, entre outros).

Ao iniciar o estudo você poderá ser colocado no grupo controle e receber o tratamento com hidrogel sem *L. ferrea* (GelPla) que aplicará na pele na região posterior do braço (na parte de trás do braço) , aplicando no mesmo horário do dia,

por 4 (quatro) semanas ou poderá ser colocado no grupo experimental e receber o tratamento com hidrogel contendo extrato de *L. ferrea* a 10% (GelEpMeO) que aplicará na pele na região posterior do braço (na parte de trás do braço), aplicando no mesmo horário do dia, por 4 (quatro) semanas. A decisão sobre qual grupo você irá pertencer será realizado através do uso de uma tabela com números aleatórios. Os participantes da pesquisa serão avaliados antes, durante as 4 (quatro) semanas de tratamento em encontros semanais e logo após o término do tratamento.

Semanalmente, em dias pré-determinados em agenda de acompanhamento, o hidrogel será entregue em frascos aos participantes da pesquisa, que serão avaliados individualmente e responderão a um questionário para registro de efeitos adversos (relatarão o aparecimento de algum sintoma ou alguma reação que possa ter apresentado durante o tratamento). Os riscos da realização destes procedimentos são pequenos. Os participantes da pesquisa receberão orientações para comunicar aos pesquisadores quaisquer sinais ou sintomas que apresentarem durante o estudo. Caso apresente qualquer problema, você será avaliado e receberá todo o atendimento necessário.

Duração do estudo, acompanhamento, assistência multidisciplinar e tratamento profissional em caso de danos: Após a consulta inicial e obtenção dos resultados dos primeiros exames, o participante deverá retornar ao Posto de Saúde para iniciar o tratamento. Após o início do tratamento, o participante da pesquisa deverá retornar ao posto de saúde 1 (uma) vez por semana, durante 4 (quatro) semanas.

Os participantes do estudo serão acompanhados durante o período do tratamento e logo após seu término pelos profissionais: Thiago de Jesus Bacha (farmacêutico), Antônia Maria Ramos Franco (bióloga, pesquisadora titular do INPA) e Amanda Oliveira Araújo (Médica clínico geral CRM: 7742).

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento desta pesquisa e que necessite de qualquer atendimento profissional, ficará a cargo dos pesquisadores responsáveis pelo estudo. O participante da pesquisa receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário. Seu tratamento e acompanhamento pelo profissional qualificado independem da sua participação na pesquisa.

Consentimento de autorização para a coleta, armazenamento e utilização das amostras biológicas: Todas as amostras biológicas coletadas durante a pesquisa, conforme descrito acima, serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Ao final da pesquisa ou depois que todos os resultados dos exames ficarem prontos, se tiver sobrado alguma quantidade de sangue, estas amostras serão destruídas. O laboratório não irá guardar suas amostras biológicas. As amostras serão processadas e armazenadas no Laboratório de Leishmanioses e Doença de Chagas, situado na Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus.

O participante da pesquisa também poderá retirar seu consentimento de guarda das suas amostras biológicas armazenadas em banco em qualquer momento. Para isso, a solicitação deverá ser realizada por escrito e assinada, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão.

Benefícios: Você não será remunerado por sua participação e esta pesquisa poderá não oferecer benefícios diretos a você. Se concordar com o uso de suas informações e material biológico do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes desta pesquisa.

O principal benefício da sua participação é possibilitar que no futuro, com os resultados alcançados com esta pesquisa, o tratamento para esta doença seja mais eficaz, seguro e menos tóxico, beneficiando outros.

Riscos: Os riscos da coleta de sangue podem incluir desmaio, dor e/ou hematoma (mancha roxa na pele). Raramente pode haver um pequeno coágulo sanguíneo ou infecção no local da picada da agulha.

Custos: Se concordar com o uso de suas informações do seu prontuário e amostra de sangue armazenada como descrito acima, você não terá quaisquer custos ou despesas (gastos) pela sua participação nesta pesquisa. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte desta pesquisa.

Você e, eventualmente o/a seu/sua acompanhante serão adequadamente reembolsados pelas suas despesas com transporte e alimentação para cada dia de consulta da pesquisa, ou seja, todos os gastos para estar presente na consulta de avaliação e acompanhamento (nas datas previstas na agenda de acompanhamento) e se alimentar nos dias das visitas serão reembolsados por meio do pesquisador responsável.

Os pesquisadores e patrocinadores deste estudo não irão onerar os planos de saúde, o SUS, ou o próprio participante da pesquisa, sendo responsáveis por todos os gastos relativos aos cuidados de rotina (exames e procedimentos) necessários após a assinatura do consentimento livre e esclarecido.

Confidencialidade: A participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes serão mostrados apenas aos participantes do estudo. Os resultados do estudo serão apresentados em órgãos de divulgação pública como congressos e eventos científicos, porém sua identidade será mantida em sigilo para sempre.

Esclarecimentos: Você, participante da pesquisa, tem direito aos esclarecimentos que julgar necessário, a qualquer período do desenvolvimento deste estudo. Se você quiser saber mais detalhes e os resultados da pesquisa, faça contato com os pesquisadores Antonia Maria Ramos Franco e Thiago de Jesus Bacha, de segunda a sexta de 9:00 a 17:00 horas, pelo telefone (92) 36433065, Ramal: 3068, no Laboratório de Leishmanioses e Doença de Chagas, situado na Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e também pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que está formado por profissionais de diferentes áreas, que revisam os projetos de pesquisa que envolvem seres humanos, para garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos as pessoas que se voluntariam à

participar destes. O Senhor (a) participante da pesquisa também pode entrar em contato, caso tenha interesse com o CEP / UFAM, situado na Escola de Enfermagem de Manaus, na rua Teresina, 495, Adrianópolis, Sala 7, em Manaus, AM. Telefone: (92) 3305-1181, Ramal 2004 / (92) 9171-2496 ou pelo e-mail cep@ufam.edu.br. **Excepcionalmente em virtude das medidas de isolamento social, o contato com o CEP/UFAM deve ser realizado unicamente por meio do e-mail.** Já o CONEP encontra-se no endereço: SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília – DF. Telefone: (61) 3315-5877, atendimento de segunda a sexta das 08h às 19h (horário de Brasília) ou pelo e-mail da CONEP: conep@saude.gov.br.

Consentimento após Informação para adulto

Eu, _____
_____, por me considerar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste documento e da pesquisa a ser desenvolvida, livremente dou meu consentimento para inclusão como participante da pesquisa e atesto que me foi entregue uma cópia desse documento.

Assinatura do participante

Pesquisador (a) Responsável

Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

Rio Preto da Eva, _____ de _____ de _____

ANEXO III – MODELO DE PRONTUÁRIO (CRF) PARA FASE I**PRONTUÁRIO PARA PARTICIPAÇÃO****CRF****INPA – UFAM****ENSAIO CLÍNICO DE FASE I****DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO TÓPICA
CONTENDO PRODUTO DE JUCÁ (*Libidibia ferrea*) PARA TRATAMENTO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

- ☐ Unidade Básica de Saúde Manoel Rumão
- ☐ Unidade Hospitalar Thomé de Medeiros Raposo

Nº de Registro:**Iniciais do Paciente:** **Nº do paciente:**

- ☐ GelEpMeo
(0,5 g/dia) por 4 (quatro) semanas
- ☐ GelPla
(0,5 g/dia) por 4 (quatro) semanas

Ensaio clínico de fase I	
Critérios de inclusão	
Idade entre 18 e 70 anos;	☐ SIM ☐ NÃO
Indivíduos considerados saudáveis após avaliação clínica e laboratorial iniciais;	☐ SIM ☐ NÃO
Indivíduos que não apresentem histórico de Leishmaniose Visceral ou LTA;	☐ SIM ☐ NÃO
Concordância e assinatura voluntária do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);	☐ SIM ☐ NÃO
Comprometimento em seguir o protocolo experimental	☐ SIM ☐ NÃO
Para o paciente ser elegível todas as respostas devem ser “ SIM ”	
Data: / / Assinatura do Investigador:	
Critérios de exclusão	
Indivíduos que apresentarem alterações na avaliação clínica e/ou laboratorial pré-tratamento;	☐ SIM ☐ NÃO
Disfunção hepática, renal, diabetes ou alterações cardíacas;	☐ SIM ☐ NÃO
Grávidas e lactantes;	☐ SIM ☐ NÃO
Alergia ao tratamento experimental;	☐ SIM ☐ NÃO
Indivíduos alcoólatras, fumantes ou em uso de alguma medicação;	☐ SIM ☐ NÃO
Indivíduos com histórico de Leishmaniose Visceral e/ou LTA;	☐ SIM ☐ NÃO
Incapacidade ou recusa em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou impossibilidade de cumprir o Protocolo experimental;	☐ SIM ☐ NÃO
Pacientes portadores de doenças crônicas e/ou doenças infectocontagiosas (tuberculose, hanseníase, HIV/AIDS, Leishmaniose Visceral ou LTA, entre outros);	☐ SIM ☐ NÃO
Para o paciente se elegível, todas as respostas devem ser “ NÃO ”.	
Data: / / Assinatura do Investigador:	

Identificação			
Nome:			
Data recrutamento:	de	/ /	Data nascimento:
			de
			/ /
Grupo:		Sexo:	
Endereço:			
Telefone:		Procedência:	
Naturalidade:		Profissão:	
Escolaridade:	() 0-Analfabeto; 1-1º grau completo/incompleto; 2-2º grau completo/incompleto; 3-3º grau completo/incompleto		
Monitorização do tratamento			
Avaliação anterior ao tratamento			D0
			Data: / /
Quadro Clínico			
Peso: _____ kg PA: _____ x _____ FC: _____ Outras informações:			

Registro de exames laboratoriais					
ENSAIO DE FASE I		Início da 1ª semana		Final da 4ª semana (Final do tratamento)	
		Data 1º exame: / /		Data 2º exame: / /	
Exames	Dimensão	Basal	Classifique*	Após o término do tratamento	Classifique*
Hemoglobina	[g/dL]				
Leuc	[1/mm ³]				
Glic	[mg/dL]				
Pla	[1/mm ³]				
Creat	[mg/dL]				
Ureia	[mg/dL]				
BT/BD	[mg/dL]				
Sódio	[mmol/L]				
Potássio	[mmol/L]				
Amilase	[U/L]				
FA	[U/L]				
AST	[U/L]				
ALT	[U/L]				
β – HCG					
*Classificação do valor laboratorial fora da normalidade: 1 – Anormal, mas de pouca relevância; 2 – Anormal e de maior relevância (grave, levou a descontinuação, necessidade de intervenção terapêutica), também registrado como EA; 3 – Valor inválido; uma razão para esta opinião deve ser justificada.					
Comentários (por exemplo, valor inválido):					
Doenças ou queixas concomitantes:					
Medicações concomitantes (tratamento atual em andamento)?					
Assinatura do Investigador:					

**ANEXO IV – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO
USO DE ANIMAIS (CEUA)**

**INSTITUTO NACIONAL DE
PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARECER TÉCNICO Nº
91/2021/SEI-INPA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS
DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO DE
APROVAÇÃO**

Certificamos que a proposta intitulada "**Desenvolvimento de formulações tópicas com produtos naturais bioativos como alternativa de tratamento da Leishmaniose Tegumentar**", registrada com o nº **023/2021, SEI 01280.000911/2021-33**, sob a responsabilidade de **Thiago de Jesus Bacha** - 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 **29/07/2021**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 01/10/2021 a Final: 28/02/2023
Espécie/linhagem/raça:	Mesocricetus auratus
Número de animais:	84
Peso/Idade:	100g / 12 semanas
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério Central do INPA
Inoculação:	L. (L.) amazonenses.; Formulação Farmacêutica com a Fração DCM de Libidibia ferrea; Antimoniato de meglumina - Glucantime®;

Data de liberação do Parecer: **02.08.2021**

Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 011/2021

Documento assinado eletronicamente por **Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia**, em 03/08/2021, às 12:04 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de](#)

2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **7946883** e o código CRC **41FD5C34**.

Referência: Processo nº 01280.000911/2021-33

SEI-INPA nº 7946883

ANEXO V – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Desenvolvimento e avaliação de uma formulação tópica contendo produto de jucá (<i>Libidibia ferrea</i>) para tratamento da Leishmaniose Tegumentar	
Pesquisador Responsável: THIAGO DE JESUS BACHA	
Área Temática:	
Versão: 6	
CAAE: 31857120.4.0000.5020	
Submetido em: 18/03/2021	
Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1537070	

ANEXO VI – PARECER DO CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO



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

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº AF46200

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

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 Geralc	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 15:04 de 08/10/2018.



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

ANEXO VII – CAPA DO ARTIGO CAPÍTULO 1



EUROPEAN ACADEMIC RESEARCH
Vol. VIII, Issue 12/ March 2021

Impact Factor: 3.4546 (UIF)
DRJI Value: 5.9 (B+)

Current situation of Cutaneous Leishmaniasis and challenges of drug resistance: a narrative review

THIAGO DE JESUS BACHA¹

Doutorando em Inovação Farmacêutica
pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA

CLAUDIA DANTAS COMANDOLLI-WYREPKOWSKI

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA

BRUNO BEZERRA JENSEN¹

Doutor em Inovação Farmacêutica
pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas – INPA

ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO

Doutora em Biologia Celular e Molecular
pelo Instituto Oswaldo Cruz – IOC/RJ
Pesquisadora Titular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by a flagellated parasite of the genus Leishmania. It is a disease widely distributed in the world. It is primarily a zoonotic infection affecting men in a secondary way and transmission occurs through the bite of an infected sandflies. The disease has different clinical forms, but it can present as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and as Visceral Leishmaniasis (LV) or kala-azar, the latter being the most severe form of the disease. American Tegumentary Leishmaniasis has two main clinical forms, Cutaneous Leishmaniasis and Mucous Leishmaniasis and within this classification they still present a wide variety of clinical manifestations. There are more than twenty species that cause the disease and the clinical presentation is strongly associated with factors related to this parasite-host relationship and the type of immune response triggered. The treatment of leishmaniasis has undergone a great deal of variation over the years and since 1940 the

¹ Corresponding authors: thiagobacha@live.com / brunobjensenfarma@gmail.com

ANEXO VIII – CAPA DO ARTIGO CAPÍTULO 2



PEER REVIEW, Vol. 5, Nº X, 2023
DOI: 10.53660/845.prw2301
ISSN: 1541-1389

**Evaluation of the *in vivo* and *in vitro* effect of *Libidibia ferrea* on
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Avaliação do efeito *in vivo* e *in vitro* de *Libidibia ferrea* sobre *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

Thiago de Jesus Bacha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-5172>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: thiagobacha@live.com

Bruno Bezerra Jensen

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9102-9698>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: brunobjensenfarma@gmail.com

Amanda Silva de Jesus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3613-3732>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: amdsilvajesus@gmail.com

Pamela Emily Torres Iwabuchi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5856-8502>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: pemily.torres@gmail.com

Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos Geraldi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1054-2853>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: katiadolange@hotmail.com

Francimeire Gomes Pinheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8897-6088>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: meireg1@gmail.com

Peter Kima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0390-0509>
University of Florida, Estados Unidos
E-mail: pkima@ufl.edu

Antonia Maria Ramos Franco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4300-5325>
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil
E-mail: afranco@inpa.gov.br

ANEXO IX – ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO CAPÍTULO 3


Acta Amazonica

 Home

 Author

Author Dashboard

2 Manuscripts with Decisions >

1 Manuscripts I Have Co-Authored >

Start New Submission >
 Legacy Instructions >
 5 Most Recent E-mails >

Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
	 Contact Journal ADM: Online, ActAmaz ADM: Fernandes, Tito Accept (23-Jul-2023) View Submission	AA-2023-0068.R1	Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: an in vivo assay	10-Jul-2023	23-Jul-2023
	view decision letter				
a revision has been submitted (AA-2023-0068.R1)	 Contact Journal ADM: Online, ActAmaz - Minor Revision (28-Jun-2023) - a revision has been submitted View Submission	AA-2023-0068	Microemulsion based on methyl 3,4,5-trihydroxybenzoate for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: an in vivo assay	07-Mar-2023	28-Jun-2023
	view decision letter				



ANEXO X – CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO NO CONGRESSO MEDTROP

CERTIFICADO

MEDTROP
25 a 28 out. 2021
PLAY

Certificamos que **TRATAMENTO ASSOCIADO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA COM PRODUTO NATURAL E GLUCANTIME®** o trabalho cujos autores são: THIAGO DE JESUS BACHA; AMANDA SILVA DE JESUS; BRUNO BEZERRA JENSEN; AMANDA OLIVEIRA ARAUJO; ROBSON CABRAL VALADÃO; FRANCIMEIRE GOMES PINHEIRO; PAMELA EMILY TORRES IWABUCHI; MARIA DA PAZ LIMA; KATIA SOLANGE CARDOSO RODRIGUES DOS SANTOS; ANTONIA MARIA RAMOS FRANCO PEREIRA, foi apresentado na modalidade E-PÔSTER, na **56ª Edição do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP PLAY**, realizado no período de 25 a 28 de outubro de 2021, de forma on-line.

Recife/PE, 28 de outubro de 2021.

Para validar este certificado, acesse: <https://icongresso.bureaudeeventos.itarget.com.br/certificado/auth/validar>
Código de validação: bJ1XoAJeKn


Dra. Cléa Bichara
Presidente da Comissão Científica do Medtrop Play


Dr. Pedro Vasconcelos
Presidente do Medtrop Play


Realização
SBMT
SOCIEDADE BRASILEIRA
DE MEDICINA TROPICAL