Adriana Bezerra de Souza

Avaliação da eficácia *in vitro* ou *in vivo* da butenafina livre ou nanoencapsulada contra *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe
Domingues Passero

**São Paulo
2019**

Adriana Bezerra de Souza

Avaliação da eficácia *in vitro* ou *in vivo* da butenafina livre ou nanoencapsulada contra *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe
Domingues Passero

**São Paulo
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Adriana Bezerra de
Avaliação da eficácia in vitro ou in vivo da
butenafina livre ou nanoencapsulada contra *L. (L.)*
infantum e *L. (L.) amazonensis* / Adriana Bezerra de
Souza. -- São Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Luiz Felipe Domingues Passero.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Leishmania
3.Reposicionamento de fármacos 4.Butenafina
5.Terapia 6.Nanocarreadores

USP/FM/DBD-380/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha mãe (em memória).

A minha estrela guia para sempre.

Ao meu irmão Robson.

*Porque mesmo diante da sua
limitação física, você nunca se
limitou em me ajudar.*

Ao meu pequeno Ryan.

*Para que você siga os exemplos
acima citados e nunca desista de
nada. PS: A tia Di ama você.*

Agradecimentos

A Deus. *Ti trovo nel mare profondo*

Aos meus amados pais.

Aos meus queridos irmãos.

Ao meu amável avô.

À minha preciosa família.

Aos meus lindos: Ryan e MMBL.

Eu amo vocês, imensamente!

Ao meu orientador professor doutor Luiz Felipe Domingues Passero, te agradeço profundamente pela oportunidade e confiança depositadas, pelo conhecimento e por todos os ensinamentos, além da paciência e bom humor que você tem comigo sempre. Obrigada pelo aprendizado não só em ciências, mas também pelas experiências de vida compartilhadas. São pessoas como você que tornam o mundo melhor! Muito obrigada.

À professora doutora Dolores Remédios Serrano López (Loli), da Universidade Complutense de Madrid (UCM), pela parceria neste projeto, pelos ensinamentos científicos dos métodos farmacológicos, pela paciência e, especialmente, por me receber tão bem em Madrid! *Muchas gracias por todo, Loli. Espero verte pronto.*

À professora doutora Aikaterini Lalatsa, da Universidade de Portsmouth, pela parceria e pela contribuição com a inovação das *nanopartículas* neste projeto.

Aos professores doutores André Gustavo Tempone, João H. G. Lago e Márcia Dalastra Laurenti, por suas contribuições e sugestões no meu exame de qualificação. Foi um dia intenso e inesquecível.

Agradeço às minhas amigas do lado esquerdo do peito: Gabriela Rodrigues e Paula Dantas, pela paciência, companheirismo e amizade ao longo desta jornada. Sem palavras para vocês, meninas. Obrigada por estarem comigo.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) Carmen, Carol, Edson, Eduardo (Du), Gabriela Araújo, Gabriela Rodrigues, Jéssica, Juliana (Jú), Kadir, Lia, Natália (Japa), Thaís Bruna (TB), Thaíse Tomokane (Thai), Wilfredo e às doutoras Àurea Ferreira, Cláudia Gomes e Vânia da Matta e aos amigos conquistados em Madrid (UCM): José, Raquel Rodriguez, Salomé e Talaya, pelo apoio durante meu período em ambos os laboratórios.

Em especial agradeço ao Eduardo, à Jéssica, Carmen, Gabriela Araújo, Gabriela Rodrigues e Thaíse por toda a ajuda no desenvolvimento deste projeto (e antes dele), agradeço por todas as dúvidas que me esclareceram, por todos os favores e pelos tempos agradáveis que já passamos juntos.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos no primeiro período do projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo: 2017/09405-4) pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto.

À Unión Iberoamericana de Universidades (USP-UCM) e ao Santander pela oportunidade e pelo financiamento parcial da minha ida à Espanha.

(...) Lo que hagas siempre hazlo por amor

Pon las alas, contra el viento

No hay nada que perder

(Dulce María)

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 – Epidemiologia da leishmaniose.....	7
2.2 – Aspectos gerais da biologia da leishmaniose	10
2.3 – Tratamento das leishmanioses.....	16
2.3.1 – Reposicionamento de fármacos nas leishmanioses e o uso de nanocarreadores	18
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS	32
4.1 – Objetivo geral.....	32
4.2 – Objetivos específicos.....	32
5. MÉTODOS	34
5.1 – Parasitos	34
5.2 – Animais experimentais.....	34
5.3 – Compostos e formulações	34
i) <i>Ângulo de fluidez de pó</i>	36
ii) <i>Rendimento</i>	36
iii) <i>Encapsulamento de fármaco</i>	37
iv) <i>Estudo de dissolução de butenafina e morfologia de But-SNEDD</i>	37
Experimentos <i>in vitro</i>	38
5.4 – Avaliação do potencial antileishmania e da citotoxicidade (<i>in vitro</i>) das nanoformulações de butenafina produzidas para tratamento oral de leishmaniose.....	38
5.4.1 – Ensaio antileishmania	38
5.4.2 – Avaliação da citotoxicidade das nanoformulações.....	39
5.5 – Teste de absorção cutânea de butenafina	40
Experimentos <i>in vivo</i>	41
5.6 – Infecção e tratamento experimental	41
5.7 – Tamanho da lesão e carga parasitária.....	42
5.8 – Preparação do antígeno total de <i>L. (L.) amazonensis</i>	42
5.9 – Análise da produção de citocinas e proliferação celular	43
5.10 – Avaliação das alterações histológicas de pele nos animais tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com o antimoníaco de meglumina.....	43

5.11 – Estudo histológico	44
5.12 – Forma de análise dos resultados	44
6. RESULTADOS	46
6.1 – Encapsulamento da butenafina	46
6.1.1 – Caracterização física das nanoformulações (em SNEDD) de butenafina para tratamento oral	46
6.2 – Avaliação do potencial antileishmania e da citotoxicidade (<i>in vitro</i>) das nanoformulações de butenafina produzidas para tratamento oral da leishmaniose	49
6.3 – Estudo de absorção cutânea	51
6.4 – Tamanho das lesões e carga parasitária	51
6.5 – Produção de citocinas e proliferação celular	55
6.6 – Avaliação de alterações histológicas da pele nos animais tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com o antimoníato de meglumina	56
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÃO	66
9. ANEXOS	68
1 – Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMSUP)	68
2 – Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEUA-IMT)	69
3 – Artigo publicado no período do mestrado	70
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Lista de figuras

Figura 1 – Mapa geográfico mundial ilustrando países afetados pela leishmaniose cutânea, no ano de 2016. **Modificado de:** World Health Organization (WHO), 2018.... 8

Figura 2 – Mapa geográfico mundial ilustrando os países afetados pela leishmaniose visceral, no ano de 2016. **Modificado de:** WHO, 2018..... 9

Figura 3 – Esquema ilustrado do Ciclo de vida de *Leishmania* sp. no inseto vetor e no ser humano. **Modificado de:** Center for Disease Control and Prevention (CDC) - Parasites - Leishmaniasis – Biology, 2016..... 12

Figura 4 – Formas morfológicas de *Leishmania* sp., em a) forma amastigota intracelular (seta): estruturas arredondadas pequenas, aflageladas b) formas promastigotas extracelulares: estrutura fusiforme, flagelada, com núcleo visível. Fotos de lâminas por microscopia de luz, fixadas e coradas por Giemsa (Aumento 40x). **Modificado de:** Fiocruz (Instituto Oswaldo Cruz), 2008. 13

Figura 5 – A figura ilustra a rota bioquímica da síntese de ergosterol em *Leishmania* sp e fungos. 1-13: Representação de esteróis intermediários ou produtos finais. 1: Lanosterol; 2: 24-Metileno-dihidrolanosterol; 3: 4 α ,14 α -Dimetilcolesta-8,24(24)-dien-3 β -ol; 4: 4 α ,14 α -Dimetilergosta-8,24 (24¹)-dien-3 β -ol; 5: 14 α -Metilcolesta-8,24-dien-3 β -ol; 6: 14 α -Metilergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; 7: Zimosterol (colesta-8,24-dien-3 β -ol); 8: Ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; 9: Colesta-7,24-dien-3 β -ol; 10: Ergosta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol; 11: Colesta-5,7,24-trien-3 β -ol; 12: Ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol; 13: Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol). HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA; HMGR: HMG-CoA redutase; SEO: Esqualeno-2,3-epoxidase; 14-DM: 14 α -metil-esterol-dimetilase; EMT: $\Delta^{24,25}$ -esterol-metiltransferase. **Modificado de:** ROBERTS *et al.* (2003) e MACEDO-SILVA, DE SOUZA e RODRIGUES (2009)..... 22

Figura 6 – Estrutura química das moléculas de terbinafina (A) e de butenafina (B). **Modificado de:** KRAUSS; STADLER; BRACHER (2017)..... 25

Figura 7 – Diagrama de fases: O tamanho de partícula das diferentes composições é representado nos retângulos brancos. Áreas azuis indicam um tamanho de partícula menor, enquanto áreas amarelas e vermelhas estão associadas a tamanhos maiores..... 46

Figura 8 – Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura das formulações sólidas de SNEDD de butenafina A) Formulação 1; B) Formulação 2, C) Formulação 3 e D) Formulação 4. Barra representa 1 µm. 48

Figura 9 – Perfis de dissolução das formulações sólidas de SNEDD de butenafina em solução tampão de pH 1,2 (média % ± desvio). 49

Figura 10 – Tamanho de lesão dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados topicamente com butenafina livre (But-Livre) ou nanoencapsulada (But-Snedd e But-Gel) ou intralesionalmente com antimonioato de meglumina (Glu). O tamanho das lesões nos grupos tratados e no grupo controle infectado foi mensurado semanalmente durante a progressão da doença. Os resultados estão apresentados com a média e desvio padrão. *p < 0,05 em comparação ao grupo controle infectado..... 52

Figura 11 – Carga parasitária da pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados topicamente com os brancos das nanoencapsulações, com butenafina livre (But-Livre) ou nanoencapsulada a nanogel (But-Gel) ou SNEDD (But-Snedd) e intralesionalmente com o fármaco padrão antimonioato de meglumina (Glu). Os resultados estão apresentados com a média e desvio padrão de três experimentos independentes contendo 5 animais por grupo. *p < 0,05 53

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos de biópsias das lesões dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* (exceto grupo saudável - H) evidenciando o parasitismo cutâneo na derme dos grupos infectado não tratado (A), tratados com o branco do nanogel (B); branco do SNEDD (C); But-Snedd (D); But-Gel (E), But-Livre (F) e Glu (G) — (HE × 400)...... 54

Figura 13 – Quantificação de IFN- γ (A), IL-4 (B) da cultura de células extraídas dos linfonodos e estimuladas com antígeno total (AgT) de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10 μ g/mL) durante 72h. *p < 0,05..... 55

Figura 14 – Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de animais tratados apenas com solução veículo (grupo saudável – A), com o branco do nanogel (B), branco do SNEDD (C), But-Snedd (D); But-Gel (E), But-Livre (F) e Glu (G) — (HE $\times$ 200). 57

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição das formulações de SNEDD de butenafina para tratamento oral	35
Tabela 2 – Respostas dos parâmetros das nanoformulações de butenafina para tratamento oral.....	47
Tabela 3 – Avaliação do potencial antileishmania e da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, das nanoformulações de butenafina (F1-F4) e butenafina livre.....	50
Tabela 4 – Parâmetros de absorção cutânea de butenafina (média e desvio, n= 3).....	51

Lista de abreviaturas e siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AgT	Antígeno total
ALT	Alanina transaminase
AM	Antimoniato de meglumina
AmB	Anfotericina B
APC	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato transaminase
DCs	Células dendríticas
DNDi	Drug for Neglected Diseases <i>initiative</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
<i>et al.</i>	do latim: e outros
EUA	Estados Unidos da América
Fig	Figura
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Glu	Glucantime
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFN	Interferon
IL	Interleucina
<i>L. (L.)</i>	<i>Leishmania (Leishmania)</i>
<i>L. (V.)</i>	<i>Leishmania (Vianna)</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LCAD	Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão salina fosfato
PBS-T	Tampão salina fosfato com Tween-20

PEI	Polietilenoimina
PEO	Poli óxido de etileno
pH	Potencial hidrogeniônico
prof ^o (a)	Professor (a)
SEDDS	Sistema de autoemulsificação (do inglês: <i>self-emulsifying drug delivery systems</i>)
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SMEDDS	Microformulação autoemulsificante (do inglês: <i>self-microemulsifying drug delivery system</i>)
SNEDDS	Nanoformulação autoemulsificante (do inglês: <i>self-nanoemulsifying drug delivery system</i>)
Th	T auxiliar (do inglês: <i>T helper</i>)
Th1	T helper do tipo 1
Th2	T helper do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
USP	Universidade de São Paulo
USP-NF	<i>United States Pharmacopeia – National Formulary</i>
WHO	World Health Organization (inglês de OMS)
RPM	Rotações por minuto
vol	Volume
AoR	Ângulo de Repouso (do inglês: <i>angle of repose</i>)
CP	Carga Parasitária
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
But	Butenafina
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
HE	Hematoxilina e eosina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (do inglês: <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>)
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (do inglês: <i>Generally Recognized As Safe</i>)
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
IMTUSP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

Lista de símbolos

%	por cento
µg	microgramas
µg/mL	microgramas por mililitro
µL	microlitros
µM	micromolar
CO ₂	Dióxido de carbono
h	horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
mL	mililitros
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
°C	graus Celsius
α	alfa
β	beta
γ	gama
Sb	antimônio (elemento químico)

Resumo

Souza AB. *Avaliação da eficácia in vitro ou in vivo da butenafina livre ou nanoencapsulada contra L. (L.) infantum e L. (L.) amazonensis* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

A leishmaniose se refere a doenças causadas por diferentes espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, que ocorrem em 98 países, portanto, é um problema de saúde global. O tratamento é efetuado com dois principais fármacos, o antimonial pentavalente e a anfotericina B, os quais induzem sérios efeitos colaterais aos pacientes, podendo levar ao abandono da terapia. Assim, a busca por novos fármacos para o tratamento de leishmaniose é necessária e urgente. O fármaco antifúngico cloridrato de butenafina apresentou potencial antileishmania *in vitro* contra espécies dermatotrópicas de *Leishmania* sp. Desta maneira, a eficácia *in vitro* da butenafina livre ou nanoencapsulada contra as formas promastigotas e amastigotas da espécie viscerotrópica *L. (L.) infantum* foi avaliada, e a eficácia *in vivo* para uso tópico foi estudada em camundongos da linhagem BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. Nanoformulações em sistema de nanoformulação autoemulsificante (SNEDD) e em nanogel foram produzidas e estudos de absorção cutânea realizados. Camundongos BALB/c foram infectados com *L. (L.) amazonensis* na base da cauda e após quatro semanas o tratamento tópico com a butenafina livre ou nanoencapsulada, foi administrado uma vez por dia em um período total de 15 dias. Como controle, animais infectados receberam intralesionalmente antimonial de meglumina (Glucantime®). Os tamanhos das lesões de todos os grupos foram mensurados e após duas semanas do fim do tratamento, os animais foram eutanasiados. O parasitismo tecidual foi quantificado no ponto cutâneo de inoculação do parasito e foram feitas análises histológicas do parasitismo cutâneo. Animais não infectados foram submetidos ao mesmo tratamento para avaliar possíveis alterações histológicas causadas pelo tratamento. As concentrações de IFN- γ e IL-4 também foram avaliadas no sobrenadante de células mononucleares de linfonodos estimuladas com antígeno total de *L. (L.) amazonensis*. Os dados obtidos mostraram que as nanoformulações F1, F3 e F4 foram eficazes contra *L. (L.) infantum* (*in vitro*). No teste de absorção cutânea, verificou-se que a butenafina nanoencapsulada apresentou melhor capacidade de distribuição do fármaco e difusão rápida na pele, em comparação à butenafina livre. Os grupos de animais tratados com as formulações de butenafina apresentaram menor tamanho de lesão e diminuição da carga parasitária, caracterizada por um moderado e difuso infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo controle infectado não tratado. O nanogel apresentou atividade similar à dos animais tratados com Glucantime. A resposta imune celular dos animais mostrou que os grupos de animais tratados com butenafina livre e formulada ao nanogel apresentaram aumento na produção de IFN- γ e as células dos animais tratados com o nanogel também produziram níveis aumentados de IL-4. No estudo histológico da pele de animais

saudáveis tratados com butenafina nanoencapsulada ou livre não apresentaram alterações na epiderme ou na derme, por outro lado, os animais tratados com Glucantime apresentaram um processo inflamatório na derme constituído basicamente por células mononucleares e polimorfonucleares. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o reposicionamento do cloridrato de butenafina nas leishmanioses pode ser efetivo.

Descritores: Leishmaniose cutânea, Leishmania, Reposicionamento de fármacos, Butenafina, Terapia, Nanoencapsulamento

Abstract

Souza AB. *Evaluation of in vivo or in vitro of butenafine free or in nanocarrier on L. (L.) infantum e L. (L.) amazonensis* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Leishmaniasis are diseases caused by different species of the protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. These diseases occur in 98 countries, so it is a global health problem. Although, the treatment is performed with two main drugs that are pentavalent antimonial and amphotericin B. These drugs have a number of side effects to patients, causing the abandonment of the therapy. Therefore, the search for new therapeutic targets for leishmaniasis is urgently needed. An interesting target drug is butenafine chloride, that presented leishmanicidal potential *in vitro* against dermatotropic species of *Leishmania* sp. Thus, the *in vitro* efficacy of free or nanoencapsulated butenafine against promastigote and amastigote forms of the viscerotropic species *L. (L.) infantum* was evaluated, and the *in vivo* efficacy for topical use was evaluated in male BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*. For this, nanoformulations were produced in a self-emulsifying nanoformulation system (SNEDD) and nanogel, from which a skin absorption study was also performed. BALB/c mice were infected with *L. (L.) amazonensis* at the base of the tail and after four weeks topical treatment with free or nanoencapsulated butenafine was administered once daily for a total of 15 days. As a positive control, infected animals received intralesionally meglumine antimoniate (Glucantime®). Lesion sizes of all groups were measured weekly during disease progression and two weeks after the end of treatment, the animals were euthanized, tissue parasitism was quantified at the cutaneous point of parasite inoculation and histological analyzes of the skin parasitism were performed. IFN- γ and IL-4 concentrations were also evaluated in the supernatant of lymph node mononuclear cells stimulated with *L. (L.) amazonensis* total antigen. The obtained data showed that F1, F3 and F4 nanoformulations were effective against *L. (L.) infantum* (*in vitro*). In the skin absorption test, it was found that nanoencapsulated butenafine presented better drug distribution and rapid diffusion capacity in the skin, compared to free butenafine. The groups of animals treated with the butenafine formulations presented smaller lesion size and decreased parasite load, characterized by moderate and diffuse inflammatory infiltrate when compared to the untreated infected control group. The nanogel showed similar activity to the animals treated with Glucantime. The cellular immune response of the animals showed that the groups of animals treated with free and nanogel-formulated animals showed increased IFN- γ production and cells of animals treated with nanogel also produced increased levels of IL-4. In the histological study of the skin of healthy animals treated with nanoencapsulated or free butenafine showed no changes in the epidermis or dermis, whereas animals treated with

Glucantime showed an inflammatory process in the dermis consisting of mononuclear and polymorphonuclear cells. Taken together, these data suggest that repurposing butenafine in leishmaniasis treatment can be effective.

Descriptors: Cutaneous Leishmaniasis, Leishmania, Drug repurposing, Butenafine, Therapy, Nanocarriers

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários patogênicos pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitida por insetos vetores pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* sp. e *Psychodopygus* no Novo Mundo (região compreendida entre América Central e América do Sul) e *Phlebotomus* sp. no Velho Mundo, que realizam repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos, regurgitando na derme as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp. conjuntamente com sua saliva (LAURENTI *et al.* 2009; ARAÚJO-SANTOS *et al.* 2010; WHO, 2018).

Quando há perpetuação da infecção, os quadros clínicos da doença variam de acordo com a espécie infectante e da interação parasito-hospedeiro. São conhecidas aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* patogênicas aos seres humanos, entre elas estão: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, principais agentes causadores de quadros clínicos raros de Leishmaniose Cutânea (LC) no Brasil e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV) (MOHAMMAD *et al.*, 2016).

Em 1908, a espécie *L. (L.) infantum* foi relatada como sendo responsável pela LV na região Mediterrânea (NICOLLE, 1908). Após 29 anos, a *L. (L.) chagasi* foi incriminada como a causadora dessa doença nas Américas (CUNHA; CHAGAS, 1937). Após estudos genéticos e moleculares (MAURÍCIO *et al.*, 1999; MOMEN *et al.*, 1993) estas espécies, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, foram formalmente referidas como sinônimos (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000).

Dentre as formas clínicas causadas por essa diversidade de espécies de parasitos, há a leishmaniose cutânea localizada (LCL) que na maior parte das vezes apresenta uma lesão simples e autocurativa, a mucocutânea (LCM), que destrói tecidos da mucosa, e a forma visceral (LV), que acomete principalmente o fígado, baço e medula óssea, podendo levar à morte do hospedeiro, caso não seja devidamente tratada (KAYE; SCOTT, 2011; VAN DER AUWERA; DUJARDIN, 2015). Além desses, também há quadros clínicos mais raros, como a leishmaniose cutânea disseminada ou *borderline* (LCD), a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e a leishmaniose cutânea atípica (SILVEIRA, 2005; MONDOLFI *et al.*, 2013; PONCE *et al.*, 1991)

Mesmo com a diversidade de quadros clínicos e espécies de parasitos causadores de leishmanioses, os tratamentos clássicos fundamentam-se nos antimoniais pentavalentes (Sb^V) e na anfotericina B (SANTOS, 1994; REITHINGER *et al.*, 2007).

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) representam a primeira escolha para o tratamento de leishmaniose, há mais de 70 anos. Embora sejam clinicamente efetivos, estes medicamentos possuem uma série de efeitos colaterais aos pacientes, como: nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade. Além disso, alguns raros casos de arritmias fatais ou mortes súbitas já foram relatados (AMATO *et al.*, 1998), características estas que fazem os pacientes abandonarem o tratamento. Também há relatos de resistência aos antimoniais principalmente para o subgênero *Viannia* (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Nestes casos, a anfotericina B (AmB) passa a ser então o fármaco de eleição (KAUR; RAJPUT, 2014).

A AmB foi introduzida como terapia de segunda linha para LV na década de 1960, substituindo os antimoniais com taxas de cura de 90% a 97%. Entretanto, a administração da AmB deve ser lenta, a fim de evitar efeitos colaterais relacionados à infusão, o que faz com que o tratamento seja realizado em esquema de internação ou hospital-dia. Além disso, as taxas de nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal podem ser superiores a 50%, limitando o seu uso (LEMKE *et al.*, 2005). Além do mais, também já foram relatados casos de resistência parasitária à AmB, em Bihar, na Índia (THAKUR *et al.*, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007).

Considerando os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados na terapia das leishmanioses, os tratamentos relapsos e a indução da resistência parasitária (DUTRA *et al.*, 2014; ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018), a busca por novos fármacos para tratamento alternativo é necessária e urgente.

Para isso, existem diversas formas de realizar prospecção de novas moléculas candidatas à quimioterapia, que são baseadas em etnofarmacologia, quimiotaxonomia e busca aleatória de compostos com ação antileishmania (SARTORELLI *et al.*, 2007; TEMPONE *et al.*, 2008; PASSERO *et al.*, 2018). Outra estratégia para avaliar a ação de fármacos é conhecida como reposicionamento, bastante promissora, pois dá novo uso para um fármaco já aprovado por uma agência de vigilância, fazendo com que as pesquisas sejam desenvolvidas mais rapidamente e se tornem mais baratas (ANDRADE-NETO *et al.*, 2018). Uma vez que a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada (LINDOSO; LINDOSO, 2009), o reposicionamento de fármacos

se torna bastante importante na busca por novos fármacos alternativos para o tratamento dessa doença.

Existem muitos fármacos contra micoses que já foram liberados para uso em humanos, e que atuam na síntese de esteróis de fungos, sobretudo no ergosterol. Considerando que o metabolismo de esteróis de *Leishmania* sp. é similar ao metabolismo de esteróis de fungos, e que diversos fármacos antifúngicos têm ação antileishmania, como a própria AmB (CUNHA *et al.*, 2015), sugere-se que fármacos antifúngicos com ação central na rota metabólica de formação do ergosterol também apresentem ação antileishmania, como é o caso do fármaco cloridrato de butenafina, um agente antimicótico da classe das benzilaminas, que inibe a ação da enzima esqualeno epoxidase, uma das enzimas chaves para a formação do ergosterol. Em estudo pioneiro realizado por nosso grupo, demonstramos que este fármaco possui ação contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016) e também contra a espécie *L. (L.) infantum* (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2019), sugerindo assim, que a butenafina tem ação multiespectral em *Leishmania* sp.

Diversas pesquisas vêm demonstrando que o uso da nanotecnologia é uma estratégia de inovação que tende em melhorar a eficácia terapêutica de medicamentos, pois seu principal objetivo é elaborar estruturas estáveis e de maior potencial biológico. Nesse contexto, técnicas inovadoras estão sendo aplicadas na obtenção de novas formas farmacêuticas de liberação controlada de fármacos capazes de manter ou ampliar a ação de agentes promissores utilizados no tratamento de algumas doenças. Dentre essas técnicas, está o sistema de entrega de fármacos autonanoemulsificante (SNEDD), que são misturas líquidas homogêneas anidras, compostas de óleos, fármacos e surfactantes que emulsificam espontaneamente partículas de 20 – 200 nm em diluição aquosa (SHAHBA; MOHSIN; ALANAZI, 2012).

SNEDDs foram escolhidos como sistema de entrega de fármacos porque mostraram ser um veículo promissor na LV na solubilização de fármacos pouco solúveis em água como a buparvaquona e também porque alguns dos excipientes empregados na preparação de SNEDDs têm atividade *per se* em *Leishmania* spp. (SERRANO *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2018).

Nesta mesma linha de pensamento, encontram-se os nano-portadores tipo gel (nanogéis), preparados via montagem eletrostática com carboximetil celulose,

hidroxipropil celulose e carbômeros. Pequenas moléculas e proteínas presentes durante a montagem de nanogéis os tornam versáteis e complementares de entrega de carga, dependendo do contexto biológico. Por exemplo, em células de mamíferos, os nanogéis são rapidamente internalizados e escapam do endossoma para fornecer carga protéica impermeável à membrana no citoplasma e melhorar a potência quimioterapêutica em células tumorais resistentes a fármacos. Em bactérias, os nanogéis permeabilizam as membranas microbianas para sensibilizar os patógenos bacterianos à ação de um antibiótico carregado (JODAR *et al.*, 2015).

Portanto, esses sistemas de entrega de fármacos em SNEDD e nanogéis mostram-se promissores para o desenvolvimento de agentes antileishmania mais potentes. Além das vantagens potenciais da via de administração tópica, que incluem distribuição dirigida ao local, a possível redução da dose total de fármaco, contribuindo com a redução dos efeitos colaterais e da toxicidade do fármaco, proporcionando maior conforto aos pacientes e consequentemente, maior aceitação ao tratamento (PILLAI *et al.*, 2015).

Considerando o exposto acima, e principalmente o potencial antileishmania *in vitro* do cloridrato de butenafina sobre as espécies dermatotrópicas, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a atividade terapêutica do fármaco antifúngico cloridrato de butenafina livre ou nanoencapsulado na infecção experimental causada por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c e avaliar a eficácia *in vitro* de nanoformulações orais contra *L. (L.) infantum*

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Epidemiologia da leishmaniose

A leishmaniose se refere às doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania* Ordem: Kinetoplastida; Família: Trypanosomatidae (ROSS, 1903) que infectam diversos vertebrados como cães, gatos, raposas, roedores e humanos, sendo considerada uma doença de transmissão zoonótica, pois envolve animais domésticos e silvestres como reservatórios (LARA-SILVA *et al.*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), a prevalência global das leishmanioses afeta aproximadamente 12 milhões de indivíduos, ocasionando anualmente entre 0,9 e 1,7 milhões de novos casos, sendo que 350 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco para contrair a infecção. Esta doença é endêmica em 98 países no mundo, e desses, 35 mostram coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), localizados principalmente em regiões tropicais e subtropicais, dos cinco continentes, onde as condições socioeconômicas comprometem o controle da doença.

A Leishmaniose Cutânea – no Brasil conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) – é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I d.C (LAISON, 1997; CAMARGO; BARCINSKI, 2003; BASANO; CAMARGO, 2004). Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C, feitas pelos índios do Peru, que apresentavam mutilações de lábios e nariz, características da “espúndia”, hoje conhecida como leishmaniose cutânea mucosa (LAINSON; SHAW, 1988; BASANO; CAMARGO, 2004).

A primeira referência de LTA no Brasil, encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “*Antigüedad de la Syphilis en el Peru*”, na qual relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (PARAGUASSU-CHAVES, 2001). Entretanto, no Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, pela primeira vez, em 1909, por

Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania* sp. idênticas à *Leishmania tropica* (WRIGHT, 1903 *apud* DEPAQUIT; LÉGER; FERTÉ, 1998), espécie do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do estado de São Paulo (PESSÔA, 1982).

Essa enfermidade possui ampla distribuição (Figura 1) em diversos países do Velho e Novo Mundos. Na Europa, é encontrada na região da bacia mediterrânea. No leste e norte da África e na Ásia é encontrada principalmente nos países do Oriente Médio. No Novo Mundo, a LTA tem ampla distribuição, desde o sul dos Estados Unidos da América (EUA) até o norte da Argentina, porém Chile e Uruguai ainda não apresentaram registros da doença (TAVARES-NETO *et al.*, 2003).

No contexto mundial, o Brasil divide 90% dos casos de leishmaniose cutânea com o Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2018). Portanto, o Brasil representa a área endêmica de maior importância médica, uma vez que possui os maiores índices de notificação da LTA, ocorrente em todos os estados brasileiros e associada a indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi* (BRASIL, 2014).

Figura 1 – Mapa geográfico mundial ilustrando países afetados pela leishmaniose cutânea, no ano de 2016. **Modificado de:** World Health Organization (WHO), 2018.

A leishmaniose visceral (LV) também ocorre em vários países do Velho e Novo Mundos (Figura 2), sendo que alguns países são classificados com transmissão

esporádica como Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Bolívia e México, países com transmissão estável ou controlada como Colômbia e Venezuela e países com transmissão em expansão como Argentina, Brasil e Paraguai. O Brasil é um dos países endêmicos mais importantes e divide com Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão mais de 90% dos novos casos de LV no mundo (WHO, 2018).

Assim como em outras localidades, tal como o Sudoeste da Ásia, África e Europa, a LV é causada pela *L. (L.) infantum* e os cães (*Canis familiaris*) são apontados como o principal reservatório doméstico desta doença (MORENO; ALVAR, 2002). Por isso, a infecção canina é epidemiologicamente importante, por ser mais eminente, proceder a infecção em humanos e por apresentar um alto número de animais assintomáticos que “hospedam” os parasitos, contribuindo com a transmissão do protozoário (LAURENTI *et al.*, 2013).

Figura 2 – Mapa geográfico mundial ilustrando os países afetados pela leishmaniose visceral, no ano de 2016. **Modificado de:** WHO, 2018.

Estudos epidemiológicos demonstram que estão ocorrendo mudanças nas características da doença, possivelmente relacionado às mudanças socioeconômicas e comportamentais decorrentes do processo de globalização e industrialização que levam a desmatamentos, construção de barragens e à urbanização (SILVA; MUNIZ, 2009). Esses fatores causam alterações ambientais, contribuindo também na redução da

biodiversidade de mamíferos, podendo assim elevar a uma concentração das fêmeas dos vetores, de se alimentarem do sangue humano e de reservatórios adaptados a viverem com o homem, como os cães e gatos (CAMPBELL-LEDNUM *et al.*, 2001). Embora existam algumas medidas profiláticas clássicas, como o uso de repelentes, telas e mosquiteiros, elas não têm sido úteis para impedir o avanço das leishmanioses nos países endêmicos (CURTI *et al.*, 2009). Sendo assim, intervenções farmacológicas para a terapia das leishmanioses, juntamente com o controle dos vetores são necessárias para combater esse agravante problema de saúde pública.

2.2 – Aspectos gerais da biologia da leishmaniose

A leishmaniose é transmitida ao homem (e também a outras espécies de mamíferos) pelas fêmeas de flebotomíneos (ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae) infectadas com parasitos do gênero *Leishmania*, que realizam o repasto sanguíneo no hospedeiro (por serem hematófagas obrigatórias devido à necessidade da ovoposição, alimentam-se de animais vertebrados de sangue quente [MORRISON *et al.*, 1993]) e regurgitam conjuntamente com a saliva as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* sp. na derme do hospedeiro (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2010).

Os flebotomíneos podem ser encontrados no mundo inteiro, mas predominam em climas tropicais, subtropicais e temperados e multiplicam-se próximo a restos orgânicos (LAISON, 1992). Esses vetores são insetos pequenos, medindo cerca de 3 mm, de cor palha ou castanho, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (FERREIRA, 2012).

O gênero *Leishmania* foi dividido em dois subgêneros, de acordo com desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do vetor: *Leishmania*, presente no Velho e Novo Mundo, instalam-se no intestino anterior e *Viannia*, restrito ao Novo Mundo, se instala no intestino posterior do vetor (LAINSON; SHAW, 1988; FERREIRA, 2012).

Parasitos deste gênero apresentam ciclo de vida heteroxeno (Figura 3), ou seja, desenvolvem seu ciclo de vida em mais de um hospedeiro. Portanto, dependem de um

invertebrado como vetor biológico (as espécies de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus*, *Lutzomyia* e *Psychodopygus*) para o seu ciclo de vida e modo de transmissão, por repasto sanguíneo das fêmeas hematofágicas do inseto vetor. Além disso, também podem fazer parte do ciclo biológico, hospedeiros reservatórios definitivos (como cães e roedores) e hospedeiro acidental (homem) (BARAK *et al.*, 2005; MAURER; DONDJI; STEBUT, 2009).

Estes parasitos possuem duas formas morfológicas (Figura 4): a forma amastigota intracelular em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), como as células dentríticas e macrófagos do hospedeiro vertebrado e a forma promastigota livre, encontrada no trato digestório do vetor flebotomíneo. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em mamíferos infectados, ingerindo macrófagos e monócitos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*.

No interior do intestino do vetor ocorre a lise celular de macrófagos e a liberação das formas amastigotas que sofrem processos de divisão, multiplicação e diferenciação até alcançarem a forma promastigota. Ao se diferenciarem em forma promastigota, os parasitos se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. Então, as formas promastigotas diferenciam-se em paramastigotas, as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo, até se diferenciarem nas formas infectantes conhecidas como promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantes, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, regurgitam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com sua saliva, que são fagocitadas por macrófagos e se diferenciam no interior dessas células em formas amastigotas, multiplicando-se intensamente até a lise celular, culminando com sua liberação dos parasitos para o meio extracelular, facilitando a infecção de novas células (FERREIRA, 2012; CDC, 2016). O ciclo de vida destes parasitos é ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema ilustrado do Ciclo de vida de *Leishmania* sp. no inseto vetor e no ser humano. **Modificado de:** Center for Disease Control and Prevention (CDC) - Parasites - Leishmaniasis – Biology, 2016.

As formas amastigotas (Fig. 4A, seta) têm um formato oval de 2-6 μm de diâmetro, contendo um núcleo, um cinetoplasto (ou kinetoplasto), o kDNA, que é a região especializada da única mitocôndria encontrada nesses parasitos, e um flagelo interno. Enquanto que as formas promastigotas (Fig. 4B) apresentam formato longo e fino de 16-18 μm de comprimento, com um núcleo central, um cinetoplasto e um longo flagelo livre. Ambas as formas se reproduzem por divisão binária (FARRELL, 2002; FERREIRA, 2012).

Estes protozoários também contêm glicossomos, que são organelas essenciais para a regulação metabólica necessária à adaptação a ambientes tão diversos quanto os encontrados nos diferentes hospedeiros (MICHELS *et al.*, 2006).

Figura 4 – Formas morfológicas de *Leishmania* sp., em a) forma amastigota intracelular (seta): estruturas arredondadas pequenas, aflageladas b) formas promastigotas extracelulares: estrutura fusiforme, flagelada, com núcleo visível. Fotos de lâminas por microscopia de luz, fixadas e coradas por Giemsa (Aumento 40x). **Modificado de:** Fiocruz (Instituto Oswaldo Cruz), 2008.

Quando as formas promastigotas adentram na derme, ativam o sistema complemento e mediadores inflamatórios do hospedeiro (prostaglandinas, neutrófilos, células dendríticas [DCs], células apresentadoras de antígenos [APCs] e macrófagos), que são as primeiras barreiras do sistema imune inato que o parasito precisa “vencer” para que a infecção seja bem sucedida. A ativação deste sistema pode induzir a morte de parasitos, principalmente das espécies cutâneas que são mais sensíveis à lise pelo complemento do que as espécies causadoras da doença visceral (PASSERO; LAURENTI; SANTOS-GOMES, 2011). Os macrófagos são o tipo celular hospedeiro definitivo das formas amastigotas de *Leishmania* sp. São os mecanismos microbicidas dessas células que destroem os parasitos, em um quadro de controle de infecção na presença de citocinas do perfil T helper 1 (Th1). Neste quadro, ativa-se um fenômeno de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico – NO – (PEREIRA-CARVALHO *et al.*, 2013; DE ASSIS SOUZA *et al.*, 2013 VIEIRA *et al.*, 2013), levando à diminuição da carga parasitária.

A partir desse encontro, dos parasitos com os componentes inatos, os protozoários entram nas células hospedeiras finais (macrófagos, DCs e APCs), que deslocam-se para os linfonodos regionais, onde desencadeiam resposta imunológica (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). Se a APC apresentar antígenos a linfócitos T na presença de citocinas do perfil imunológico do tipo Th1 haverá a produção de IL-12, que induzirá a produção de interferon-gama ($IFN-\gamma$) e fator de

necrose tumoral α (TNF- α) pelos linfócitos T CD4, ativando os macrófagos a um estado leishmanicida, os quais produzem principalmente óxido nítrico (NO), auxiliando na resistência e eliminação do protozoário intracelular. Por outro lado, se durante a apresentação de antígenos a linfócitos T houver a produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4 ou IL-10, por exemplo), haverá manifestação da doença (MANSUETO *et al.*, 2007; PEREIRA-CARVALHO *et al.*, 2013).

Dependendo do tipo de resposta imune do hospedeiro, a infectividade, virulência e espécie do parasito, assim como o seu tropismo, podem-se manifestar diferentes quadros clínicos de leishmaniose, como as leishmanioses Cutânea/Tegumentar (LC/LT) ou Visceral (LV) (HEINZEL *et al.*, 1989; PAREDES *et al.*, 2003; LOPES, 2006).

No Novo Mundo, os parasitos do subgênero *Vianna* provocam somente leishmaniose cutânea e cutânea-mucosa (ou mucocutânea), enquanto os parasitos do subgênero *Leishmania* são os responsáveis pelas formas cutânea, anérgica difusa e visceral (DAVID, CRAFT, 2009). No Brasil, a única espécie causadora de leishmaniose visceral é a *Leishmania (L.) infantum* (sinonímia: *L. (L.) chagasi*) (CARNEIRO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; MICHEL *et al.*, 2011); já a leishmaniose tegumentar pode ser causada por diferentes espécies, como *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, entre outras (SILVEIRA *et al.*, 2009; SHAW *et al.*, 1991).

A LC é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, caracterizada por lesionar o tecido cutâneo e o cartilaginoso da nasofaringe, de forma localizada ou difusa, de acordo com a espécie envolvida e os fatores imunogênicos do hospedeiro (BASANO, 2004; DUNNING, 2009), e de acordo com suas características clínicas, pode ser caracterizada como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e leishmaniose cutânea disseminada (LCD).

A LCL é a forma clínica mais comum, manifestando-se com uma ou mais lesões localizadas, as quais podem se curar espontaneamente ou causar desestruturação dos tecidos cutâneos, e pode ser causada por qualquer espécie neotropical do gênero *Leishmania*, mas *L. (V.) braziliensis* é considerado o parasito mais relevante associado com a doença nas Américas (PIRES *et al.*, 2014). Uma característica da LCL é a infiltração das bordas das lesões, onde através da histopatologia é possível verificar infiltrados inflamatórios de grande densidade de macrófagos vacuolizados e repletos de

amastigotas, dando a aparência de um granuloma macrofágico. Porém em alguns casos, há pouco infiltrado inflamatório da pele ao redor da úlcera, e o número de macrófagos parasitados encontrados nestas áreas é baixo, assim, geralmente encontra-se mais linfócitos e outras células imunológicas, sendo estas as características de um granuloma epitelióide. Além dessas características, alguns pacientes apresentam as lesões ulceradas, mas também nódulos, lesões verrucosas e pápulas, levando a crer que a LCL seja um tipo de doença dérmica polimórfica (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; LEZAMA-DÁVILA *et al.*, 2014).

A LMC pode ser uma reincidência da LC nas membranas mucosas superiores e nas mucosas do trato respiratório do hospedeiro vertebrado. Esse quadro da doença dificilmente se cura por si só e é bastante difícil de tratar, pois além das lesões há infecções bacterianas secundárias frequentes, tornando o quadro potencialmente fatal (GOTO; LAULETTA, 2012; REVEIZ, 2013). Esta forma clínica está altamente associada à infecção por *L. (V.) braziliensis* e é caracterizada pela habilidade do parasito em realizar metástases através do sistema linfático ou do sangue, chegando a outras regiões do corpo e atingindo a mucosa com uma leve inflamação e bloqueio das vias nasais – LMC branda –, sucessivo de ulcerações da mucosa nasal e perfuração de tecidos do septo, podendo atingir, em alguns casos, os lábios, bochechas, palato mole e a faringe ou a laringe – LMC severa – (REITHINGER *et al.*, 2007).

A LCAD é uma forma clínica rara de leishmaniose que se manifesta em indivíduos com marcada deficiência imunológica, onde ocorrem diversas reações de imunodeficiência antígeno-específica mediada por células do paciente, causando lesões na pele semelhantes às lesões presentes em quadros de hanseníase. Indivíduos com LCAD possuem lesões generalizadas sobre a pele, formando nódulos e placas com uma natureza altamente deformante. Esta forma está associada à infecção causada por *L. (L.) amazonensis* (SILVEIRA, 2009).

A leishmaniose disseminada/*borderline* é uma forma clínica de LC também pouco comum, onde as lesões ocorrem meses após a cura de um quadro de LC e apresentam lesões disseminadas pelo corpo com características nodulares ou mesmo infiltrativas, podendo raramente estar acompanhadas de uma supressão dos mecanismos imunes mediados por células nos pacientes (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2005).

Em alguns países da América Central, como Honduras, Costa Rica, El Salvador e Nicarágua, foi descrita uma forma atípica de leishmaniose cutânea não ulcerada

(LCNU), em áreas de ocorrências frequentes de leishmaniose visceral, na qual observa-se lesões cutâneas autolimitadas e não ulceradas. A espécie *L. (L.) infantum* é apontada como o agente etiológico causador desta forma clínica (PONCE *et al.*, 1991).

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar, é uma doença crônica grave, caracterizada por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia (causadas pela inflamação do baço), hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade levando à caquexia e finalmente ao óbito se o paciente não for tratado (SILVEIRA *et al.*, 2010). A espécie causadora de LV na América Latina, Europa e norte da África é a *L. (L.) infantum*. Já no sub-contidente indiano e Leste africano a LV é causada por *L. (L.) donovani*. (DANTAS-TORRES, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2011; LEBLOIS *et al.*, 2011).

2.3 – Tratamento das leishmanioses

O tratamento medicamentoso das leishmanioses teve início nos princípios do século XX com o uso do tártaro emético, um antimonial trivalente, pelo médico brasileiro Gaspar Vianna. Porém, devido à elevada toxicidade, este fármaco foi substituído pelos antimoniais pentavalentes (Sb^V) na década 1940, sendo comercializados como Glucantime® (antimoniato de meglumina) ou como Pentostam® (estibogluconato de sódio) e, há mais de 70 anos, nenhum outro fármaco foi desenvolvido especificamente para o tratamento da leishmaniose. Os antimoniais representam, portanto, a primeira escolha para o tratamento desta doença.

Entretanto, os antimoniais têm limitações de uso, devido à alta toxicidade e graves efeitos colaterais como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade náuseas, dores abdominais e pancreatite química (com maior ocorrência em pacientes coinfectados com HIV) e, além disso, alguns raros casos de arritmias fatais ou mortes súbitas já foram relatados (AMATO *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2008; TORRES *et al.*, 2010). A via parenteral de administração aliada ao longo período (aproximadamente 20 dias) de utilização, acabam fazendo com que os pacientes abandonem o tratamento, resultando na consequente falha terapêutica (REITHINGER *et al.*, 2007). Existem ainda diversos relatos sobre a alta taxa de resistência parasitária aos antimoniais, como

constatado em Bihar, na Índia, onde medicamentos são adquiridos com facilidade e utilizados sem a orientação médica, fazendo com que o uso desorientado acabe induzindo pressão seletiva de parasitos mais resistentes (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Além disso, apesar de pouco comum, existem relatos de resistência aos antimoniais também pelo subgênero *Viannia*, na Colômbia (ROJAS *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Outros poucos fármacos atualmente disponíveis, como: AmB, pentamidina e a miltefosina, são fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento das leishmanioses quando há falha na resposta terapêutica aos antimoniais pentavalentes (KAUR; RAJPUT, 2014).

A AmB é um antibiótico polieno isolado pela primeira vez em 1955 da bactéria *Streptomyces nodosus* (DUTCHER *et al.*, 1957), que substituiu os antimoniais como tratamento em algumas partes da Índia, por conta da resistência dos parasitos a esses fármacos. A AmB é utilizada em pacientes coinfectados com HIV, que também têm infecções fúngicas e em pacientes com doenças sistêmicas causadas por fungos como *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. A AmB possui baixa solubilidade em água, por isso, precisa ser preparada em conjunto com desoxicolato de sódio (Fungizon®) e injetada via intravenosa.

Para o tratamento das leishmanioses, a AmB é bastante eficaz, com 90 a 97% de cura (GANGNEUX *et al.*, 1996; CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). Contudo, por ser administrada por via intravenosa, a AmB fica livre na corrente sanguínea e tem fraca seletividade em relação aos seus alvos, atingindo portanto, não só os parasitos, como também as células do hospedeiro vertebrado. Por esse motivo, pacientes apresentam efeitos colaterais, como nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal, o que limita o seu uso em indivíduos com estágio avançado de imunossupressão ou em gestantes (LEMKE; KIDERLEN; KAYSES, 2005).

Nas espécies de *Leishmania*, a AmB interage com a camada bilipídica de membrana plasmática, principalmente com os ergosteróis de membrana, levando à formação de poros e à perda da capacidade osmorregulatória do parasito (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). Por isso, diversos estudos têm sido realizados usando combinações com lipossomos e outras formas emulsificantes de AmB e têm demonstrado bons resultados para a obtenção da cura clínica das leishmanioses, juntamente com baixa toxicidade, pois a camada lipídica do lipossomo facilita a

aquisição pelas células presentes no fígado, contribuindo com a captação da AmB da corrente sanguínea para células-alvo. Entretanto, este tipo de tratamento apresenta alto custo, tornando-se, portanto, uma alternativa ainda pouco viável, sobretudo para países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (THAKUR *et al.*, 2001; AMATO *et al.*, 2004; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012; MURRAY, 2012; LEZAMA-DÁVILA *et al.*, 2014).

Para contornar essa problemática, diversos autores têm apontado sobre a necessidade de se caracterizar química e biologicamente novas moléculas candidatas à quimioterapia das leishmanioses (SCHMID *et al.*, 2012; PASSERO *et al.*, 2014; LAGO; TEMPONE, 2017). Assim, há algumas formas de se realizar buscas racionais, como a etnofarmacologia, que estuda o uso terapêutico de plantas e animais em grupos étnicos; a quimiotaxonomia, que visa a prospecção de substâncias químicas úteis a partir de um conhecimento pré-existente da taxonomia; a predição ou modelagem molecular, que permite o planejamento e identificação *in silico* de novos candidatos a protótipos ou de fármacos, ou até mesmo na otimização de um protótipo já existente (LANGER; KROVAT, 2003) e a técnica de reposicionamento de fármacos, que utiliza de fármacos já licenciados para o uso em uma determinada enfermidade. Como é o caso da própria miltefosina, originalmente desenvolvida como um fármaco anticâncer (CROFT; COOMBS, 2003), mas que se mostrou eficaz no tratamento de pacientes, na Índia, com leishmaniose visceral (SUNDAR *et al.*, 2002), mostrando taxas de cura de 94 a 97%, tendo assim sua utilização aprovada para o tratamento de leishmaniose. Contudo, a miltefosina também apresenta efeitos colaterais associados a distúrbios gastrointestinais, além do seu potencial teratogênico que impede o seu uso em mulheres grávidas. Vale ressaltar também relatos da existência de linhagens de *Leishmania* resistentes à miltefosina, bem como sua aplicação pouco eficaz no tratamento de infecções causadas por *L. (V.) braziliensis* na Colômbia (BERMAN; GALLALEE, 1987; SOTO, 2001; PÉREZ-VICTORIA; CASTANYS; GAMARRO, 2003).

2.3.1 – Reposicionamento de fármacos nas leishmanioses e o uso de nanocarreadores

Tendo em vista as dificuldades terapêuticas de diversas doenças e a complexidade da pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco, a triagem de

fármacos desenvolvidos para outros propósitos e já disponíveis na clínica médica vem se apresentando como uma das abordagens mais rápidas e eficazes para a introdução de novas terapias, essa estratégia é conhecida como reposicionamento de fármacos (DUEÑAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2008; EKINS *et al.*, 2011).

Estudos com o reposicionamento de fármacos têm apresentado bons resultados, uma vez que 30% dos 51 novos tratamentos lançados comercialmente em 2009 foram originados de reposicionamento (GRAUL *et al.*, 2010; TOBINICK, 2009).

Para estudar o reposicionamento de fármacos é necessário conhecer as características do fármaco e do sistema biológico que esse será empregado. Os fármacos atuais utilizados no tratamento das leishmanioses são interessantes exemplos de reposicionamento de fármacos, uma vez que os antimoniais eram originalmente utilizados como agentes eméticos, a anfotericina B como um fármaco anti-micótico e a própria miltefosina, caracterizada inicialmente como um fármaco anticâncer (CROFT *et al.*, 2003) e posteriormente como agente antileishmania através de estudos de reposicionamento de fármacos (SOTO *et al.*, 2001).

Com este tipo de estratégia, torna-se possível reposicionar os fármacos antifúngicos nas leishmanioses, pois estes são efetivos por serem capazes de inibir a formação de ergosterol em fungos, e como *Leishmania* sp. possui a rota biossintética de ergosterol (Figura 5) similar à de fungos, tais fármacos também podem ser efetivos contra estes parasitos (COTRIM *et al.*, 1999; CYRINO *et al.*, 2012).

Há ainda que se considerar que esta metodologia pode trazer um impacto positivo para a atual quimioterapia desta doença tropical negligenciada, que basicamente é feita utilizando dois fármacos e que vêm sendo utilizados há décadas. Para a realidade brasileira, a caracterização de novas atividades de fármacos já aprovados para uso clínico pode ser muito importante, pois diminuiria o tempo de pesquisas para caracterização de fármacos com ação antileishmania.

Tendo em vista as complicações com a terapia atual, diversos estudos têm focado seus objetivos na tentativa de encontrar terapias alternativas para o tratamento da leishmaniose. Recentemente o medicamento antitumoral tamoxifeno, com uso clínico contra o câncer de mama metastático, mostrou-se capaz de eliminar formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp., além disso, alcalinizou o vacúolo parasitóforo de macrófagos e interferiu na via de biossíntese de esfingolipídeos e no controle de infecções experimentais para as formas de LTA e LV, por administração via

intraperitoneal (MIGUEL, *et al.*, 2007; MIGUEL YOKOYAMA-YASUNAKA e ULIANA, 2008; MIGUEL *et al.*, 2009; MIGUEL, 2011).

No mesmo sentido, muitos fármacos que atuam na síntese de esteróis, substâncias lipofílicas presentes na membrana celular de eucariotos, que mantêm sua estrutura e funcionamento, como o colesterol (nas células de mamíferos) e o ergosterol (presente nas células de tripanossomatídeos e fungos), já foram liberados para uso em humanos (MACEDO-SILVA; DE SOUZA; RODRIGUES, 2015).

Leishmania sp., assim como outros tripanossomatídeos e fungos, sintetizam em suas membranas plasmáticas, 24 esteróis que compõe o esterol principal, que é o ergosterol, o qual regula a fluidez da membrana e também contribui para o crescimento e viabilidade do microorganismo. Este esterol é gerado a partir da via da acetilcoenzima A (acetil-CoA) através de uma rota de biossíntese complexa (ROBERTS *et al.*, 2003).

Essa rota biossintética (Figura 5) começa com duas unidades de acetil-CoA que se agregam para formar acetoacetil-CoA. Outra unidade de acetil-CoA se condensa para formar 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA). A enzima HMG-CoA redutase (HMGR) estimula uma reação de redução para a produção de ácido mevalônico. O próximo passo constitui a via isoprenóide e envolve reações que são catalisadas pelas enzimas IPP: isomerase e farnesil difosfato sintase (ou farnesil pirofosfato sintase, FPPS), respectivamente. O produto final da via isoprenóide, o farnesil difosfato (FPP) é o substrato para a enzima que catalisa o primeiro passo para a biossíntese de esterol: a esqualeno sintase (OLIVIER; KRISANS, 2000).

Após a síntese da esqualeno sintase, a via de biossíntese de esterol continua com a síntese de 2,3-oxidoesqualeno pela enzima esqualeno-2,3-epoxidase (SEO). Juntas, essas enzimas são responsáveis pela ciclização do esqualeno a lanosterol (1, Fig. 5). Seguida da síntese de lanosterol, ocorre a conversão de lanosterol em zimosterol, que é catalisado por uma monooxigenase contendo citocromo P-450 enzima conhecida como 14 α -metil-esterol-dimetilase ou C14 α -dismetilase (14-DM) (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009).

Seguindo a rota de biossíntese (de 7 a 13, na Fig. 5), várias transformações sequenciais ocorrem, como metilação, redução e isomerização para formar colesterol em mamíferos e ergosterol em tripanosomatídeos e fungos. Porém, para a produção e formação de ergosterol, há uma transferência de grupamento metila no carbono 24 (C-24), realizada pela enzima $\Delta^{24,25}$ -esterol-metiltransferase (EMT), pertencente à classe de

esterol metiltransferases, que catalisa a adição do grupamento metila ao C-24 do ergosterol. Para sequência dessa reação feita pela EMT, os substratos devem dispor de algumas características específicas para uma ligação mais eficiente do complexo enzima-substrato, tais como: um grupo hidroxila 3 β , uma cadeia lateral na configuração 20-R e uma dupla ligação (McCAMMON *et al.*, 1984; LEES *et al.*, 1995, NES, 2000).

Como é possível observar na Figura 5, a rota de biossíntese do ergosterol é bastante complexa, e a formação de um determinado intermediário envolve a ação de enzimas específicas. Assim, a inibição de um componente desta via, levará ao bloqueio da formação do ergosterol, afetando diretamente processos básicos de sobrevivência do parasito, como a fluidez de membrana, a resistência do parasito a pressão do meio, proliferação e expressão gênica. Isso sugere que a via de biossíntese de esteróis pode fornecer alvos promissores para o desenvolvimento de novos agentes antiprotozoários.

Assim, considerando que a biossíntese de ergosterol de *Leishmania* sp. é similar à de fungos e que diversos fármacos antifúngicos têm ação antileishmania, como a própria AmB, sugere-se que esta grande classe de medicamentos com ação central na rota metabólica de formação do ergosterol também devem apresentar ação antileishmania, pois supõe-se que a inibição de qualquer um dos intermediários do ergosterol, assim como as enzimas responsáveis pela sua produção/conversão, pode causar a morte do parasito (LEPESHEVA; WATERMAN, 2011).

Figura 5 – A figura ilustra a rota bioquímica da síntese de ergosterol em *Leishmania* sp e fungos. 1-13: Representação de esteróis intermediários ou produtos finais. 1: Lanosterol; 2: 24-Metileno-dihidrolanosterol; 3: 4 α ,14 α -Dimethylcolesta-8,24(24) -dien-3 β -ol; 4: 4 α ,14 α -Dimetilergosta-8,24 (24¹)-dien-3 β -ol; 5: 14 α -Metilcolesta-8,24-dien-3 β -ol; 6: 14 α -Metilergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; 7: Zimosterol (colesta-8,24-dien-3 β -ol); 8: Ergosta-8,24(24¹)-dien-3 β -ol; 9: Colesta-7,24-dien-3 β -ol; 10: Ergosta-7,24(24¹)-dien-3 β -ol; 11: Colesta-5,7,24-trien-3 β -ol; 12: Ergosta-5,7,24(24¹)-trien-3 β -ol; 13: Ergosterol (esgota-5,7,22-trien-3 β -ol). HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA; HMGR: HMG-CoA redutase; SEO: Esqualeno-2,3-epoxidase; 14-DM: 14 α -metil-esterol-dimetilase; EMT: $\Delta^{24,25}$ -esterol-metiltransferase. **Modificado de:** ROBERTS *et al.* (2003) e MACEDO-SILVA, DE SOUZA e RODRIGUES (2009).

O cloridrato de amiodarona é um fármaco bastante utilizado para tratar arritmias, por ser um potente vasodilatador (OLDFIELD, 2010). Esse fármaco também apresentou efeito na oxidoesqualeno ciclase em *Trypanosoma cruzi* (BENAIM *et al.*, 2006; OLDFIELD, 2010) e em *L. (L.) mexicana* apresentou efeito inibitório na esqualeno epoxidase (SERRANO-MARTÍN *et al.*, 2009). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram sua efetividade sobre *L. (L.) amazonensis* e *T. cruzi*, induzindo efeitos na proliferação, ultraestrutura e fisiologia mitocondrial (BENAIM *et al.*, 2006; de MACEDO-SILVA *et al.*, 2011). Em *L. (L.) amazonensis*, os valores de CE₅₀ foram 4,2 e 0,4 µM contra promastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente (MACEDO-SILVA *et al.*, 2011).

A amiodarona também apresentou efeito *in vitro* contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*, porém em estudo *in vivo*, os resultados demonstraram que, após 10 dias de tratamento, este fármaco mostrou-se inefetivo, mesmo quando administrado por duas vias diferentes – oral e intraperitoneal – (PINTO; TEMPONE, 2018).

Outro grupo de moléculas com potencial antileishmania são as estatinas, que compreendem um grupo de moléculas que inibem a enzima HMG-CoA redutase, sendo também eficazes no tratamento para diminuir o colesterol. Descobertas como inibidores de HMG-CoA redutase em 1976, a mevastatina foi originalmente isolada como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinium* (bolor encontrado em limões e laranjas) e outras estatinas como a lovastatina (ou mevinolina) foram isoladas posteriormente de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* (fungos encontrados no solo) (CAMPO e CARVALHO, 2007). Também são exemplos dessa classe de fármacos amplamente utilizadas na prática clínica: atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina e sinvastatina (SIRTORI, 2014).

Haughan, Chance e Goad (1992) realizaram uma associação terapêutica com miconazol e lovastatina para avaliar o efeito antileishmania *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) amazonensis* e verificaram que a combinação dos fármacos foi aditiva, sendo mais potente em termos de inibição da proliferação promastigota em *L. (L.) amazonensis* do que em *L. (L.) donovani*. E, em análise das composições de esterol das culturas de promastigotas, houve a inibição da 14-demetilase do esterol (ergosterol) pelo miconazol.

Similarmente, Dinesh, Soumya e Singh (2015) verificaram que a mevastatina inibiu promastigotas e amastigotas de *L. (L.) donovani* com valores de $CE_{50} = 23,8 \pm 4,2$ e $7,5 \pm 1,1 \mu M$, respectivamente, sem exibir toxicidade para a linhagem celular hospedeira. O efeito antileishmania da mevastatina foi associado à inibição da HMGR.

Em estudo realizado *in vivo*, Parihar *et al.*, 2016 verificaram que a sinvastatina foi efetiva contra *L.(L.) major*, reduziu o tamanho de lesão de pele nos camundongos tratados, bem como a carga parasitária com uso de tratamento sistêmico ou tópico.

No entanto, no tratamento para redução de colesterol, as estatinas apresentam efeitos colaterais relacionados a sintomas musculares como mialgia, miopatia e miosite com creatinina quinase elevada e outros efeitos colaterais que podem ser mais graves, incluem diabetes mellitus tipo 2 de início recente, efeitos neurológicos e neurocognitivos, hepatotoxicidade e toxicidade renal (MACIEJAK *et al.*, 2013; WARD; WATTS; ECKEL, 2019), dificultando o processo de reposicionamento desses fármacos.

As alilaminas como a naftifina, terbinafina e butenafina são antifúngicos inibidores da esqualeno epoxidase, enzima chave para biossíntese do ergosterol, componente importante para a síntese da membrana celular em muitos fungos e *Leishmania* sp. (RYDER, 1992; LEYDEN, 1998).

Vannier-Santos *et al.* (1995) demonstraram que a terbinafina, medicamento antifúngico, apresentou efeito contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Esse estudo foi reforçado nos experimentos realizados por Andrade Neto (2013), no qual formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* incubadas com diferentes concentrações de terbinafina *in vitro*, por 72 horas, apresentaram CE_{50} de $4,8 \mu g/mL$ e $2,6 \mu g/mL$, respectivamente, sendo capaz de inibir o crescimento dos parasitos, induzindo diversas alterações na organização estrutural da mitocôndria destes.

Embora tenha eficiência *in vitro*, já foi demonstrado que a terbinafina é ineficaz como agente terapêutico na leishmaniose humana (FARAJZADEH *et al.*, 2016). Ainda assim, os dados disponíveis demonstram que a esqualeno epoxidase de *Leishmania* sp. pode ser um importante alvo para o desenvolvimento ou caracterização de inibidores mais específicos, tal como o fármaco cloridrato de butenafina, que apresentou efeito *in vitro* contra as formas amastigotas das espécies dermatotrópicas *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, com valores de CE_{50} de $6,7 \mu g/mL$ e $7,8 \mu g/mL$, respectivamente.

Além disso, as formas promastigotas dos parasitos tratados com butenafina apresentaram alterações morfológicas externas e internas, como morfologia arredondada, citoplasma degradado e com destacamento da membrana celular formando estruturas conhecidas como *blebs*, além de mitocôndria e DNA nuclear fragmentados (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016).

Ainda que pertençam à mesma classe, estruturalmente os fármacos terbinafina e butenafina são diferentes (Figura 6), portanto, podem ter efeitos terapêuticos distintos na leishmaniose experimental ou mesmo humana. Assim como visto no estudo realizado por Das *et al.* (2010), no qual 76 pacientes com infecção dermatofita (tinea cruris) causada por *Trichophyton rubrum*, foram tratados durante 42 dias, com creme 1% de terbinafina (n = 37) e creme 1% de butenafina (n = 39), em que verificou-se que o uso do creme de butenafina apresentou maior eficácia do que o creme de terbinafina.

Figura 6 – Estrutura química das moléculas de terbinafina (A) e de butenafina (B). **Modificado de:** KRAUSS; STADLER; BRACHER (2017).

Na via da biossíntese de ergosterol, a ciclização da esqualeno a lanosterol é um passo muito importante para o controle dessa via, e os azóis são uma classe conhecida de fármacos que são capazes de inibir essa enzima, e são frequentemente usados para tratar micoses sistêmicas e locais, como é o exemplo dos fármacos antifúngicos clotrimazol, itraconazol, cetoconazol e o fluconazol (RYDER, 1992).

O clotrimazol foi o primeiro azol oral usado para micoses humanas. No entanto, seu uso foi limitado devido a múltiplos efeitos colaterais. Então outros azóis foram desenvolvidos para diminuir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia, como

cetoconazol, itraconazol, fluconazol, posaconazol e voriconazol (GRAYBILL e AHRENS, 1984; GUPTA, 2000).

Dogra e Saxena (1996) realizaram ensaios com o intuito de investigar a ação antileishmania do itraconazol, que age nas enzimas do citocromo P450 (CYP450) da parede celular de fungos (NIWA *et al.*, 2014), utilizando 20 pacientes com LC, que apresentavam lesões únicas ou múltiplas. Tais pacientes receberam dois comprimidos diários contendo 100 mg de itraconazol ou placebo. Após 15 dias de tratamento, quatro dos pacientes tratados com o itraconazol apresentaram resposta clínica, enquanto os pacientes do grupo placebo não apresentaram nenhuma resposta. Em seis semanas, apenas 2 pacientes do grupo itraconazol não responderam ao tratamento, e mais uma vez nenhum paciente do placebo teve resposta ou cura espontânea. Os pacientes foram acompanhados por três meses, sendo que de 10 pacientes, sete apresentaram cura clínica com o tratamento com itraconazol, e não apresentaram reincidência da doença, porém apenas pacientes com lesões recentes (menos de 4 meses) foram tratados, colocando em dúvida a eficácia deste fármaco diante de lesões mais severas.

O estudo desenvolvido por Salmanpour, Handjani e Nouhpisheh (2001), também demonstrou que o cetoconazol, fármaco antifúngico que age na enzima 14- α -demetilase fúngica que é necessária para a conversão do lanosterol aos intermediários de ergosterol, também apresentou efeito terapêutico na leishmaniose cutânea do Velho Mundo, nas doses de 600 mg/dia (em adultos) e 10 mg/kg (em crianças) que foram administradas durante 28 dias. De acordo com esse estudo, a eficácia do cetoconazol foi superior à do antimoniato de meglumina, o qual foi administrado intralesionalmente na dose de 20 mg/kg durante 20 dias. Sendo assim, o cetoconazol foi mais efetivo, com o uso de uma dose menor. Além disso, apenas efeitos colaterais relativamente leves foram citados pelos pacientes tratados com o cetoconazol, como náuseas e dores abdominais leves. Embora alguns estudos mostrem a efetividade desse fármaco na terapia, também se verificam falhas terapêuticas deste medicamento (WEINRAUCH *et al.*, 1984; DEDET *et al.*, 1986; DAN *et al.*, 1986; SAENZ *et al.*, 1990; SINGH, SINGH e SUNDAR, 1995), sugerindo que a escolha desse fármaco para o tratamento das leishmanioses requer cautela.

Em 2002, Alrajhi *et al.* fizeram um estudo de ensaio clínico similar ao de Dogra e Saxena, porém os pacientes com LC foram tratados com fluconazol e placebo. Neste caso, foi visto que após três meses de tratamento com fluconazol, 79% dos pacientes

apresentaram cura clínica, enquanto apenas 34% do grupo placebo apresentaram cura, sendo o tempo de cura menor no grupo tratado com fluconazol quando comparado ao placebo. Em outro estudo com fluconazol de Daly *et al.* 2014, uma paciente venezuelana infectada com *L. (V.) braziliensis* apresentava leishmaniose cutânea disseminada. Como as lesões eram extensas, tratamentos locais não eram possíveis, e o tratamento oral utilizando a miltefosina não foi efetivo, assim como o tratamento com o antimoniato de meglumina não foi tolerado. Como medida alternativa, iniciou-se o uso oral de fluconazol (5 mg/kg/dia), e após 48 horas do início do tratamento as lesões regrediram, e a paciente não apresentou efeitos colaterais ao fármaco empregado. Após 10 dias de tratamento, macerados dos fragmentos das lesões de pele não induziram doença em animais experimentais. Mesmo após três anos do início do tratamento não houve reincidência. Outros trabalhos também corroboram a efetividade do fluconazol em estudos *in vitro* e *in vivo*, com ou sem associação de outros fármacos (SOUSA *et al.*, 2011).

Notoriamente, estudos do efeito terapêutico destes fármacos ocorreram devido à similaridade entre as rotas bioquímicas de formação do ergosterol em fungos e tripanossomatídeos. Assim sendo, acredita-se que inibir a formação deste esterol, que é um dos lipídios mais importantes para a formação das membranas biológicas de *Leishmania* sp., induz em alterações irreparáveis a estes parasitos.

Considerando a busca por fármacos que auxiliem na terapia das leishmanioses, que sejam menos tóxicos que os antimoniais e a AmB, e tentando maximizar seu efeito, e diminuindo a toxicidade, pode-se considerar o uso da nanotecnologia, que é um conjunto de técnicas e ferramentas que auxiliam no manuseio da matéria em escala nanométrica. Como é uma tecnologia interdisciplinar, a nanotecnologia tem grande aplicação na medicina, inclusive nos ramos de diagnóstico, terapia e entrega de fármacos em órgãos específicos (FIGUEIREDO, 2011).

Como um dos principais focos das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em países industrializados, a nanotecnologia é considerada como uma área prioritária de desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2013). O seu avanço nas áreas biomédicas e farmacêuticas possibilita cada vez mais a realização de pesquisas na área terapêutica, auxiliando na diminuição de toxicidade e na liberação controlada de fármacos em sistemas biológicos e na possível vetorização a alvos específicos (sítios específicos de células ou órgãos), além de aumentarem significativamente a

biodisponibilidade do fármaco (BAYOMI *et al.*, 1998; BERGSTRAND *et al.*, 2003). Assim, a partir da nanotecnologia, as indústrias farmacêuticas podem aprimorar formas farmacêuticas e com isso gerar novos produtos (CARLUCCI; BREGNI, 2009; PIMENTEL, *et al.*, 2007).

Estudos recentes têm dado atenção às formulações à base de lipídios (naturais ou sintéticos) como: lipossomas, nanocápsulas, dendrímeros, nano e microemulsões e formulações usando sistema autoemulsificação (GURSOY; BENITA, 2004), como tipos de nanocarreadores para encapsulação de ativos.

Os lipossomas são vesículas aquosas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios que apresentam um excelente sistema de liberação controlada de fármacos devido à sua flexibilidade estrutural (tamanho, composição e fluidez da bicamada lipídica), como à sua capacidade de incorporar variedade de compostos hidrofílicos (ANDRADE *et al.*, 2004) e hidrofóbicos (PONTES; CAETANO; SANTOS-MAGALHÃES, 1999). Os lipossomas podem ter tamanhos variados – de 20 nm até alguns micrometros – (SAPRA; ALLEN, 2003).

Já as nanocápsulas são sistemas de misturas heterogêneas (coloidais) vesiculares de tamanho nanométrico, utilizadas para a modulação, direcionamento e distribuição de fármacos hidrofóbicos, em que o fármaco fica aprisionado em uma cavidade interna oleosa, que é mantida por uma membrana polimérica (LEGRAND *et al.*, 1999; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

Os dendrímeros são macromoléculas poliméricas com um arranjo altamente ramificado e definido, que assume um tamanho à nanoescala. Este tipo de sistema possibilita o aumento da solubilidade e da biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis, pois em sua estrutura há a capacidade de possuir um núcleo central hidrofóbico e uma superfície hidrofílica (GILLIES; FRÉCHET, 2005).

Microemulsões e nanoemulsões são um tipo de sistema de liberação de fármacos composto por água, óleo e surfactante. A junção de diferentes tipos desses compostos (óleo e surfactante) pode formar um filme interfacial estabilizando os dois líquidos imiscíveis, criando uma solução líquida termodinamicamente estável, de baixa tensão interfacial, opticamente isotrópica (homogênea), límpida e com tamanho de gotícula variando de 100 nm a 1000 µm, caracterizando uma microemulsão, que é produzida por métodos que empregam pouca energia (LAWRENCE; REES, 2012; FANUN, 2012; GIBAUD; ATTIVI, 2012;). Ou formam uma solução transparente, que não possui

estabilidade termodinâmica, mas sim estabilidade cinética e pode sofrer floculação (agregação de partículas muito pequenas) e/ ou maturação de Ostwald, onde as moléculas de gotas pequenas difundem através do meio para encontrar gotas maiores, onde o potencial químico é menor, caracterizando assim uma nanoemulsão (SOLANS; SOLÉ, 2012; TADROS et al., 2004). Além disso, de acordo com Solans e Solé (2012), as nanoemulsões são produzidas por métodos que empregam grande quantidade de energia e ainda não existe um consenso sobre o tamanho das gotículas em uma nanoemulsão e os tamanhos mais citados na literatura variam de 20 nm até 100, 200, 300 ou no máximo 500 nm, baseando-se nas propriedades óticas da mistura e no seu uso pretendido (GUTIÉRREZ et al., 2008; GIBAUD; ATTIVI, 2012).

Formulações em sistema de autoemulsificação (SEDDS) são sistemas de liberação de fármacos cuja formulação consiste numa mistura homogênea de fármaco, lipídios (naturais ou sintéticos), emulsificantes e também cossolventes/coemulsificantes hidrofílicos que após fraca agitação, formam finas emulsões de óleo em água e gotículas de mesmo tamanho que aquelas observadas em micro e nanoemulsões – SMEDDS e SNEDDS, respectivamente – (SINGH *et al.*, 2009; GURSOY; BENITA, 2004).

Outra família de materiais em nanoescala é a de nanogéis, que são transportadores de microgéis coloidais que foram introduzidos recentemente como um sistema prospectivo de administração de fármacos para terapias de nucleotídeos. Nanogéis têm redes de polímeros hidrofílicos ou anfifílicos iônicos e não iônicos. Um exemplo é a rede catiônica nanoizada de nanogel de poli-óxido de etileno (PEO) e poli-etilenoimina (PEI). A interação de moléculas anfipáticas (moléculas que possuem região hidrofílica e uma região hidrofóbica) e aniônicas (ânions ativos) com PEO e PEI resulta na formação de dispersões aquosas estáveis devido à cadeia PEO, que une suas cadeias hidrofílicas às regiões hidrofóbicas dos complexos. Assim, as redes reticuladas de nanogéis liga-se a moléculas de fármacos de carga oposta, encapsulando-as em partículas submicrônicas, que aumentam a distribuição mediada por receptores (VINOGRADOV; BRONICH; KABANOV, 2002; VINOGRADOV, 2007).

3. JUSTIFICATIVA

- 1) Considerando a toxicidade dos fármacos atuais disponíveis para o tratamento das leishmanioses;
- 2) Os casos de resistência dos parasitos a estes fármacos;
- 3) O fato de os fármacos antifúngicos serem relativamente livres de efeitos colaterais e bem tolerados para humanos;
- 4) E a eficácia *in vitro* do cloridrato de butenafina contra espécies dermatotrópicas de *Leishmania* sp.

Torna-se claro que novos fármacos ou moléculas bioativas necessitem ser caracterizadas para que seja possível aumentar as opções terapêuticas direcionadas ao tratamento das leishmanioses. Além disso, o uso do reposicionamento de fármacos pode levar à diminuição do tempo de pesquisas em bancadas, tornando disponível em menos tempo o fármaco aos pacientes.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 – Objetivo geral

Avaliar a atividade terapêutica do fármaco antifúngico cloridrato de butenafina livre ou nanoencapsulado na infecção experimental causada por *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c e avaliar a eficácia *in vitro* de nanoformulações orais contra *L. (L.) infantum*

4.2 – Objetivos específicos

- a) Encapsular a butenafina em SNEDD para o tratamento oral das leishmanioses e avaliar sua atividade contra *L. (L.) infantum* (*in vitro*) e citotóxica;
- b) Nanoencapsular o cloridrato de butenafina em SNEDD e em nanogel para tratamento tópico da leishmaniose cutânea experimental;
- c) Avaliar a absorção cutânea da butenafina livre e nanoencapsulada em SNEDD e nanogel;
- d) Comparar a evolução clínica das lesões do grupo controle infectado não tratado com os grupos tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada (SNEDD e nanogel) e com o antimonio de meglumina;
- e) Comparar o parasitismo cutâneo do grupo controle infectado não tratado com os grupos tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com o antimonio de meglumina;
- f) Avaliar os cortes histológicos das lesões dos grupos infectados não tratados, tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com antimonio de meglumina;
- g) Comparar a produção das citocinas IFN- γ e IL-4, do grupo controle infectado não tratado, com os grupos tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com o antimonio de meglumina;
- h) Avaliar as alterações histológicas de pele de animais não infectados e tratados com butenafina livre, nanoencapsulada e com o antimonio de meglumina,

MÉTODOS

5. MÉTODOS

5.1 – Parasitos

No presente estudo foram utilizadas as espécies *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/99/M17278 – isolada de paciente com LCL) e *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/cepa 46) as quais foram caracterizadas isoenzimaticamente no Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), Brasil. *L. (L.) amazonensis* foi mantida em camundongos isogênicos da linhagem BALB/c e após aproximadamente 60 dias de infecção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, para isolamento e expansão dos parasitos, que foi feito em cultura a 25 °C, em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI/mL de ampicilina. Formas amastigotas de *L. (L.) infantum* foram descongeladas e expandidas em meio M199 de maneira similar à *L. (L.) amazonensis*. Em todos os experimentos foram utilizadas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (obtidas após 5 dias de cultivo).

5.2 – Animais experimentais

Para os experimentos constantes no presente projeto, foram utilizados 160 camundongos machos da linhagem BALB/c, isogênicos, com 4 semanas de idade. Tais animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número: 098/17) e os experimentos utilizando tais animais foram realizados em conformidade com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP (CEUA-FMUSP). Os animais ficaram alocados no biotério do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP, nº 000372A), em ambiente com ventilação, ração e água *ad libitum*.

5.3 – Compostos e formulações

O antimoniato de meglumina foi adquirido pela Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) e foi solubilizado em água estéril, como sugerido pelo fabricante. O cloridrato de

butenafina ($\geq 98\%$ HPLC) foi obtido comercialmente da empresa Cayman Chem (Michigan, EUA). A butenafina foi administrada livremente e também em sistemas de entrega de fármacos (SNEDD) e em nanogel. Os glicerídeos poliglicólicos (capryol 90 [monocaprilato de propileno glicol], labrasol [L-polietilenoglicol-8-caprilato] e transcutol [éter monoetílico de dietilenoglicol]) e o polímero carbopol utilizados para a composição destes sistemas de entrega, foram gentilmente doados por Gattefosse (Saint-Priest Cedex, França). O SNEDD foi produzido pela mistura de labrasol, capryol 90 e transcutol (1:3:6) mais 0,1% de butenafina e foram magneticamente agitados durante 12 horas, à temperatura ambiente. Para produzir o nanogel, foi elaborado o agente gelificante carbopol 4% (1,0 g) e misturado com 0,5 g de SNEDD contendo 0,3% de butenafina. O SNEDD e o nanogel em branco foram produzidos de forma semelhante à descrita acima, mas sem butenafina. Esta parte do projeto foi feita em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Akaterina Lalatsa da Universidade de Portsmouth (Inglaterra). A caracterização física das nanoformulações, como viscosidade, estabilidade e porcentagem de carregamento já foi efetuada, entretanto, não pode ser mostrada pois o sistema de nanoformulação ainda está em processo de patente.

E, em trabalho realizado em conjunto com a Prof^a. Dra. Dolores Remedios Serrano, da Faculdade de Farmácia da Universidade Complutense de Madrid (Espanha), a butenafina foi formulada em SNEDD para tratamento oral.

A butenafina foi solubilizada em óleos excipientes comumente usados em formulações lipídicas na nanomedicina: capryol 90, peceol (monoleato de glicerila) e labrasol, em 4 formulações líquidas com a diferença de fatores como: o tipo de excipientes de dióxido de silício (Aerosil 200[®] e R972[®]) e as proporções de 1:2 ou 1:3 (Tabela 1). Após o preparo, as formulações líquidas foram dispersas em uma mistura de aerosil com etanol, em agitação magnética por 1 hora e após esse período, essa solução foi seca por pulverização com atomizador Büchi B-191 a 62 °C.

Tabela 1 – Composição das formulações de SNEDD de butenafina para tratamento oral

Composição (mg)	F1	F2	F3	F4
Capryol 90	526	598	526	598
Labrasol	244	115	244	115
Peceol	250	270	250	270

Aerosil 200®	2000	1500	0	0
Aerosil R972®	0	0	2000	1500
Butenafina	30	35	30	35

Após a secagem por pulverização, o efeito dos dois fatores em cinco diferentes parâmetros de respostas foi investigado: i) ângulo de fluidez de pó; ii) rendimento; iii) encapsulação de fármaco; iv) análise morfológica e v) porcentagem de fármaco dissolvido a 60 min (estudo de dissolução).

i) Ângulo de fluidez de pó

A fluidez do pó foi avaliada através do ângulo de repouso. Para isso, cerca de 500 mg de cada formulação em pó foi adicionada em um funil suspenso em uma coluna de leito fixa, colocado a 10 cm da superfície. Em seguida, a inclinação do cone criado entre o pó e a superfície foi calculada usando a seguinte equação do ângulo de repouso:

$$\text{AoR} = \tan^{-1} \frac{h}{r}$$

Onde h = altura e r = raio

ii) Rendimento

O pó resultante da atomização foi coletado e o rendimento do processo foi determinado seguindo a equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa coletada (mg)}}{\text{Massa total (mg)}} \times 100$$

iii) Encapsulamento de fármaco

Cada uma das formulações sólidas de SNEDD de butenafina foram pesadas (10 mg), dissolvidas em 0,5 mL de DMSO, submetidas a agitação durante 5 minutos e depois diluídas em acetonitrila (1/40) e a encapsulação de cada formulação foi quantificada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HP1100, Agilent, EUA), utilizando a coluna cromatografia ODS (Sphereclone:150 nm x 4,6 mm, 5 µm, 80 Å). A fase móvel de metanol/água (78:22) foi bombeada a 1,4 mL/min e o volume da amostra injetado foi de 20 µL. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C e o detector foi ajustado a 220 nm e a análise cromatográfica isocrática foi feita durante 30 minutos. Para mensurar o encapsulamento de cada nanoformulação, utilizou-se uma curva constituída ($R^2 = 0,9497$) por quatro concentrações conhecidas de butenafina (9,4; 11,5; 9 e 12,0 µg/mL).

iv) Estudo de dissolução de butenafina e morfologia de But-SNEDD

Os estudos de dissolução das formulações sólidas (500 mg) foram realizados a 37 °C por 60 minutos em fluido gástrico simulado (SGF - 500 mL de solução tampão pH 1,2), seguido mais 60 minutos consecutivos em fluido intestinal simulado (SIF - adicionou-se 400 mL de solução tampão até atingir o pH 6,8) em um sistema de dissolução teste (tipo Erweka DT80, Alemanha). Em diferentes períodos experimentais (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos), uma amostra de 2 mL de cada formulação em dissolução foi coletada, filtrada através de um filtro de membrana Millipore Millex PTFE (0,45 µm), diluída (1/2) com acetonitrila e a concentração de butenafina quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência ($R^2 = 0,94$), como citado acima. E a morfologia das formulações sólidas foi examinada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio eletrônico (JEOL JSM 6335F Ltd, Japão) a 5 KV. As amostras foram fixadas em uma peça de latão com fita adesiva dupla face e vácuo revestido com ouro (Au) por 180 s (Q150RS, Lewes, Reino Unido).

Experimentos *in vitro*

5.4 – Avaliação do potencial antileishmania e da citotoxicidade (*in vitro*) das nanoformulações de butenafina produzidas para tratamento oral de leishmaniose

5.4.1 – Ensaio antileishmania

As nanoformulações de butenafina foram diluídas em solução fisiológica (PBS), obtendo-se a concentração de 10 mg/mL. Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* em fase estacionária de crescimento (2×10^7 promastigotas/mL) foram incubadas juntamente com as nanoformulações (0,56 a 100 µg/mL), a butenafina livre e o fármaco padrão miltefosina (0,56 a 100,0 µg/mL) em meio RPMI 1640. Como controles foram utilizadas as formas promastigotas cultivadas em meio RPMI.

As placas foram incubadas por 48h a 25 °C. Após este período, as placas foram centrifugadas a 3000 RPM por 10 min, a 4 °C e depois foram lavadas utilizando 200 µL de PBS por duas vezes. Em seguida, 50 µL de uma solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), a uma concentração de 4 mg/mL, foram adicionados aos poços e então as placas foram novamente incubadas a 25 °C por 4h. Ao final deste período, 50 µL de uma solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) foram adicionados a cada poço, e a placa foi novamente incubada por 18h a 25 °C. Em seguida, as placas foram lidas em leitora de ELISA usando o comprimento de 595 nm.

Para avaliar o potencial anti-amastigota das nanoformulações de butenafina, macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c foram coletados e plaqueados a uma concentração de 10^5 macrófagos/poço em placas com 24 poços, contendo lamínulas redondas por 24h, para aderência dos macrófagos. Após esse período, os poços foram lavados por três vezes com PBS, e então formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, em uma razão de 10 parasitos por macrófago (10^6 promastigotas/poço), foram adicionadas à cultura. Após 24h a 37 °C e 5% de CO₂ em incubadora umidificada, os poços foram lavados por duas vezes utilizando solução fisiológica, e então, a butenafina livre e as nanoformulações de butenafina (F1, F2, F3 e F4) foram adicionadas aos poços, nas seguintes concentrações: 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,0 µg/mL. O fármaco padrão miltefosina também foi adicionado em outros poços da

cultura na concentração de 25 µg/mL. As placas foram incubadas novamente por 48h, e após este período, os sobrenadantes foram recolhidos

Em seguida as lamínulas foram lavadas 2x com solução fisiológica, secadas à temperatura ambiente (TA), fixadas em metanol e então coradas por aproximadamente 10 minutos com Giemsa 5% e montadas sob lâminas. As lâminas foram observadas sob aumento de 400x, e cerca de 100 macrófagos por lâmina foram fotografados no software Axion Vision.

O índice de infecção (II) foi estimado de acordo com Passero *et al.* (2015) através da seguinte expressão:

$$II = \% \text{ macrófagos infectados } \times \frac{\text{amastigotas internalizadas}}{\text{macrófagos}}$$

A eficácia das nanoformulações, foi expressa com a concentração que elimina 50% da população parasitária (Concentração Efetiva 50% - CE₅₀). Foram realizadas comparações das CE₅₀s das nanoformulações em estudo com aquelas após tratamento com butenafina e miltefosina.

5.4.2 – Avaliação da citotoxicidade das nanoformulações

Cerca de 5x10⁵ macrófagos peritoneais isolados de camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, foram cultivados em placas de 96 poços em meio RPMI 1640 juntamente com as nanoformulações de butenafina, butenafina livre e miltefosina nas concentrações de 0,56 a 100,00 µg/mL. As placas foram incubadas em incubadora a 37 °C, 5% de CO₂, por 48h. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1000 RPM por 10 min a 4 °C e lavadas por 2 vezes com solução fisiológica, em seguida a viabilidade celular foi avaliada através da oxidação da resazurina (Life Technologies, EUA). Após duas horas, as placas foram lidas utilizando leitor de ELISA com filtro de fluorescência (emissão 580 nm e excitação 640 nm). A concentração citotóxica que elimina 50% da população celular (CC₅₀) foi calculada e estes dados foram comparados com os dados obtidos com o fármaco padrão miltefosina.

5.5 – Teste de absorção cutânea de butenafina

Para o teste de absorção cutânea foi utilizada pele de camundongos BALB/c. Após eutanásia, a pele de camundongos foi retirada e tricotomia foi realizada. Em seguida, a pele foi acondicionada na interface entre o compartimento doador e receptor de células de Franz, sendo a região de epiderme acondicionada no compartimento doador e a região da derme no receptor. O compartimento do receptor foi preenchido com uma solução de tampão acetato contendo 1% metanol, pH 5,5.

O experimento foi executado a 37 °C com um circulador de água constante externo e o meio receptor foi continuamente agitado com um agitador magnético. No compartimento doador da célula de Franz, foi adicionado solução de SNEDD ou gel contendo butenafina, Tefin e butenafina livre (solubilizada em DMSO). Todas essas amostras foram adicionadas à dose de 10 mg/g. Após 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minutos, 1 mL do compartimento receptor foi coletado, e estas amostras foram analisadas através da técnica de cromatografia líquida em sistema de HPLC, para quantificar os níveis de butenafina que difundiu através da pele.

Para quantificação da butenafina foi utilizado o equipamento Jasco PU-1580 pump, a Jasco AS-2050 Plus e um Jasco UV-1575 com detector visível de UV, utilizando o tampão metanol/água (78:22), a um fluxo constante de 1,4 mL/minuto, e comprimento de onda de 220 nm. Além disso, foram construídas curvas padrão contendo concentrações conhecidas de butenafina, variando de 0 a 10 µg/mL de butenafina. O fluxo em estado estacionário (J_{ss} , µg/cm²/h) foi calculado a partir da quantidade cumulativa de fármaco permeada versus tempo. O coeficiente de permeabilidade (cm²/h) foi calculado dividindo o fluxo com a concentração inicial do fármaco. Três repetições de cada experimento foram executadas.

Experimentos *in vivo*

5.6 – Infecção e tratamento experimental

Camundongos machos da linhagem BALB/c foram infectados subcutaneamente na base da cauda, com 2×10^7 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e cinco camundongos receberam apenas cloreto de sódio 0,9% (w/v) na base da cauda (grupo saudável). Quando as lesões se tornaram visíveis (4 semanas PI), os animais infectados foram divididos em grupos contendo cinco animais cada: o grupo 1 foi tratado topicamente com butenafina livre na concentração de 10 mg/g; o grupo 2 e foi tratado com o nanogel contendo butenafina 10 mg/g por via tópica; o grupo 3 foi tratado com o SNEDD contendo butenafina 10 mg/g; o grupo 4 foi tratado com 50 mg/kg de antimoniato de meglumina por via intralesional na base da cauda; os grupos 5, 6 foram tratados com os brancos do nanogel e SNEDD (sem adição do fármaco); o grupo 7 foi o grupo controle infectado e não tratado e o grupo 8 foi constituído por animais não tratados e não infectados (grupo controle saudável). A solução veículo que foi ministrada nos animais saudáveis e controle infectado – topicamente – foi constituída por PBS e 0,1% DMSO. Os animais foram tratados uma vez por dia, com aplicações diárias durante 15 dias.

Para o tratamento tópico, cada composto foi aplicado sobre a lesão, na base da cauda dos animais (PARIHAR *et al.*, 2016). O tratamento com antimoniato de meglumina foi efetuado intralesionalmente na base da cauda dos animais, de acordo com artigos anteriores publicados por nosso grupo (YAMAMOTO *et al.*, 2015), utilizando a dose de 50 mg/kg/dia.

As condições físicas dos animais foram monitoradas pelo menos uma vez por semana. Duas semanas após a última aplicação dos fármacos, os animais foram eutanasiados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Assim, os animais foram eutanasiados com a utilização de anestésicos inalatórios, como halotano. Em seguida, biópsias da pele dos grupos tratados e não tratados foram coletadas e mergulhadas em solução formol 10% tamponado com fosfato 0,01 M, para estudo histológico. Os experimentos com todos os grupos foram realizados três vezes.

5.7 – Tamanho da lesão e carga parasitária

A área de inoculação dos parasitos, na cauda dos animais, dos grupos tratados e do grupo controle infectado foi mensurada (com um paquímetro) semanalmente após a infecção, durante e após ao tratamento. O tamanho das lesões foram obtidos através da subtração entre as medidas das lesões dos grupos infectados e tratados com o grupo controle saudável.

A carga parasitária (CP) foi determinada através de diluição limitante. Um fragmento da lesão foi coletado, debridado e o fragmento obtido foi pesado, macerado em meio de cultura Schneider (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI de ampicilina. Cerca de 200 µL desse macerado foi adicionado em uma placa de 96 poços estéril em quadruplicata e diluições seriadas (1:4), em dodeuplicatas foram efetuadas. As placas foram incubadas a 25 °C, por 15 dias, para observação de formas promastigotas. Durante esse período cada placa foi observada, e a maior titulação em que foi possível observar formas promastigotas foi anotada e a avaliação da carga parasitária tecidual foi calculada através da expressão:

$$CP = \frac{\text{recíproco do maior título positivo} \times \text{diluição do material} \times \left(\frac{\text{vol. homogeneizado}}{\text{vol. 1}^{\text{o}} \text{ poço}} \times \text{diluição} \right)}{\text{Massa do órgão}}$$

5.8 – Preparação do antígeno total de *L. (L.) amazonensis*

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento foram lavadas três vezes com solução de tampão fosfato (PBS) a 3000 RPM por 10 minutos a 4 °C. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao pellet tampão salino fosfato (PBS) de pH 7,4 e um conjunto de inibidores de proteases diluídos a 1:1000 (Sigma, EUA). Posteriormente os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento em nitrogênio e descongelamento a temperatura ambiente. O antígeno total foi estocado a -80 °C (antígeno total – AgT). A concentração de proteínas foi avaliada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se uma curva padrão construída com albumina bovina.

5.9 – Análise da produção de citocinas e proliferação celular

Os linfonodos inguinais dos grupos experimentais foram macerados e lavados em meio RPMI suplementado. Em seguida, as células foram contadas com auxílio de azul de Trypan e as suas concentrações ajustadas a 2×10^6 células/mL em placas de 96 poços. Em seguida as células foram estimuladas com antígeno total (AgT) de formas promastigotas (10 µg/mL) de *L. (L.) amazonensis* e com mitógeno inespecífico Concanavalina A (1,0 µg/mL), como controle positivo. Como controle negativo, as células foram incubadas somente com meio de cultura RPMI (controle negativo). As placas foram incubadas por 72h em estufa umidificada a 37 °C, 5% CO₂, após o período os sobrenadantes foram coletados para quantificação dos níveis de IFN-γ e IL-4 através de ELISA de captura, usando *kits* comerciais (eBioscience). Após coleta de sobrenadantes, as placas foram centrifugadas a 1000 RPM, 10 min, 4 °C, lavadas com PBS por três vezes e, em seguida, a viabilidade celular foi avaliada através da oxidação da resazurina com uso do reagente PrestoBlue (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após duas horas, as placas foram lidas por fluorescência (580 nm – 640 nm), para mensurar a proliferação celular. Brancos foram constituídos por meio de cultura e Prestoblue. Os resultados foram normalizados usando a razão da fluorescência obtida entre os grupos estimulados com AgT pela fluorescência dos respectivos grupos de células cultivadas sem estímulo.

5.10 – Avaliação das alterações histológicas de pele nos animais tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com o antimoniato de meglumina

Camundongos BALB/c não infectados foram divididos em grupos, contendo cinco animais cada: o grupo 1 recebeu, topicamente, butenafina livre na concentração de 10 mg/g; o grupo 2 recebeu nanogel contendo butenafina 10 mg/g por via tópica; o grupo 3 recebeu o SNEDD contendo butenafina 10 mg/g; o grupo 4 recebeu 50 mg/kg de antimoniato de meglumina, por via intralesional; os grupos 5, 6 receberam os brancos do nanogel e SNEDD e o grupo 7 foi o grupo constituído por animais que receberam apenas solução veículo constituída por PBS e 0,1% DMSO (grupo controle saudável).

O tratamento, monitoramento das condições físicas e a eutanásia dos animais foram realizados como descrito no item 5.6.

Após a eutanásia, biópsias da pele dos animais de todos os grupos foram coletadas e mergulhadas em solução formol 10% tamponado com fosfato 0,01 M, para estudo histológico.

5.11 – Estudo histológico

As biópsias da pele dos animais dos experimentos descritos nos itens 5.6 e 5.10 foram incluídas em parafina para obtenção dos cortes. Os cortes parafinados foram corados por hematoxilina-eosina (HE) e observados em microscópio de luz, com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória e o parasitismo tecidual e as alterações teciduais da epiderme e derme.

Para analisar o parasitismo tecidual do experimento de infecção (item 5.6), foi realizada uma análise comparativa semiquantitativa, de acordo com a intensidade: nulo, raro, discreto, moderado e intenso (RIDLEY e RIDLEY, 1983).

5.12 – Forma de análise dos resultados

Os dados dos experimentos de produção das nanoformulações contendo butenafina foram analisados pelo teste ANOVA, usando Minitab 15 (Minitab Ltd., Coventry, U.K.) e pelo teste Tukey's. Os dados foram considerados significativamente diferentes, quando $p < 0,05$. Os dados foram plotados usando Origin X9 (Northampton, USA).

Os dados dos experimentos foram analisados inicialmente pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de múltiplos grupos. Uma segunda análise foi realizada, utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação de dois grupos independentes. Os grupos foram considerados significativamente diferentes uns dos outros, quando $p < 0,05$. Os testes estatísticos foram efetuados no *software* GraphPad Prisma 5.0. Foram realizados três experimentos independentes, e os resultados foram apresentados com a média $\pm$ desvio padrão de tais experimentos.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 – Encapsulamento da butenafina

6.1.1 – Caracterização física das nanoformulações (em SNEDD) de butenafina para tratamento oral

A solubilidade da butenafina foi encontrada em três excipientes óleos que são habitualmente usados na formulação de fármacos em sistema nanométrico, sendo eles: Peceol, Capryol 90 e Labrasol. Assim, com a construção de um diagrama de fases (Figura 7), foi possível avaliar as proporções de excipientes e quantidade de butenafina para a produção de um SNEDD líquido (labrasol 24%; capryol 51%, peceol 25%), capaz de diluir em água e com tamanho de partícula adequado (que foi estimado em 88,4 nm).

Figura 7 – Diagrama de fases: O tamanho de partícula das diferentes composições é representado nos retângulos brancos. Áreas azuis indicam um tamanho de partícula menor, enquanto áreas amarelas e vermelhas estão associadas a tamanhos maiores.

A Tabela 2 sumariza os resultados relacionados aos parâmetros físicos das nanoformulações produzidas com butenafina para uso oral, após o processo de pulverização. Nesse caso, verificou-se que as formulações F1 e F3, que contêm menor quantidade de SNEDD líquido (1:2), apresentaram ângulo de repouso de

aproximadamente 20°, por outro lado, as formulações F2 e F4 apresentaram menor ângulo de repouso (~15 e 8° respectivamente). Em relação ao rendimento do processo de pulverização, observou-se que a F1 (Aerosil 200® na proporção 1:2) foi a mais rentável, seguida por F2 (1:3) F4 e F3 (ambas feitas com Aerosil R972®). A eficiência de encapsulação foi similar nas formulações F1, F2 e F4, e estimou-se ser superior a 94%. A formulação F3 apresentou a menor eficiência de encapsulação (85,5%).

Tabela 2 – Respostas dos parâmetros das nanoformulações de butenafina para tratamento oral

Formulação	Ângulo de fluidez (°)	Rendimento do processo (%)	Eficiência de encapsulação (%)
F1	19,10 ± 5,46	69,86 ± 1,64	94,00 ± 0,01
F2	15,90 ± 3,08	59,23 ± 10,22	96,50 ± 2,47
F3	20,60 ± 0,28	31,95 ± 1,34	85,50 ± 4,60
F4	8,60 ± 1,56	47,4 ± 22,06	97,00 ± 2,12

A morfologia das quatro formulações foi observada usando microscopia eletrônica de varredura. Na Figura 8, pode-se observar que todas as formulações (F1, F2, F3 e F4) têm partículas do tipo microesferas, as quais contêm nanoesferas. As nanoesferas seriam gotículas do SNEDD formulado, dentro das microesferas de sílica. A formulação 1 (Fig. 8A) apresenta menor composição de agregados, o que sugere maior liberação da sílica (aerosil), quando comparada com as outras formulações (F2, F3 e F4), as quais são mais agregadas.

Figura 8 – Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura das formulações sólidas de SNEDD de butenafina A) Formulação 1; B) Formulação 2, C) Formulação 3 e D) Formulação 4. Barra representa 1 μm .

Os perfis de dissolução das formulações sólidas de butenafina foram realizados e meio que simula o pH gástrico (pH 1,2) (Figura 9). A dissolução máxima do fármaco da formulação 1 (F1) foi de aproximadamente 45% aos 60 minutos de reação. Por outro lado, verificou-se que as formulações F2, F3 e F4 tiveram aproximadamente 20% de butenafina liberada aos 60 min.

Figura 9 – Perfis de dissolução das formulações sólidas de SNEDD de butenafina em solução tampão de pH 1,2 (média % $\pm$ desvio).

6.2 – Avaliação do potencial antileishmania e da citotoxicidade (*in vitro*) das nanoformulações de butenafina produzidas para tratamento oral da leishmaniose

Formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* foram cultivadas na presença das nanoformulações de butenafina (F1, F2, F3 e F4) para tratamento oral, por 48 horas. Ao final deste período, foi avaliada a efetividade do tratamento com as nanoformulações, em comparação com as culturas não tratadas (controle positivo), tratadas com butenafina livre e tratadas com fármaco padrão (miltefosina).

As nanoformulações de butenafina F1 e F4, apresentaram melhor eficácia contra promastigotas de *L. (L.) infantum* (Tabela 3), com concentrações efetivas 50% (CE₅₀) de

24,38 $\pm$ 3,08 $\mu\text{g/mL}$ e 23,48 $\pm$ 3,21 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e índice de seletividade para formas promastigotas (SIp) estimados em 2,95 e 3,15, quando comparadas com as CE₅₀ de F2 (29,56 $\pm$ 3,03 $\mu\text{g/mL}$) e F3 (32,32 $\pm$ 3,26 $\mu\text{g/mL}$) e SIp de 1,37 e 3,09, respectivamente.

Em relação às formas amastigotas de *L. (L.) infantum*, as nanoformulações F1 e F2, formuladas com Aerosil 200®, apresentaram CE₅₀ estimadas em 71,78 $\pm$ 3,29 $\mu\text{g/mL}$ e 223,0 $\pm$ 3,22 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, com índice de seletividade para formas amastigotas (SIa) 1,37 e 0,18. Enquanto as nanoformulações F3 e F4, formuladas com Aerosil R972®, demonstraram maior eficácia, com CE₅₀ estimadas em 27,45 $\pm$ 2,97 $\mu\text{g/mL}$ e 8,26 $\pm$ 3,47 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, SIa 3,64 e 8,96.

Além disso, F3 e F4 também apresentaram menor citotoxicidade, sendo as CC₅₀ $\geq$ 100 para F3 e de 74,01 $\pm$ 3,07 para F4. A respeito da miltefosina, esse fármaco também apresentou efeito contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*, exibindo CE₅₀ de 7,30 $\pm$ 0,90 $\mu\text{g/mL}$ e 5,60 $\pm$ 0,70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, bem como citotoxicidade (CC₅₀) de 51,50 $\pm$ 3,50 $\mu\text{g/mL}$ levando a um SIp de 7,0 e SIa de 9,2. Esses valores são semelhantes aos documentados em estudos anteriores (SEIFERT, ESCOBAR e CROFT, 2010).

Tabela 3 – Avaliação do potencial antileishmania e da citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, das nanoformulações de butenafina (F1-F4) e butenafina livre.

Formulação	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) promastigotas	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) macrófagos	CE ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) amastigotas	SIp	SIa
F1	24,30 $\pm$ 3,08*	71,78 $\pm$ 3,29	52,22 $\pm$ 3,45	2,95	1,37
F2	29,56 $\pm$ 3,03	40,45 $\pm$ 3,09	223,0 $\pm$ 3,22	1,37	0,18
F3	32,32 $\pm$ 3,26	$\geq$ 100,00	27,45 $\pm$ 2,97*	3,09	3,64
F4	23,48 $\pm$ 3,21*	74,01 $\pm$ 3,07	8,26 $\pm$ 3,47*	3,15	8,96
Butenafina	31,74 $\pm$ 3,11	34,75 $\pm$ 3,57	37,62 $\pm$ 3,60	1,09	0,92
Miltefosina	7,30 $\pm$ 0,90	51,50 $\pm$ 3,50	5,60 $\pm$ 0,70	7,05	9,20

* $p \leq 0,05$ comparados com a Butenafina.

6.3 – Estudo de absorção cutânea

Os resultados obtidos (Tabela 4) indicam que as nanoformulações But-Gel e But-Snedd apresentaram um comportamento muito similar de permeação cutânea, uma vez que o fluxo delas foi maior em comparação à formulação But-Livre. O tempo de passagem destas formulações através da pele também foi inferior ao da But-Livre. As nanoformulações têm, portanto, uma maior permeabilidade e coeficiente de difusão do que a But-Livre.

Tabela 4 – Parâmetros de absorção cutânea de butenafina (média e desvio, n= 3)

Parâmetro	But-Gel	But-Snedd	But-livre
Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$52,16 \pm 2,73^*$	$51,29 \pm 0,34^*$	$35,60 \pm 12,10$
Tempo (min)	$2,14 \pm 0,01^*$	$2,60 \pm 0,01^*$	$5,28 \pm 0,01$
Permeabilidade (cm^2/h)	$5,22 \pm 0,27^*$	$5,13 \pm 0,03^*$	$3,56 \pm 1,21$
Coeficiente de difusão (cm/h)	$0,57 \pm 0,03^*$	$0,56 \pm 0,01^*$	$0,39 \pm 0,27$

* significância em comparação à But-Livre

6.4 – Tamanho das lesões e carga parasitária

Na Figura 10, é possível observar a progressão do tamanho de lesão dos grupos controle não tratados (infectado), dos grupos controle tratados com antimoníato de meglumina (Glu), dos grupos tratados com as diferentes formulações de butenafina (But-Snedd, But-Gel e But-Livre) e dos grupos tratados com os brancos (sem adição de butenafina) do nanogel e do SNEDD. Ao final do experimento, os animais tratados com But-Snedd, But-Gel, But-Livre e Glu apresentaram menor tamanho de lesão no ponto de inoculação dos parasitos quando comparados aos grupos: controle infectado não tratado e com os brancos do nanogel e do SNEDD. Ressalta-se que as diferentes formulações contendo butenafina tiveram eficácia similar ao tratamento intralesional com antimoníato de meglumina.

Figura 10 – Tamanho de lesão dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados topicamente com butenafina livre (But-Livre) ou nanoencapsulada (But-Snedd e But-Gel) ou intralesionalmente com antimoniatto de meglumina (Glu). O tamanho das lesões nos grupos tratados e no grupo controle infectado foi mensurado semanalmente durante a progressão da doença. Os resultados estão apresentados com a média e desvio padrão. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle infectado.

Em relação ao parasitismo cutâneo (Figura 11), observou-se que, em comparação ao grupo infectado não tratado e os grupos tratados com os brancos de SNEDD e nanogel, os tratamentos com as formulações contendo butenafina se mostraram eficazes ($p < 0,05$), sendo o nanogel (But-Gel) um dos mais eficientes, pois eliminou 92,1% do parasitismo cutâneo ($p < 0,05$), seguido da butenafina livre (85%). A Butenafina formulada a SNEDD apresentou menor eficácia (55%) na eliminação dos parasitos, em comparação a butenafina livre ou nanogel. Em adição, o antimoniatto de meglumina (Glu), administrado intralesionalmente, eliminou 98% de parasitos.

Figura 11 – Carga parasitária da pele de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados topicamente com os brancos das nanoencapsulações, com butenafina livre (But-Livre) ou nanoencapsulada a nanogel (But-Gel) ou SNEDD (But-Snedd) e intralesionalmente com o fármaco padrão antimoniatado de meglumina (Glu). Os resultados estão apresentados com a média e desvio padrão de três experimentos independentes contendo 5 animais por grupo. * $p < 0,05$

No estudo histológico de biópsias das lesões dos animais (Figura 12), alterações histopatológicas mais significativas foram observadas na derme, caracterizadas pela presença de um infiltrado inflamatório caracterizado basicamente por células mononucleares e por parasitismo cutâneo (setas). O grupo infectado não tratado e o grupo tratado com o branco do nanogel (Fig. 12A e B) apresentaram um intenso e difuso infiltrado inflamatório e intenso parasitismo. Os grupos tratados com o branco do SNEDD e com But-Snedd (Fig. 12C e D) apresentaram infiltrado inflamatório e parasitismo moderado. Os grupos tratados com But-Gel, But-Livre e Glu (Fig. 12E, F e G) apresentaram infiltrado inflamatório moderado, porém o parasitismo de But-Livre foi discreto e de But-Gel e Glu foi raro, enquanto que o grupo saudável (não infectado) não apresentou processo inflamatório e parasitismo nulo.

Figura 12 – Fotomicrografias de cortes histológicos de biópsias das lesões dos animais infectados com (*L.*) (*L.*) *amazonensis* (exceto grupo saudável - H) evidenciando o parasitismo cutâneo na derme dos grupos infectado não tratado (A), tratados com o branco do nanogel (B); branco do SNEDD (C); But-Snedd (D); But-Gel (E), But-Livre (F) e Glu (G) — (HE × 400).

6.5 – Produção de citocinas e proliferação celular

Quando comparados ao grupo controle infectado, os grupos tratados com nanogel de butenafina e butenafina livre revelaram significativo aumento dos níveis de IFN- γ (Figura 13A) e, apenas But-Gel apresentou aumento significativo de IL-4 (Figura 13B), por outro lado, o tratamento dos animais infectados intralesionalmente com antimoníato de meglumina levou a uma diminuição dos níveis de IFN- γ e IL-4.

Os grupos tratados apenas com os brancos (excipientes), não apresentaram diferenças significativas de produção de citocinas quando comparados grupo controle infectado não tratado.

Figura 13 – Quantificação de IFN- γ (A), IL-4 (B) da cultura de células extraídas dos linfonodos e estimuladas com antígeno total (AgT) de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10 μ g/mL) durante 72h. *p < 0,05.

6.6 – Avaliação de alterações histológicas da pele nos animais tratados com butenafina livre ou nanoencapsulada e com o antimoniato de meglumina

Na análise de alterações histológicas da pele de animais não infectados (Figura 14), nenhum grupo tratado com os brancos (Fig. 14B e C), formulações tópicas de butenafina nanoencapsulada (Fig. 14D e E) ou livre (Fig. 14F) apresentou alterações na epiderme ou na derme. Entretanto, o grupo tratado com antimoniato de meglumina, por via intradérmica, apresentou um processo inflamatório (Fig. 14G, seta) na derme, constituído basicamente por células mononucleares e polimorfonucleares.

Figura 14 – Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de animais tratados apenas com solução veículo (grupo saudável – A), com o branco do nanogel (B), branco do SNEDD (C), But-Snedd (D); But-Gel (E), But-Livre (F) e Glu (G) — (HE $\times$ 200).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Os tratamentos clássicos para leishmaniose, que se fundamentam principalmente nos antimoniais pentavalentes e na AmB, possuem uma série de efeitos colaterais como nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, febre, problemas gastrointestinais e alguns raros casos de arritmias fatais ou mortes súbitas já foram relatados (AMATO *et al.* 1998), além de tratamentos relapsos e a indução de resistência parasitária (DUTRA *et al.*, 2014), tornando a busca por novos alvos terapêuticos necessária. A esse respeito, estudos com o reposicionamento de fármacos têm apresentado interessantes resultados, uma vez que 30 % dos 51 novos tratamentos lançados comercialmente em 2009 foram originados de reposicionamento (GRAUL *et al.*, 2010; TOBINICK, 2009). Os medicamentos atualmente utilizados no tratamento das leishmanioses são exemplos de reposição de fármacos, uma vez que os antimoniais eram originalmente utilizados como agentes eméticos, a AmB como um fármaco antimicótico e a própria miltefosina (o mais novo fármaco empregado na terapia) também foi caracterizado inicialmente como um fármaco anticâncer (SOTO e BERMAN, 2006) e posteriormente como agente antileishmania através de estudos de reposicionamento de fármacos (FISCHER; VOSS; ENGEL, 2001; SOTO e SOTO, 2006; COSTA FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008; COELHO *et al.*, 2016).

Com esse tipo de estratégia, alguns estudos têm demonstrado ser possível também o reposicionamento de fármacos antifúngicos nas leishmanioses, pois esses são capazes de inibir a formação de ergosterol em fungos e *Leishmania* sp., como exemplos os ensaios com itraconazol no tratamento de pacientes com lesões recentes realizados por Dogra e Saxena (1996); o estudo com cetoconazol desenvolvido por Salmanpour *et al.* (2001); os trabalhos realizados por Vannier-Santos *et al.* (1995), demonstraram que a terbinafina, medicamento antifúngico, apresentou eficiência *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A terbinafina, assim como a butenafina, é um derivado da classe alilamina, cuja ação fungicida é mediada através da inibição da enzima esqualeno epoxidase, enzima chave para biossíntese do ergosterol, componente importante para a síntese da membrana celular em muitos fungos e *Leishmania* sp. (RYDER, 1992; LEYDEN, 1998).

Embora tenha eficiência *in vitro*, já foi demonstrado em animais experimentais que a terbinafina é ineficaz como agente terapêutico na leishmaniose (SAMPAIO *et al.*, 2003). Entretanto, a combinação de terbinafina com o antimoníato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea humana, causada por *L. (L.) tropica*, foi mais efetiva que o grupo tratado apenas com o antimoníato (FARAJZADEH *et al.*, 2016).

Embora a terbinafina não apresente grande eficácia em estudos utilizando seres humanos infectados naturalmente, as diferenças estruturais dos fármacos antifúngicos podem ter efeitos terapêuticos completamente distintos na leishmaniose experimental ou mesmo humana. Os dados disponíveis demonstram que a esqualeno epoxidase de *Leishmania* pode ser um importante alvo para o desenvolvimento ou caracterização de inibidores mais específicos, tal como o fármaco cloridrato de butenafina que apresentou efetividade *in vitro* contra *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016) e os achados recentes de Yamamoto *et al.* (2018), em que os medicamentos antifúngicos fenticonazol, tioconazol e nistatina também apresentaram efeito *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*.

Assim, no presente estudo, objetivou-se avaliar a ação terapêutica da butenafina livre (solubilizada em DMSO), nanoencapsulada em gel e Snedd na leishmaniose tegumentar cutânea experimental e, além disso, considerando o fato de que tratamentos por via oral são relativamente mais fáceis, sistêmicos e convenientes que a administração intravenosa, realizamos um estudo para o desenvolvimento de uma nanoformulação de butenafina para tratamento oral de leishmaniose, incorporando-a ao sistema de nanoformulação autoemulsificante (SNEDD) com maior biodisponibilidade e atividade antileishmania.

Para avaliar a fração solúvel máxima da butenafina em diferentes veículos, foram realizados estudos de solubilidade. Por conseguinte, capryol 90, labrasol e peceol foram selecionados como óleo, surfactante e co-surfactante para os But-Snedd com tamanho de partícula adequado. Estes excipientes foram selecionados com base nos seus valores de Equilíbrio Hidrófilo Lipofílico (EHL) para garantir a produção nanoemulsões estáveis em fase aquosa e à temperatura ambiente.

O diagrama de fases representado na Figura 7 mostra que a região maior indica a região de nanoemulsão. A região azul central indica melhor capacidade de auto-nanoemulsificação. Neste contexto, o SNEDD líquido otimizado foi composto de

capryol 90, labrasol e peceol em uma relação de volume de 2:1:1 e produziu as menores e mais estáveis gotículas de nanoemulsão (88,4 nm). Essas pequenas gotículas proporcionam uma grande área de superfície interfacial para a liberação e absorção do fármaco pelo transporte intestinal e linfático de medicamentos (IBRAHIM *et al.*, 2012).

As formulações de But-Snedds líquido foram então solidificadas com método de secagem por pulverização. As formulações de aerosil 200 apresentaram melhor rendimento do que as formulações de Aerosil R972®, isto é provavelmente devido à característica hidrofóbica do Aerosil R972® juntamente com o caráter hidrofóbico da butenafina. O ângulo de repouso também foi medido para avaliar a fluidez de pó (Tabela 2). Todas as formulações apresentaram valores de ângulo abaixo de 20°, indicando, portanto, excelente fluidez (USP, 2006) Esta é uma propriedade crítica que afeta o processamento farmacêutico, especialmente na pré-formulação e desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais, pois quanto mais fluído mais ele favorece a uniformidade de peso, bem como permite a obtenção de comprimidos com propriedades físico-químicas mais consistentes, além de obter maior eficiência da formulação (GOH, HENG e LIEW, 2018).

O carregamento ou encapsulação de fármacos, que é um parâmetro importante dos nanomedicamentos, está intimamente relacionado ao metabolismo de fármacos, efeitos colaterais assim como seus efeitos terapêuticos (SHEN *et al.*, 2017). As respostas deste parâmetro apresentaram altas porcentagens, sugerindo que a quantidade de butenafina é bem retida pelas nanopartículas.

Estas formulações foram expostas a um teste de dissolução, em meio simulando o pH gástrico de 1,2, numa tentativa de mimetizar as condições *in vivo*. Aos 60 minutos, 45% da formulação F1 permaneceu solubilizada e sem precipitação, em contrapartida, as formulações F2, F3 e F4 formaram dispersões turvas e precipitaram a 60 min. Essa diferença foi provavelmente devida a fatores de composição, como as formulações F2, F3 e F4, que apresentam maior quantidade de compostos lipídicos, podendo dificultar a liberação do composto ativo (HUMBERSTONE; CHARMAN, 1997).

Ao analisar a morfologia das quatro formulações, observou-se que a formulação F1 apresentou menor composição de agregados, o que sugere maior capacidade do fármaco em se liberar da sílica (aerosil) do que as outras formulações (F2, F3 e F4), que apresentaram um perfil mais agregado ao aerosil. Esta análise foi consistente com a obtida no estudo de dissolução discutido anteriormente, evidenciando que a

nanoformulação 1 (F1) de But-Snedd se dissolve e se libera melhor do aerosil do que as demais nanoformulações.

Em consideração aos estudos *in vitro* das quatro nanoformulações contra formas promastigotas e amastigotas (*L. (L.) infantum*) e na avaliação citotóxica em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, as nanoformulações de butenafina F3 e F4 mostraram-se eficazes, com baixa citotoxicidade e boa seletividade contra os parasitos, além de mais eficazes do que a butenafina livre (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2019). Sendo que as formulações F3 e F4, que apresentaram baixa liberação no simulador de pH fisiológico, foram menos tóxicas aos macrófagos e mais efetivas contra as formas amastigotas. Ambas as formulações foram preparadas com Aerosil R972[®], entretanto se a boa eficácia delas foi implusionada pelo excipiente em sílica (aerosil) em conjunto com sua hidrofobicidade, que pode melhorar captação de partículas pelos macrófagos, em comparação com partículas com superfície hidrofílica (SERRANO *et al.*, 2013) não está claro e mais estudos precisam ser feitos.

No entanto, quando os resultados são considerados em conjunto, é mais provável que a formulação F1 seja um sólido promissor à nanomedicina para o tratamento de LV, pois mantém características para maior solubilização e absorção oral, bem como apresentou atividade antileishmania em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*.

Uma das principais características relacionadas às formulações tópicas está relacionada à absorção cutânea da molécula desejada (KAUR *et al.*, 2018). Em relação à butenafina nanoencapsulada em nanogel e SNEDD (But-Gel e But-Snedd), verificou-se que essas formulações têm melhor capacidade de distribuição do fármaco e difusão rápida na pele, quando comparadas com But-Livre. Segundo Morrow *et al.* (2007), a penetração dérmica de fármacos encapsulados em nanoestruturas é maior em comparação à penetração dérmica do ativo livre, devido às interações dos lipídeos da nanoformulação com os lipídeos da pele juntamente com o pequeno tamanho das partículas.

Na avaliação da eficácia terapêutica da butenafina livre (solubilizada em DMSO), nanoencapsulada em gel e SNEDD na leishmaniose tegumentar cutânea experimental, camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foram submetidos ao tratamento com diferentes formulações contendo butenafina e apresentaram menor tamanho de lesão no local da infecção, e quando comparados aos

animais tratados com antimoniato de meglumina (Glu), não houve diferença no tamanho médio das lesões.

Além disso, verificou-se que os animais tratados com butenafina livre ou nanoformulada apresentaram menores cargas parasitárias, sendo que o grupo tratado com a nanoformulação em gel de butenafina teve um decréscimo de 92% do parasitismo cutâneo. O grupo tratado intralesionalmente com antimoniato de meglumina apresentou eficácia na eliminação de 98% dos parasitos. Esses dados são semelhantes aos achados de Wijnant *et al.* (2018), no tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* e tratados com Fungisome®, uma formulação alternativa de anfotericina lipossomal desenvolvida e comercializada desde 2003 na Índia (SANATH *et al.*, 2005), que apresentou reduções significativas no tamanho da lesão de animais tratados com 5 mg/kg e 10 mg/kg.

No estudo histológico, também foi possível verificar a redução da carga parasitária dos grupos But-Gel e Glu, associada a um processo inflamatório moderado.

As células predominantes nos infiltrados inflamatórios de cada grupo, foram os linfócitos, seguidos pelos macrófagos, os quais albergavam poucas formas amastigotas, sugerindo sua ativação durante a infecção (KAYE; SCOTT, 2011; LIU).

O estudo de produção de citocinas de células isoladas de linfonodos, sugere que somente a butenafina livre e formulada a nanogel estimularam a resposta imune celular dos animais, havendo aumento significativo na produção de IFN- γ , e, além disso, o grupo But-Gel também apresentou aumento significativo na produção de IL-4, o que indica que este grupo apresentou uma resposta imune celular mista (Th1 e Th2). Por outro lado, verificou-se que os animais tratados com antimoniato de meglumina (Glu) não produziram IFN- γ ou IL-4.

Para Lykens *et al.* (2010), a resposta imune celular mista é um dos principais fatores que determinam o desenvolvimento ou o controle da doença, particularmente porque o IFN- γ é um importante marcador de resistência, enquanto a de IL-4 é um marcador de suscetibilidade da infecção, e que pode levar à regulação do efeito inflamatório de IFN- γ . No entanto, os animais tratados com But-Gel produziram menores níveis de IL-4 quando comparado ao IFN- γ , sugerindo que adicionalmente ao efeito antileishmania da butenafina (BEZERRA-SOUZA *et al.*, 2016) a estimulação de uma resposta Th1 pode ativar macrófagos auxiliando a ação antileishmania da

butenafina, entretanto o aumento dos níveis de IL-4 pode estar associado à manutenção de baixos números de parasitos no sítio da infecção.

No estudo histológico da pele de animais saudáveis tratados com But-Snedd, But-Gel e But-Livre, nenhum animal desses grupos apresentou alterações na epiderme ou na derme. Por outro lado, animais tratados com injeções subcutâneas de antimoníato de meglumina apresentaram um processo inflamatório na derme constituído por células mononucleares e polimorfonucleares.

No estudo de Córdoba *et al.* (2012), foram relatadas reações locais ao tratamento intralesional com antimoníato de meglumina em nove pacientes e os autores consideraram que a hipersensibilidade tipo IV pode estar envolvida a essas reações. Além disso, os autores afirmam que a frequência das reações cutâneas ao Glucantime® provavelmente está subestimada devido à subnotificação.

Como demonstrado nesse estudo, dadas as questões da atual terapia da leishmaniose, com o uso de melhores ferramentas habilitadas pela nanotecnologia, é possível abrir um caminho para novas opções de tratamento e melhores taxas de sucesso terapêutico.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Os dados do estudo de produção do SNEDD de butenafina para tratamento oral sugerem que formulações F1, F3 e F4 apresentam potencial para um estudo *in vivo* relacionado à eficácia da butenafina por via oral no tratamento das leishmanioses;

No teste de absorção cutânea, verificou-se que a butenafina nanoencapsulada (But-Gel e But-Snedd) apresenta melhor capacidade de difusão de fármaco através pele, em comparação à But-Livre;

Os animais tratados com a butenafina nanoencapsulada (But-Gel e But-Snedd) ou livre (But-Livre) apresentaram menor tamanho de lesão e diminuição da carga parasitária, em comparação ao grupo controle infectado não tratado, e este resultado foi similar àquele dos animais tratados com antimoniato de meglumina (Glu) por via intralesional;

No estudo histológico, nas análises do parasitismo cutâneo na derme, também foi possível verificar a redução da carga parasitária desses grupos, caracterizada de moderado e difuso infiltrado inflamatório;

A análise da resposta imune celular dos animais, avaliada através do sobrenadante de células mononucleares de linfonodos, demonstrou que animais tratados com butenafina livre (But-Livre) apresentaram aumento na produção de IFN- γ , enquanto que os animais tratados com a butenafina nanoencapsulada em nanogel (But-Gel) apresentaram resposta mista (Th1 e Th2),

No estudo histológico da pele de animais saudáveis tratados com butenafina nanoencapsulada ou livre não apresentaram alterações na epiderme ou na derme, enquanto que animais tratados com injeções intradérmicas de antimoniato de meglumina apresentaram um processo inflamatório na pele.

Tomados em conjunto, esses dados preliminares sugerem que o reposicionamento do cloridrato de butenafina pode ser uma alternativa para o tratamento de leishmaniose.

ANEXOS

9. ANEXOS

1 – Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMSUP)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito terapêutico da butenafina na leishmaniose tegumentar americana**”, registrada com o nº **098/17**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Domingues Passero e Adriana Bezerra de Souza**, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/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) da Faculdade de Medicina da USP em 13.07.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 26-06-2017 Término: 26-06-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c
Nº de animais	105
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 13 de Julho de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

2 – Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEUA-IMT)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
 Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 14 de Novembro de 2017

Ilmo(a)

Dr(a). Luiz Felipe Domingues Passero
 (aos cuidados de Adriana Bezerra de Souza)

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do efeito terapêutico da butenafina na leishmaniose tegumentar americana**", registrada com o nº **000372A**, sob a responsabilidade de **Luiz Felipe Domingues Passero** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Vigência da Autorização: 05/09/2017 a 30/11/2019							
Finalidade	Pesquisa						
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Material	Quantidade		
					M	F	M+F
Camundongo isogênico	SPF- Balb/c	4 semanas	-	a ser Coletado	105	0	105
Origem: Biotério USP - Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP)					TOTAL		105

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

3 – Artigo publicado no período do mestrado

pharmaceutics

Article

Repurposing Butenafine as An Oral Nanomedicine for Visceral Leishmaniasis

Adriana Bezerra-Souza ¹, Raquel Fernandez-Garcia ², Gabriela F. Rodrigues ¹,
Francisco Bolas-Fernandez ³, Marcia Dalastra Laurenti ¹, Luiz Felipe Passero ^{1,4},
Aikaterini Lalatsa ⁵ and Dolores R. Serrano ^{2,*}

¹ Laboratory of Pathology of Infectious Diseases (LIM-50), Medical School, University of São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 455, 01246903 Cerqueira César, SP, Brazil

² Department of Pharmaceutics and Food Technology and Instituto Universitario de Farmacia Industrial (IUI), School of Pharmacy, University Complutense, Avenida Complutense, 28040 Madrid, Spain

³ Department of Microbiology and Parasitology, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

⁴ Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), São Vicente. Praça Infante Dom Henrique, s/n, 11330-900 São Vicente, SP, Brazil

⁵ Institute of Biomedical and Biomolecular Sciences, School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, White Swan Road, Portsmouth PO1 2 DT, UK

* Correspondence: drserran@ucm.es; Tel: +34-91-394-1620

Received: 30 June 2019; Accepted: 18 July 2019; Published: 20 July 2019

Abstract Leishmaniasis is a neglected tropical disease affecting more than 12 million people worldwide, which in its visceral clinical form (VL) is characterised by the accumulation of parasites in the liver and spleen, and can lead to death if not treated. Available treatments are not well tolerated due to severe adverse effects, need for parenteral administration and patient hospitalisation, and long duration of expensive treatments. These treatment realities justify the search for new effective drugs, repurposing existing licensed drugs towards safer and non-invasive cost-effective medicines for VL. In this work, we provide proof of concept studies of butenafine and butenafine self-nanoemulsifying drug delivery systems (B-SNEDDS) against *Leishmania infantum*. Liquid B-SNEDDS were optimised using design of experiments, and then were spray-dried onto porous colloidal silica carriers to produce solid-B-SNEDDS with enhanced flow properties and drug stability. Optimal liquid B-SNEDDS consisted of Butenafine:Capryol 90:Peceol:Labrasol (3:49.5:24.2:23.3 w/w), which were then sprayed-dried with Aerosil 200 with a final 1:2 (Aerosil:liquid B-SNEDDS w/w) ratio. Spray-dried particles exhibited near-maximal drug loading, while maintaining excellent powder flow properties (angle of repose <10°) and sustained release in acidic gastrointestinal media. Solid-B-SNEDDS demonstrated greater selectivity index against promastigotes and *L. infantum*-infected amastigotes than butenafine alone. Developed oral solid nanomedicines enable the non-invasive and safe administration of butenafine as a cost-effective and readily scalable repurposed medicine for VL.

Keywords: butenafine; SNEDDS; solid SNEDDS; spray drying; leishmaniasis; design of experiments

1. Introduction

Leishmaniasis is an infectious disease caused by parasites belonging to the *Leishmania* genus. The prevalence of leishmaniasis exceeds 12 million cases, and it is endemic in 98 countries in five continents. *Leishmania* parasites are transmitted by insect vectors from the genus *Lutzomyia* sp. or *Psychodopygus* sp. in the New World and *Phlebotomus* sp. in the Old World [1,2]. Leishmaniasis presents in the cutaneous (CL) and visceral (VL) leishmaniasis forms, depending on the type of host immune response and infecting parasite species [3,4]. In the New World, parasites of the subgenus *Viviana*

cause only CL and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) while parasites of the subgenus *Leishmania* are responsible for CL and VL [5]. VL is a chronic disease caused by *L. (L.) infantum* and *L. (L.) donovani* species [6–8] residing in host macrophages, mainly from spleen, liver, bone marrow, and lymph nodes, and is characterized by prolonged fever, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, anemia with leukopenia, hypergammaglobulinemia and hypoalbuminemia, weight loss, edema, and a debilitating state leading to weakening and ultimately death if untreated [6].

VL treatment mainstays involve pentavalent antimonials (SbV) and amphotericin B (AmB) as the first line in the developing and developed world, respectively [9]. Although they are both highly efficacious in vivo, SbV are linked to severe and frequent side effects, limiting their use [9], combined with a high rate of clinical resistance [10]. AmB, on the other hand, has shown limited resistance, but its clinical use is limited by the high cost, especially for safer lipidic formulations, such as Ambisome®, thermal instability, and nephrotoxicity [11,12]. Miltefosine, the only oral VL licensed treatment (licensed in 2003 in India), has several limitations as monotherapy, as its activity is highly dependent on the clinical form of leishmaniasis and the parasite strain, and patients frequently experience severe gastrointestinal disorders. In addition, it is teratogenic, and thus cannot be used in women of child-bearing age [13,14]. Miltefosine has a long elimination half-life (seven days) and a narrow therapeutic index, characteristics that limit the administered dose, which can lead to subtherapeutic levels over several weeks, encouraging the emergence of resistance [12,14,15]. Indeed, resistance has been reported in India (a country that alone accounts for 50% of the VL worldwide burden) and France [12]. Thus, available medicines for VL are outdated, impractical, insufficiently efficacious, or subject to resistance and unacceptable toxicities. Ideal treatments for VL should be able to possess greater than 95% efficacy, be orally administered, be stable in a tropical environment, be affordable, and require fewer than 11 days of treatment with an excellent side-effect profile [12,16].

Repurposing drugs is a strategy that has been crowned with success, as repurposed drugs have made up a third of all new commercially and clinically used drug treatments since 2009 [17,18]. Current VL drugs are interesting examples of repurposed drugs, since SbV, AmB, and miltefosine were originally used as an emetic, antifungal, and anticancer drug, respectively [14,19]. Butenafine is an allylamine drug, commonly employed in the treatment of fungal skin infections, such as ringworm, athlete's foot, jock itch, and pityriasis. Currently, it is only commercialised as a 1% cream for topical use. We have shown recent reports on how butenafine repositioning was effective in vitro against *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis*, ethiological agents of CL and MCL. Furthermore, parasite treated with butenafine showed morphological alterations that resembled programmed cell death, which is attributed to the blockage of the biosynthesis of ergosterol [20]. Butenafine has limited oral bioavailability, with 1.5–3% of the oral dose being recovered in the plasma an hour after a single oral dosing of radiolabeled butenafine (0.2 mg/kg) in rats [21]. Butenafine is highly metabolized in the liver (methylation, dealkylation, and hydroxylation) and only 0.03% of the oral dose has been recovered intact from the plasma after 4 h [21]. This concurs with levels of its major metabolite (1-napthoic acid) in the plasma, which ranged between 1%–100% of administered parent drug dose [21].

Here, we are reporting the development of an oral butenafine nanomedicine able to enhance its aqueous solubility, maintaining a solubilized state in the gastrointestinal to allow for enhanced oral absorption, in order to target the liver and spleen (i.e., organs where the *Leishmania* parasite resides in high concentration). We have shown that SNEDDS are able to enhance the oral bioavailability of poorly soluble drugs and enable therapeutic concentrations to be delivered in the liver and spleen [12]. Thus, we hypothesised that if butenafine is formulated with GRAS (Generally Regarded as Safe) excipients with known activity against different *Leishmania* strains [22], we can develop butenafine-loaded SNEDDS (B-SNEDDS) and solid SNEDDS (solid B-SNEDDS) with enhanced activity, as well as being able to maintain butenafine's oral solubilisation capacity in the gastrointestinal tract. To ensure that a stable, and ideally solid, cost-effective formulation is available, we used design of experiments (DoE) studies to prepare butenafine SNEDDS colloidal silicon dioxide spray-dried particles that can be easily compressed into cost-effective, easily scalable, solid dosage forms of a repurposed drug for VL.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Butenafine hydrochloride (purity $\geq 98\%$) was purchased from Cayman Chemical Co. (Michigan, MI, USA). SNEDDS excipients (Capryol 90 (propylene glycol monocaprylate), Labrafil M 1944 CS (oleoyl polyoxyl-6 glycerides), Labrasol (caprylocaproyl polyoxyl-8 glycerides), and Peceol (glyceryl monooleate)) were kindly donated by Gattefosse (Saint-Priest Cedex, France). Two Aerosil silicon dioxide excipients were used as inert solid carriers: Aerosil R972 from Degussa (Frankfurt, Germany) and Aerosil 200 from Evonik Industries (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of ACS reagent grade (Sigma Aldrich, Madrid, Spain) and were used as supplied. Solvents were of HPLC grade (Fisher, Madrid, Spain).

2.2. Solubility Studies of Butenafine

An excess quantity of butenafine was added to each of the excipients used in the preparation of SNEDDS, and the mixture was shaken (300 rpm) overnight at 25 °C in triplicate. The mixtures were centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and the supernatant (0.1 mL) was diluted with 10 mL of methanol. The absorbance was measured in a spectrophotometer (JASCO V-730 spectrophotometer Madrid, Spain) at 220 nm to determine the solubility of butenafine. A calibration curve was performed previously in methanol to establish the linearity between concentration and absorbance at 220 nm.

2.3. Pseudo-Ternary Phase Diagrams

Ternary phase diagrams were constructed to study the phase behaviour of oils/surfactants over the whole concentration range. The existence of a microemulsion (type II) region within this diagram was observed visually. A D-Optimal design was developed using different mixtures of Capryol 90, Labrasol, and Peceol by using Design Expert software (State Ease, Minneapolis, MN, USA). Mixtures were vortexed for 5 min. The particle size distribution (PSD) was measured after dilution in deionised water (1:1000 v/v) in a Microtrac Zetatrak (Microtrac, Montgomeryville, PA, USA). The optimal excipient combination leading to the smallest PSD upon dilution was selected, in order to solubilise the drug and perform further experiments.

2.4. Preparation of Liquid B-SNEDDS Formulations

Based on solubility and phase diagram studies, Labrasol, Capryol 90, and Peceol were selected as a high-hydrophilic-lipophilic balance (HLB) surfactant, a medium-HLB surfactant, and an oil, respectively. Optimal SNEDDS were prepared combining the three as Capryol 90:Labrasol:Peceol (51:24:25 w/w). Butenafine (30 mg/g) was solubilised in the resulting excipient mixture, which was stirred overnight in order to obtain a homogenous isotropic mixture.

2.5. Preparation of Solid B-SNEDDS Formulation

A mini-spray dryer (Büchi B-191) was employed for the preparation of solid B-SNEDDS. Aerosil 200 (hydrophilic fumed amorphous silica, 5–50 nm (Evonik industries, Darmstadt, Germany)) or Aerosil R972 (hydrophobic fumed amorphous silica, 16 nm (Degussa AG, Frankfurt, Germany)) were used as inert carriers. A carrier (1 g) was dispersed in 100 mL of ethanol by magnetic stirring, after which liquid B-SNEDDS formulation (0.5 g) was mixed. The resulting suspension was delivered to a two-fluid nozzle (0.7 mm nozzle tip and a 1.5 mm diameter nozzle screw cap) using a peristaltic pump, at a speed of 10% (5 mL/min). Compressed air (2 bars) was used as the drying gas in a co-current mode, with the aspirator capacity set to maximum (100%). The flow-meter for the standard two-fluid nozzle was set to 600 NL/h. The inlet temperature was fixed at 62 °C, and the outlet temperature varied

between 32 and 36 °C. After spray-drying, the dry powder was collected from the collector vessel, and the yield of the process was quantified using the following equation:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Collected mass after spray drying (mg)}}{\text{Total mass spray dried (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

A 2² DoE was performed to understand and optimise key formulation parameters affecting the preparation of solid B-SNEDDS. The surface properties of silica used, i.e., type of Aerosil (200 or R972), as well as the weight ratio between Aerosil and liquid B-SNEDD (1:2 or 1:3 *w/w*) on the physicochemical properties of the spray-dried product were investigated. Five different responses were studied: (i) powder flow, (ii) yield, (iii) drug loading, (iv) particle size upon dilution (1:1000 *w/w*), and (v) the percentage of drug release at 60 min in simulated gastric fluid (500 mL buffer solution of pH 1.2).

2.6. Characterisation of the Solid B-SNEDDS

2.6.1. Powder Flow: Angle of Repose (AoR) Measurements

The angle of repose (AoR) was determined according to the United State Pharmacopeia (<1174> Powder Flow) by using the fixed height funnel method (i.e., by measuring the cone height versus the base, formed by the powder falling through a plastic funnel placed 10 cm from the table surface until a stable cone was formed) [23]. AoR measurements were carried out by passing 500 mg of solid B-SNEDD in triplicate. After the powder was deposited on the surface, the height of the powder cone (*h*) and the radius of the base (*r*) were measured. The inclination of the cone created between the powder and the surface (α , AoR) was calculated using the following equation:

$$\tan(\alpha) = \frac{h}{r} \quad (2)$$

2.6.2. Particle Size Measurements

The particle size of both liquid B-SNEDDS and solid B-SNEDDS were determined at 25 °C after 1:1000 *w/w* dilution in deionised water. Solid B-SNEDDS were centrifuged (9000 rpm, 5 min) prior to measurements, in order to precipitate the insoluble carrier. The mean size ($n = 3$) by volume (nm) was measured using a Microtrac Zetatrak (Microtrac Inc., Montgomeryville, PA, USA), with an internal probe ranging from 0.0008 to 6.5 µm [24].

2.6.3. Release Studies

Release studies of solid B-SNEDDS (500 mg) containing 10 mg of butenafine were performed at 37 °C for 1 h in simulated gastric fluid (SGF; 500 mL buffer solution of pH 1.2), followed by a second consecutive hour in simulated intestinal fluid (SIF; 400 mL buffer solution of pH 6.8) in a calibrated dissolution apparatus (Erweka type DT80, Erweka, Heusenstamm, Germany). The SGF and SIF were prepared as described in the USP [25]. Based on predicted water solubility values (7.5×10^{-5} mg/mL, according to the Drug Bank Database [26]), release studies were performed in non-sink conditions, with the aim of testing a relevant pharmacological drug dose (10 mg). At different time points (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min), a 2 mL sample was withdrawn, filtered through a Millipore Millex PTFE membrane filter (0.45 µm), diluted 1:2 with acetonitrile, and injected in the HPLC. Butenafine concentration was quantified using an HPLC equipped with a Jasco PU-1580 pump, a Jasco AS-2050 Plus autosampler, and a Jasco UV-1575 UV-visible detector. Integration of the peaks was performed using the Borwin 1.5 software. Butenafine was separated on an Agilent Eclipse XDB-Phenyl reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase consisting of methanol/water (78:22 *v/v*) was pumped at 1.4 mL/min, and a sample injection volume of 20 µL was used. The column

temperature was kept at 25 °C, and the detector was set at 220 nm. Butenafine concentrations were calculated from a linear regression calibration curve between 100.0–0.1 µg/mL.

2.6.4. Drug Loading

Solid B-SNEDD formulations (10 mg) were dissolved in 0.5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO), vortexed for 5 min, and then diluted in acetonitrile (1:40 v/v) prior to drug quantification by the above-described HPLC method.

2.6.5. Morphological Analysis

The morphology of solid B-SNEDDS was examined using a scanning electron microscope (JEOL JSM 6335F Ltd., Akishima, Japan) at 5 kV. The samples were fixed on a brass stub using double-sided adhesive tape, and vacuum-coated with gold (Au) for 180 s (coater: Q150R S, Quorum, Lewes, East Sussex, United Kingdom).

2.6.6. Tableting and Hardness

In order to investigate the compression of the solid B-SNEDDS without the addition of any other excipient, solid B-SNEDDS (500 mg) were compressed using a Perkin Elmer hydraulic press (Waltham, MA, USA) and a 13 mm punch, and die set under different pressures of 0.5, 1.0, 3.0 or 5.0 tonnes for 15 s. Hardness was undertaken according to the European Pharmacopeia [27], using a Pharma Test PTB 311 instrument (Pharma Test, Hainburg, Germany). Tablets ($n = 3$) were individually evaluated, and the mean value of the force in Newtons (N) was reported.

2.7. In Vitro Efficacy and Toxicity Studies

2.7.1. Parasites and Cell Lines

The parasites were kindly provided by Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira from the cryobank of the Leishmaniasis Laboratory of Prof. Dr. Ralph Laison, Department of Parasitology, Ministry of Health, Evandro Chagas Institute (Belem, Para, Brazil). They were identified using monoclonal antibodies and isoenzyme electrophoretic profiles at the Leishmaniasis Laboratory of the Evandro Chagas Institute. The *Leishmania* species used was *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/72/46). Parasites in a late log stage were used for all experiments. Parasites were maintained in Schneider's Medium (SigmaAldrich, Madrid, Spain), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 50,000 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin.

BALB/c mice, 6 weeks old, were obtained from the Medical School of the University of São Paulo, Brazil, in order to collect peritoneal macrophages to perform the in vitro test against intracellular *Leishmania* amastigotes. To obtain the macrophages, the animals were anaesthetized with thiopental (1 mg/200 mL) and euthanized. This study was carried out in strict accordance with the recommendations detailed in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation (<http://www.cobea.org.br>). The protocol was approved by the Ethics Committee of Animal Experiments of the Institutional Committee of Animal Care and Use at the Medical School of Sao Paulo University (CEUA-FMUSP number 098/17).

2.7.2. In Vitro Promastigote Efficacy and Cytotoxicity

Promastigote forms of *L. (L.) infantum* (2×10^7 promastigotes/well) were incubated in a 96-well culture plate in RPMI 1640 medium, with pH 4.2 and drugs in a range of 0.01 to 400 µM. The negative control group was cultivated in medium and vehicle solution (PBS plus 1% DMSO). The parasites were incubated for 48 h at 25 °C, and washed with 200 µL of sodium chloride 0.9% (w/v) three times with centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4 °C, followed by the addition of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (9.6 µM). Four hours later, 50 µL of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) was added to each well. The plates were further incubated

for 18 h and read in an ELISA reader (Labsystems Uniscience Multiskan EX, Miami, FL, USA) at 595 nm. Effective concentration 50% (EC₅₀) was estimated using Graph Pad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Approximately 5×10^5 peritoneal macrophages from BALB/c mice were cultured in RPMI 1640 medium, with the drugs in a range of 0.01 to 400 μ M, in 96-well plates. As a negative control, macrophages were cultivated with vehicle solution. After 48 h, cell viability was analysed by the MTT method. Cytotoxic concentration 50% (CC₅₀) was estimated with Graph Pad Prism 5.0 software.

The selectivity indexes (SI) were calculated using the ratio CC₅₀/EC₅₀ toward promastigote (SIp) or amastigote (SIa) forms. EC₅₀ represents the concentration of the formulation that produced a 50% reduction in parasites, while CC₅₀ represents the concentration of the formulation that produced a 50% reduction of cell viability in treated culture cells with respect to untreated ones.

2.7.3. Macrophage Infection and Treatments

Peritoneal macrophages from BALB/c mice (5×10^5 macrophages) were cultivated in round cover slips in a 24-well plate, followed by infection with *L. (L.) infantum* promastigotes at a ratio of 10 parasites per 1 peritoneal macrophage. Plates were incubated at 5% CO₂ at 37 °C. After 24 h of the initial infection, drugs were added at 25, 50, or 100 μ M. Round cover slips from each experimental time point were dried at room temperature, fixed in methanol, and stained by Giemsa 5% (two drops). The infection index (II) was then estimated according to Passero et al. [28], using the following equation:

$$II = \% \text{ infected macrophages} \times \frac{\text{Internalized amastigotes}}{\text{Macrophages}} \quad (3)$$

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed via a one-way ANOVA test using Minitab 15 (Minitab Ltd., Coventry, UK), followed by Tukey's test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data was plotted using Origin X9 (Northampton, UK).

3. Results

3.1. Solubility Studies of Butenafine

The solubility of butenafine was tested in four different excipients (Peceol, Capryol 90, Labrasol, and Labrafil M1944CS) that are commonly utilized in the development of lipid-based formulations and have been shown to possess efficacy against leishmaniasis [22] (Table 1). Butenafine was more soluble in excipients with oleic acid lipids or triglycerides, i.e., Peceol and Labrafil M 1944 CS, followed by lower HLB excipients such as Capryol 90. Due to the low miscibility between Peceol and Labrafil, and the higher butenafine solubility in Peceol, Peceol was chosen as the oil phase to be combined with Capryol and Labrasol for the pseudo-ternary diagram and identification of the optimal composition (Table 2) able to yield microemulsions (type II) upon aqueous dilutions.

Table 1. Solubility of butenafine in various vehicles at 25 °C ($n = 3$).

Vehicle	Butenafine (mg/g)	HLB *
Peceol	24.68 $\pm$ 0.21	1
Capryol 90	15.79 $\pm$ 1.18	5
Labrasol	13.03 $\pm$ 3.94	12
Labrafil M 1944 CS	22.59 $\pm$ 1.66	9

* Hydrophilic-lipophilic balance of the vehicles; values obtained from Gatefosse website [29].

Table 2. Design of experiments (DoE) of liquid butenafine self-nanoemulsifying drug delivery systems (B-SNEDDS). Excipient quantities are expressed as a fraction, considering that the sum of all excipients was equal to 1 g. For each combination, the average particle size ($n = 3$) in numbers after dilution in de-ionised water (1:1000 w/w) was illustrated.

Experiment	Labrasol	Capryol 90	Pecceol	Particle Size (nm)
1	0.29	0.50	0.2	116
2	0	0.50	0.49	376
3	0	0.8	0.2	289
4	0.19	0.2	0.60	191
5	0.22	0.41	0.35	156
6	0.29	0.50	0.2	178
7	0.09	0.61	0.29	244
8	0	0.2	0.8	1735
9	0	0.50	0.49	410
10	0.39	0.34	0.26	107
11	0.4	0.2	0.4	101
12	0.12	0.35	0.52	167
13	0	0.2	0.8	1340
14	0	0.34	0.65	1180
15	0	0.8	0.2	352
16	0.19	0.2	0.60	141

3.2. Pseudo-Ternary Phase Diagrams and Preparation of Liquid B-SNEDDS Formulations

A ternary phase diagram (Table 2 and Figure 1) was constructed to study the phase behaviour of oil/surfactants over the whole concentration range. Particle size expressed in numbers led to a better predictive model with a higher R^2 than the one using values expressed in volume. The blue region indicates the self-nanoemulsifying region, with a lower particle size. The particle size optimisation studies suggested two optimal excipient combinations with the following composition:

- (1) Combination A: Pecceol:Capryol:Labrasol mixed at 27:58:15 w/w
- (2) Combination B: Pecceol:Capryol:Labrasol mixed at 25:51:24 w/w

Figure 1. Pseudo-ternary phase diagram of SNEDDS. In the white rectangles is indicated the particle size of each corresponding composition. The blue areas indicate a lower particle size, while yellow and red areas indicate larger sizes.

Validation studies were performed by preparing the suggested optimal mixtures, followed by measuring the particle size. The resulted particle size was 159.7 nm for combination A, and 88.4 nm for combination B. Based on these results, combination B was selected for further development of solid-B-SNEDD formulations.

3.3. Yield of Solid B-SNEDDS

Four different solid B-SNEDDS were manufactured utilising the vehicle mixture (combination B) above described. Two different hydrophobic, fumed silica carriers (Aerosil 200 or R972) were combined in two ratios (1:2 and 1:3 *w/w*), with the optimised liquid B-SNEDDS and the resulting four formulations coded as F1 to F4, respectively (Table 3). When SNEDDS were adsorbed on Aerosil 200 at a 1:2 ratio (F1), a higher yield was obtained, which was able to carry higher amounts of liquid B-SNEDDS (1:3 ratio). Hydrophobic fumed silica resulted in a poorer yield, indicating that SNEDDS adsorbed easier towards a hydrophilic surface, suggesting a core shell particle structure for liquid B-SNEDDS, with Labrasol being orientated towards the surface, and likely to interact more strongly with hydrophilic silica surfaces. However, this stronger interaction of labrasol with hydrophilic silicas has been linked previously to poorer disintegration times, which should be taken into account later when manufacturing solid dosage forms, such as tablets [30].

Table 3. Characterisation of the solid B-SNEDDS. Results are reported as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

Code	Aerosil Type	Carrier B-SNEDDS Ratio (<i>w/w</i>)	Yield (%)	Angle of Repose (°)	Drug Loading (%)	Particle Size (nm)	Butenafine Released at 60 min in SGF (%)
F1	200	1:2	71.1 $\pm$ 1.6	19.1 $\pm$ 5.4	94.1 $\pm$ 0.1	119.8 $\pm$ 2.3	45 $\pm$ 2.0
F2	200	1:3	66.5 $\pm$ 10.2	15.9 $\pm$ 3.0	96.5 $\pm$ 2.4	25.9 $\pm$ 1.2	28 $\pm$ 5.0
F3	R972	1:2	32.9 $\pm$ 1.3	20.6 $\pm$ 0.2	85.5 $\pm$ 4.6	279 $\pm$ 8.7	18 $\pm$ 4.0
F4	R972	1:3	47.4 $\pm$ 22.6	8.7 $\pm$ 1.5	97.0 $\pm$ 2.1	1 *	20 $\pm$ 0.2

* Particle size measurements of F4 were registered as 1 nm, indicating that particles were not stable upon dilution.

All solid B-SNEDDS had an AoR below 20°, indicative of excellent flow properties [31,32] with near maximal drug loading (Table 3). Particle size measurements confirmed microemulsion regions with a size well below 300 nm. F4 yielded particles that either had not been able to re-form after adsorption on silica, or were unstable after the 1:1000 dilution, and thus were considered not appropriate for further development.

3.4. Release Studies

Hydrophilic fumed silica particles indicated a greater and faster release of butenafine nanoemulsions type II (F1 > F2 > F3–F4) (Figure 2). Increasing the pH from 1.2 to 6.8 to mimic the intestinal pH resulted in a sharp precipitation, which can be linked with a spring–parachute effect. This can explain the low absorption of butenafine orally [21], as that only allows for absorption in the upper part of the gastrointestinal tract [33,34]. Butenafine is more soluble in acidic pH as a hydrochloride salt, while its base (pKa: 9.23) has limited water solubility (<100 ng/mL) [35]. Formulation F1 allows for higher solubilised levels up to 90 min ($p < 0.05$; one-way ANOVA), which is critical for enhancing oral absorption.

Figure 2. Release of solid B-SNEDDS formulations in simulated gastric fluid (SGF) (pH 1.2, first 60 min) and simulated intestinal fluid (SIF) (pH 6.8) thereafter (mean % $\pm$ SD). -●- F1, -■- F2, -▲- F3, -▼- F4.

3.5. Morphological Analysis

The morphology of the four solid B-SNEDDS formulations was observed by scanning electron microscopy (Figure 3). At higher magnification, the large surface porosity of both silicon dioxide carriers can be observed. This explains the high amount of liquid SNEDDS that is able to be adsorbed on to the solid carriers, up to three times their own weight. However, agglomeration between carrier particles was more noticeable in those formulations containing a higher ratio of liquid SNEDDS (F2 and F4), which can explain the hindered release observed. In the F3 and F4, both containing the most hydrophobic carrier (Aerosil R972), it was observed that even at the lower ratio of liquid-SNEDDS (1:2 *w:w*), the aggregation between particles is still evident to some extent.

Figure 3. Scanning electron microscope (SEM) micrographs of solid B-SNEDDS F1, F2, F3, and F4 formulations at two different magnifications.

3.6. Tableting and Hardness

Amongst all the solid B-SNEDDS, only the F1 formulation was able to be compacted with adequate hardness without the incorporation of other excipients. We should bear in mind that the addition of other excipients will further dilute the butenafine dose per tablet size, which currently is 10 mg/500 mg tablet in powder form (Table 4). The addition of microcrystalline cellulose is likely to allow other solid SNEDDS to be formulated with appropriate hardness.

Table 4. Hardness of the F1 solid B-SNEDDS formulation. Hardness expressed as minimum and maximum values.

Compaction Pressure (kN)	Hardness (N)	Dimension (mm)
9806.65	15.6–18.4	12.91 × 3.17
19,613.3	7.7–20.1	12.91 × 3.17

3.7. In Vitro Efficacy and Cytotoxicity

Miltefosine was active against both promastigote and amastigote forms of *L. (L.) infantum*, exhibiting an EC_{50} of 17.9 ± 0.9 and $13.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$, respectively, as well as a mild cytotoxicity (CC_{50} of $126.3 \pm 3.5 \mu\text{M}$) leading to a selectivity index towards promastigotes forms (SIp) of 7.0 and a selectivity index towards amastigotes forms (SIa) of 9.2 (Table 5). These values are similar to previous documented studies [36]. Free butenafine showed lower efficacy than miltefosine (Table 5), with an SI close to the unit indicating poor selectivity for the parasites over the macrophages. Amongst the four solid B-SNEDDS, F1 and F4 showed better efficacy against promastigotes ($p < 0.05$), while Aerosil R972 formulations (F3 and F4) demonstrated lower cytotoxicity and higher efficacy against amastigotes ($p < 0.05$), but whether this is driven by the excipient is not clear, and further studies are needed. In any case, except for F2, formulating butenafine as SNEDDS has improved its selectivity index, making it less toxic and more active than the free drug.

Table 5. Antileishmanial activity of solid B-SNEDDS formulations and butenafine were assayed against promastigote and amastigote forms of *L. (L.) infantum*. Cytotoxicity was analysed using peritoneal macrophages from BALB/c mice. EC_{50} represents the concentration of the formulation that produced a 50% reduction in parasites, while CC_{50} represents the concentration of the formulation that produced a 50% reduction of cell viability in treated culture cells with respect to untreated ones. SIp: selectivity index towards promastigotes forms; SIa: selectivity index towards amastigotes forms.

Formulation	EC_{50} (μM) Promastigote	CC_{50} (μM) Macrophage	EC_{50} (μM) Amastigote	SIp	SIa
F1	76.5 ± 3.0 *	225.8 ± 3.2	164.4 ± 3.4	2.9	1.3
F2	93.1 ± 3.0	127.2 ± 3.0	702.5 ± 3.2	1.3	0.1
F3	101.7 ± 3.2	≥ 300.0	86.4 ± 2.9 *	≥ 3.0	≥ 3.6
F4	73.9 ± 3.2 *	233.1 ± 3.0	27.0 ± 3.4 *	3.1	8.6
Butenafine	99.8 ± 3.1	109.3 ± 3.5	118.4 ± 3.6	1.0	0.9
Miltefosine	17.9 ± 0.9	126.3 ± 3.5	13.7 ± 0.7	7.0	9.2

* $p \leq 0.05$ compared to Butenafine.

4. Discussion

Butenafine, a benzylamine derivative structurally similar to terbinafine, possesses antifungal activity, attributed to its ability to directly cause damage on fungal cell membranes by disrupting the early stages of ergosterol biosynthesis via inhibition of the enzyme squalene epoxidase [37]. This enzyme converts squalene to lanosterol, and leads to the accumulation of squalene [38]. Inhibition of squalene epoxidase suppresses the biosynthesis of ergosterol, an essential lipid of fungal and *Leishmania* cell membranes [39].

Therefore, butenafine is known for its antifungal effects in infections caused by *Tinea pedis*, *Tinea corporis*, and *Tinea cruris* [40]. We have recently demonstrated the leishmanicidal effect of butenafine against promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* [20]. Considering the difficulties related to the treatment of leishmaniasis, such as drug relapses, toxicity, hospitalization, and parenteral administration, the development of an oral, safe, multispecies, and effective medicament could revolutionise VL treatment. Butenafine is a multispecies drug, able to be effective against a range of parasite strains, such as *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, and now in this work, it has

been demonstrated that is also active against *L. infantum*. However, due to its poor water solubility and precipitation in the gastrointestinal tract, no oral formulations of butenafine have been licensed.

In order to pave the way for the market of oral medicines against VL, the selection of excipients that can promote oral bioavailability and safety, as well as elicit a synergistic effect against Leishmania parasites without compromising safety is critical. Peceol, Labrasol, and Capryol 90 have been selected as GRAS excipients to formulate butenafine SNEDDS, able to enhance the drug solubilisation capacity in the gastrointestinal tract and oral bioavailability [41]. Also, due to the proven efficacy of those selected excipients against several strains of Leishmania parasites, a synergistic effect with butenafine can be expected [22].

Pre-formulation studies have indicated that butenafine is more soluble in C18 lipids and amphiphiles, and these were thus selected for forming the oil component of SNEDDS (Peceol). We decided to combine these with the medium, as well as short chain fatty acids esters (Capryol 90) and triglycerides (Labrasol) that we have recently shown to possess antileishmanial activity. The high reported activity of lauric acid and labrasol against *Leishmania* parasites can be attributed to their ability to selectively permeate the cell membrane of parasites, resulting in rapid and considerable membrane damage and the loss of cellular potassium and magnesium [22]. SNEDDS were optimised towards a minimised droplet particle size (~100 nm) for several reasons. Nanoemulsions (type II microemulsions) are more stable than microemulsions, in terms of droplet flocculation and coalescence (Ostwald ripening) [42]. The smaller the particle size, the higher the permeability across the intestinal mucus brush border layer and cell membranes [43]. Additionally, small droplet sizes (~90 nm) provide a large interfacial surface area for drug release and absorption across the intestinal cells [44]. Recent reports suggest that a particle size between 100–500 nm is optimal for lymphatic uptake via the gastrointestinal lymphatic system, but at a slower rate than particles sized 50–100 nm [45,46].

In order to reduce costs, increase the chemical stability, and improve patient compliance, B-SNEDDS was transformed into a solid free-flowing powder by spray-drying, which can be directly compressed. Fumed amorphous silica (Aerosil) are known to possess enhanced surface area for adsorption (Aerosil 200: $200 \pm 25 \text{ m}^2/\text{g}$ and Aerosil R972: $110 \pm 20 \text{ m}^2/\text{g}$). Both silicas were able to adsorb three times their own weight in SNEDDS, resulting in powders with excellent flow properties, as indicated by AoR studies ($<20^\circ$) [30]. The higher porosity and hydrophilic surface of Aerosil 200 carriers explain the higher drug release and yield, respectively. Loading was higher with Aerosil 200, which indicates a core-shell morphology of the SNEDDS droplet, with polyethylene glycol chains stabilising the droplet surface and enabling higher interactions with the hydrophilic surface of the silica [47,48]. Aerosil R972 carriers hinder the release of butenafine, possibly due to stronger hydrophobic interactions; however, this is likely to limit oral bioavailability. Additionally, particles prepared with Aerosil R972, with high SNEDDS loading when dispersed in water, are unable to yield an emulsion, indicating that droplets are not able to re-form or are unable to maintain their morphology, and become unstable after a 1:1000 dilution. The latter, combined with limited release from these solid B-SNEDDS, makes them less likely to be able to enhance oral bioavailability. Interestingly, though, these particles have a significantly impact on the in vitro efficacy against *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Even though butenafine release from F3 and F4 formulations was low at physiological pH, these formulations possessed enhanced efficacy and selectivity, with no higher cytotoxicity on macrophages. Enhanced surface hydrophobicity can trigger macrophage uptake compared to particles with a hydrophilic surface [49]. However, when the results are taken together, formulation F1 is more likely to be a promising solid nanomedicine for VL, as it maintains characteristics for enhanced solubilisation and oral uptake, as well as presented antileishmanial activity in *L. (L.) infantum* promastigotes and amastigotes.

Limited studies are available in the literature for understanding the ability of solid carriers to load SNEDDS. Preparing a conventional solid dosage form of SNEDDS remains challenging, as tablets can be friable if a low compression force is used, or allow for SNEDDS leakage if a high compression force is used. Tablets prepared with Labrasol and silica (Neusilin US2, a synthetic, amorphous form of magnesium aluminometasilicate) have demonstrated an enhanced disintegration time and the need

for a disintegrant [32]. Our solid B-SNEDDS were able to load high SNEDDS quantities, while being free-flowing and easily compacted into the appropriate hardness tablets. Smith et al. [12] have demonstrated that liquid SNEDDS can be transformed into solid tablets with good release properties when the ratio between liquid to solid was 1:3. In our work, we have shown that even a much greater ratio of liquid to solid (2:1) can still be compacted without SNEDDS leakage and maintain a homogenous matrix for compaction. However, further studies are required to investigate the manufacturing of these free-flowing powders into tablets that meet the USP Pharmacopeia requirements.

5. Conclusions

Manufacturing of cost-effective solid dosage forms of reformulated drugs is an ideal strategy to speed up the development of novel medicines for VL and other neglected diseases. We have demonstrated for the first time the efficacy of butenafine for VL, while developing an easily scalable preparation from GRAS excipients of solid dosage forms of butenafine, able to maintain its solubilisation capacity in the gastrointestinal tract. SNEDDS were optimised for drug loading (30 mg/g) and particle size, and we have demonstrated the ability of a microemulsion to be formed after release from fumed silica particles. Solid SNEDDS demonstrated excellent flow properties, and were able to be compressed in adequate hardness tablets. They also demonstrated antileishmanial activity in *L. (L.) infantum* promastigotes and amastigotes, which indicated their potential as solid nanomedicines for the treatment of VL.

Author Contributions: Conceptualization, A.L. and D.R.S.; methodology, A.B.-S., G.F.R., R.F.-G., L.F.P., M.D.L., and D.R.S.; software, A.B.-S.; validation, A.B.-S.; formal analysis, A.B.S., G.F.R., R.F.-G., and D.R.S.; resources, M.D.L., F.B.-E., L.F.P., and D.R.S.; data curation, A.B.-S.; writing—original draft preparation, A.B.-S.; writing—review and editing, A.B.-S., L.F.P., A.L., and D.R.S.; supervision, M.D.L., L.F.P., and D.R.S.; project administration, M.D.L. and F.B.-E.; funding acquisition, M.D.L. and F.B.-E.

Funding: This research was funded by the União Iberoamericana de Universidades (ENF03-2017) allowing student mobility exchange between UCM and USP and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processes: 2016/00468-0 and 2017/09405-4).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Araújo-Santos, T.; Prates, D.B.; Andrade, B.B.; Nascimento, D.O.; Clarêncio, J.; Entringer, P.F.; Carneiro, A.B.; Silva-Neto, M.A.; Miranda, J.C.; Brodskyn, C.I.; et al. Lutzomyia longipalpis saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E₂ production in murine macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e873. [CrossRef] [PubMed]
2. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis Disease and Epidemiology. Available online: http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html (accessed on 18 February 2019).
3. Rittig, M.G.; Bogdan, C. Leishmania-Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. *Parasitol. Today* **2000**, *16*, 292–297. [CrossRef]
4. Laurenti, M.D.; Da Matta, V.L.R.; Pernichelli, T.; Secundino, N.E.C.; Pinto, L.C.; Corbett, C.E.P.; Pimenta, P.P.F. Effects of Salivary Gland Homogenate from Wild-Caught and Laboratory-Reared Lutzomyia longipalpis on the Evolution and Immunomodulation of Leishmania (Leishmania) amazonensis Infection. *Scand. J. Immunol.* **2009**, *70*, 389–395. [CrossRef] [PubMed]
5. Laisson, R.; Shaw, J.J. New world Leishmaniasis—The Neotropical Leishmania species. In *Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infections*, 9th ed.; Feg Cox: London, UK, 1988.
6. Silveira, F.T.; Lainson, R.; Crescente, J.Á.; De Souza, A.A.; Campos, M.B.; Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human Leishmania (L.) infantum chagasi infection in the Brazilian Amazon region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 529–535. [CrossRef] [PubMed]
7. Dantas-Torres, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: Do not forget the law of priority. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 117–118. [CrossRef]

8. Barak, E.; Amin-Spector, S.; Gerliak, E.; Goyard, S.; Holland, N.; Zilberstein, D. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: Analysis of signal perception and response. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *141*, 99–108. [CrossRef]
9. Santos, D.O.; Coutinho, C.E.R.; Madeira, M.F.; Bottino, C.G.; Vieira, R.T.; Nascimento, S.B.; Bernardino, A.M.R.; Bourguignon, S.C.; Côrte-Real, S.; Pinho, R.T.; et al. Leishmaniasis treatment—A challenge that remains: A review. *Parasitol. Res.* **2008**, *103*, 1–10. [CrossRef]
10. Kaur, G.; Rajput, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. *J. Parasitol. Res.* **2014**, *2014*, 1–11. [CrossRef]
11. Serrano, D.R.; Lalatsa, A. Oral amphotericin B: The journey from bench to market. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *42*, 75–83. [CrossRef]
12. Smith, L.; Serrano, D.R.; Mauger, M.; Bolás-Fernández, E.; Dea-Ayuela, M.A.; Lalatsa, A. Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 2570–2583. [CrossRef]
13. Fernández, O.L.; Díaz-Yoro, Y.; Ovalle, C.; Valderrama, L.; Muvdi, S.; Rodríguez, L.; Gomez, M.A.; Saravia, N.G. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2871. [CrossRef]
14. Dorlo, T.P.C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J.H.; De Vries, P.J. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2576–2597. [CrossRef]
15. Pérez-Victoria, E.J.; Sánchez-Cañete, M.P.; Seifert, K.; Croft, S.L.; Sundar, S.; Castanys, S.; Gamarro, E. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist. Updates* **2006**, *9*, 26–39. [CrossRef]
16. Drugs for Neglected Diseases initiative: DNDi. Available online: <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/tpp-v1> (accessed on 19 January 2018).
17. Graul, A.; Sorbera, L.; Pina, P.; Tell, M.; Cruces, E.; Rosa, E.; Stringer, M.; Castaner, R.; Revel, L. The year's new drugs & biologics—2009. *Drug News Perspect.* **2010**, *23*, 7. [CrossRef]
18. Tobinick, E.L. The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. *Drug News Perspect.* **2009**, *22*, 119. [CrossRef]
19. Voss, A.; Soto, J.; Toledo, J.; Nicholls, R.S.; Padilla, J.; Engel, J.; Fischer, C.; Gutierrez, P.; Berman, J. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent. *Clin. Infect. Dis.* **2001**, *33*, e57–e61.
20. Bezerra-Souza, A.; Yamamoto, E.S.; Laurenti, M.D.; Ribeiro, S.P.; Passero, L.F.D. The antifungal compound 25butenafine eliminates promastigote and amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitol. Int.* **2016**, *65*, 702–707. [CrossRef]
21. Food and Drug Administration (FDA). Review and Evaluation of Pharmacology/Toxicology Data O fbutenafine, NDA 21-307 (000)/09-29-2000. Available online: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2001/21-307_Lotrimin_pharmr.pdf (accessed on 24 June 2019).
22. Serrano, D.R.; Lalatsa, A.; Dea-Ayuela, M.A. Engineering Synergistically Active and Bioavailable Cost-effective Medicines for Neglected Tropical Diseases; The Role of Excipients. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*. [CrossRef]
23. Lavoie, F.; Cartilier, L.; Thibert, R. New Methods Characterizing Avalanche Behavior to Determine Powder Flow. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 887–893. [CrossRef]
24. Betatek Inc. *Instrumentation Superbly Supported: Microtrak Zetatrac Nanotechnology, Particle Size and Charge Measurement Analyzer*; Betatek Inc.: Toronto, ON, Canada, 2012.
25. United States Pharmacopeia (USP). *USP 41-NF36*; <711> Dissolution Studies; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2008.
26. Drug Bank Database. Available online: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01091> (accessed on 15 July 2019).
27. European Pharmacopeia, 9th ed. Available online: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-9th-edition> (accessed on 19 July 2018).
28. Passero, L.F.D.; Sacomori, J.V.; Tomokane, T.Y.; Corbett, C.E.P.; Da Silveira, F.T.; Laurenti, M.D. Ex vivo and in vivo biological behavior of *Leishmania (Viannia) shawi*. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 1741–1747. [CrossRef]
29. Gattefossé: Excipients for Solubility and Bioavailability Enhancement. Available online: <https://www.gattefosse.com/excipients-for-solubility-and-bioavailability-enhancement> (accessed on 18 February 2019).

30. Maher, S.; Brayden, D.J.; Casettari, L.; Illum, L. Application of Permeation Enhancers in Oral Delivery of Macromolecules: An Update. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 41. [CrossRef]
31. United States Pharmacopeia (USP). *USP 41-NF36*; <1174> Powder Flow; United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2006.
32. Goh, H.P.; Heng, P.W.S.; Liew, C.V. Comparative evaluation of powder flow parameters with reference to particle size and shape. *Int. J. Pharm.* **2018**, *547*, 133–141. [CrossRef]
33. Porter, C.J.H.; Pouton, C.W.; Cuine, J.E.; Charman, W.N. Enhancing intestinal drug solubilization using lipid-based delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 673–691. [CrossRef]
34. Humberstone, A.J.; Charman, W.N. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *25*, 103–128. [CrossRef]
35. Drugbank. Butenafine. Available online: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01091> (accessed on 29 April 2019).
36. Seifert, K.; Escobar, P.; Croft, S.L. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 508–511. [CrossRef]
37. Stütz, A. Synthesis and Structure—Activity Correlations within Allylamine Antimycotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *544*, 46–62. [CrossRef]
38. Ryder, N.S. Terbinafine: Mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br. J. Dermatol.* **1992**, *126*, 2–7. [CrossRef]
39. Roberts, C.W.; McLeod, R.; Rice, D.W.; Ginger, M.; Chance, M.L.; Goad, L.J. Fatty acid and sterol metabolism: Potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *126*, 129–142. [CrossRef]
40. Singal, A. Butenafine and superficial mycoses: Current status. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 999–1005. [CrossRef]
41. Tatham, L.M.; Rannard, S.P.; Owen, A. Nanoformulation strategies for the enhanced oral bioavailability of antiretroviral therapeutics. *Ther. Deliv.* **2015**, *6*, 469–490. [CrossRef]
42. Anton, N.; Vandamme, T.F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 978–985. [CrossRef]
43. Leonaviciute, G.; Adamovic, N.T.; Lam, H.T.; Rohrer, J.; Partenhauser, A.; Bernkop-Schnürch, A. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): Proof-of-concept how to make them mucoadhesive. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *112*, 51–57. [CrossRef]
44. Imada, C.; Takahashi, T.; Kuramoto, M.; Masuda, K.; Ogawara, K.; Sato, A.; Wataya, Y.; Kim, H.S.; Higaki, K. Improvement of Oral Bioavailability of N-251, a Novel Antimalarial Drug, by Increasing Lymphatic Transport with Long-Chain Fatty Acid-Based Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 2595–2608. [CrossRef]
45. Khan, A.A.; Mudassir, J.; Mohtar, N.; Darwis, Y. Advanced drug delivery to the lymphatic system: Lipid-based nanoformulations. *Int. J. Nanomed.* **2013**, *8*, 2733–2744. [CrossRef]
46. Gosh, S.; Roy, T. Nanoparticulate drug-delivery systems: Lymphatic uptake and its gastrointestinal application. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2014**, *4*, 123–130.
47. Elnaggar, Y.S.; El-Massik, M.A.; Abdallah, O.Y. Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and optimization. *Int. J. Pharm.* **2009**, *380*, 133–141. [CrossRef]
48. Shen, S.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, D. High drug-loading nanomedicines: Progress, current status, and prospects. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 4085–4109. [CrossRef]
49. Serrano, D.R.; Hernández, L.; Fleire, L.; González-Alvarez, I.; Montoya, A.; Ballesteros, M.P.; Dea-Ayuela, M.A.; Miró, G.; Bolás-Fernández, E.; Torrado, J.J. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int. J. Pharm.* **2013**, *447*, 38–46. [CrossRef]

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALRAJHI, A.A.; IBRAHIM, E.A.; DE VOL, E.B.; KHAIRAT, M., FARIS, R.M.; MAGUIRE, J.H. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **The New England Journal of Medicine**, Boston (EUA), v. 346, n. 12, p. 891-895, 2002.

AMATO V.S.; OLIVEIRA L.S.; SILVA A.C.M.; MACHADO F.R.; AMATO J.G.P.; NICODEMO AC, AMATO N. V. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de Antimonial Pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 31, p. 221-224, 1998.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, S.M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOSMAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.278, p.435-445, 2004.

ANDRADE- NETO, V. V.. **Papel do colesterol exógeno nos mecanismos de adaptação de *Leishmania* spp. a condições de estresse metabólico e farmacológico**. 2013. 132f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

ANDRADE-NETO, V.V.; Cunha-Junior, E.F.; Dos Santos Faioes, V.; Pereira, T.M.; Silva, R.L.; Leon, L.L.; Torres-Santos, E.C. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. **Frontiers in Bioscience**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 967-996, 2018.

AOKI Y, YOSHIHARA F, KONDOH M, NAKAYAMA N, ARISAWA M. Ro09-1470 is a selective inhibitor of P-450 lanosterol C-14 demethylase of fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Kamakura (Japão), v. 37, n.12, p. 2662-2667, 1993.

ARAÚJO-SANTOS, T.; PRATES, D.B.; ANDRADE, B.B.; NASCIMENTO, D.O.; CLARÊNCIO, J.; ENTRINGER, P.F.; CARNEIRO, A.B.; SILVA-NETO, M.A.; MIRANDA, J.C.; BRODSKYN, C.I.; BARRAL, A.; BOZZA, P.T.; BORGES, V.M.. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E₂ production in murine macrophages. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Salvador, v. 4, n. 11, p. e873, 2010.

ARNOULT, D.; AKARID, K.; GRODET, A.; PETIT, P. X.; ESTAQUIER, J.; AMIESEN, J. C. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine protease activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death and Differentiation**, Paris (França), v. 9, n. 1, p. 65–81, 2002.

BALASEGARAM M, RITMEIJER K, LIMA MA, BURZA S, ORTIZ GENOVESE G, MILANI B, GASPANI S, POTET J, CHAPPUIS F.. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, Geneva, v.17, n. 4, p. 493–510, 2012.

BARAK, E.; AMIN-SPECTOR, S.; GERLIAK, E.; GOYARD, S.; HOLLAND, N.; ZILBERSTEIN, D.. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 99-108, 2005.

BASANO, S. A; CAMARGO, L. M. A.. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BAYOMI, M.A.; AL-ANGARY, A.A.; AL-MESHAL, M.A.; MOHAMED M.; AL-DARDIRI, M.M. *In vivo* evaluation of arteether liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.175, p.1-7, 1998.

BENAIM, G.; SANDERS, J.M.; GARCIA-MARCHÁN, Y.; COLINA, C.; LIRA, R.; CALDERA, A.R.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BURGOS, J.M.; LEON ROSSELL, A.; CONCEPCION, J.L.; SCHIJMAN, A.G.; LEVIN, M.; OLDFIELD, E.; URBINA, J.A. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **Journal of medicinal chemistry**, Caracas (Venezuela), v. 49, n. 3, p. 892-899, 2006.

BERGSTRAND, N.; ARFVIDSSON, M.C.; KIM, J.M.; THOMPSON, D.H.; EDWARDS, K. Interactions between pH-sensitive liposomes and model membranes. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v.104, p.361-379, 2003.

BERMAN, J.D.; GALLALEE, J.V.. *In vitro* antileishmanial activity of inhibitors of steroid biosynthesis and combinations of antileishmanial agents. **The Journal of Parasitology**, Washington, v. 73, n. 3, p. 671-673, 1987.

BERMAN, J.D.; GOAD, L.J.; BEACH, D.H.; HOLZ, G.G. Jr.. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Washington, v. 20, n. 1, p. 85-92, 1986.

BEZERRA-SOUZA A, YAMAMOTO ES, LAURENTI MD, RIBEIRO SP, PASSERO LF. The antifungal compound butenafine eliminates promastigote and amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology international**, São Paulo, v. 65, n.6 Pt A, p. 702-707, 2016.

BEZERRA-SOUZA A, FERNANDEZ-GARCIA R, RODRIGUES GF, BOLAS-FERNANDEZ F, LAURENTI MD, PASSERO LFD, LALATSA A, SERRANO DR. Repurposing Butenafine as An Oral Nanomedicine for Visceral Leishmaniasis. **Pharmaceutics**, São Paulo, v. 11, n. 353, 2019.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 772, p. 248-54, 1976.

BRASIL. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. 120p.

BRENER, Z. Terapêutica experimental na doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. (eds.), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 379-388.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Arlington, v.54, p.631-651, 2002.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A.. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CAMPBELL-LEDNUM, D.; DUJARDIN, J.P.; MARTINEZ, E.; FELICIANGELI, M.D.; PEREZ, J.E.; SILANS, L.N.; DESJEUX, P. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, London, v. 96, n. 2, p. 159 – 162, 2001.

CAMPO, VL e CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 425-430, 2007.

CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida *in vitro* da miltefosina em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

CARDONA, W.; QUIÑONES, W.; ROBLEDO, S.; VÉLEZ, I.D.; MURGA, J.; GARCÍAFORTANET, J.; CARDA, M.; CARDONA, D.; ECHEVERRI, F. Antiparasite and antimycobacterial activity of passifloricin analogues. **Tetrahedron**, Antioquia, v. 62, n. 17, p. 4086-4092, 2006.

CARLUCCI A.M., BREGNI C. Productos Nanotecnológicos de Aplicación en Farmacoterapia. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 03, p.470-477, 2009.

CARNEIRO, L.A. *et al.* Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTII leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 53, p. 45-50, 2011.

CDC - Centers for Diseases Control and Prevention. **Parasites – Leishmaniasis**. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> > Acesso em: 05 set. 2018.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M.. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, Geneva, v. 5, n. 11, p 873-882, 2007.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Hyderabad, v. 416, n. 1-2, p. 7-12, 2011.

COELHO A., TRINCONI CT, COSTA CH, ULIANA SR. *In vitro* and *in vivo* miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis: Follow-Up. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Paulo, v. 10, n.7, e0004720, 2016.

CÓRDOBA, S.; GANDOLFO CANO, M.; AGUADO, M.; HUERTA-BROGERA, M.; ROMERO, A.; MARTÍNEZ-MORÁN, C.; et al. Delayed allergic skin reactions due to intralesional meglumine antimoniate therapy for cutaneous leishmaniasis. **Allergy**, Madrid, n. 67, p. 1609-11, 2012.

COTRAN, R.S.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.: **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

COTRIM, P.C; GARRITY, L. K.; BEVERLEY, S.M.; Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. **The Journal of Biological Chemistry**, St. Louis, v. 274, n. 53, p. 37723-37730, 1999.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, London, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, London, v. 126, n. 2, p. 165-72, 2003.

CUNHA MA, LEÃO AC, DE CASSIA SOLER R, LINDOSO JA. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, São Paulo, v. 93, n. 6, p. 1214-8, 2015.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. New species of protozoa of the genus *Leishmania* pathogenic to man *Leishmania chagasi* n. sp previous note. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 3-9, 1937.

CURTI, M.C.M; SILVEIRA, T.G.V; ARRAES, S.M.A.A; BERTOLINI, D.A; ZANZARINI, P.D; VENZA, E.A.S; FERNANDES, A.C.S; TEIXEIRA, J.J.V; LONARDONI, M.V.C. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Maringé, v. 30, n. 1, p. 63-68, 2009.

CYRINO LT, ARAÚJO AP, JOAZEIRO PP, VICENTE CP, GIORGIO S. *In vivo* and *in vitro* *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. **Tissue and Cell**, Campinas, v. 44, n. 6, p. 401-8, 2012.

DA SILVA MF, ZAMPIERI RA, MUXEL SM, BEVERLEY SM, FLOETER-WINTER LM. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **PLoS One**, São Paulo, v. 7, n.3, e34022, 2012.

DALY, K.; DE LIMA, H.; KATO, H.; SORDILLO, E.M.; CONVIT, J.; REYES-JAQUES, O.; ZERPA, O.; PANIZ-MONDOLFI, A.E. Intermediate cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* successfully treated with fluconazole. **Clinical and Experimental Dermatology**, Caracas, v. 39, n. 6, p. 708-12, 2014.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, p. 117-118, 2006.

DAS, S.; BARBHUNIYA, J.N.; BISWAS, I.; BHATTACHARYA, S.; KUNDU, P.K. Studies on comparison of the efficacy of terbinafine 1% cream and butenafine 1% cream for the treatment of Tinea cruris. **Indian dermatology online journal**, India, v. 1, n. 1, p. 8-9, 2010.

DAVID, C. V. e CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, Torrance (EUA), v.22, n.3, p. 491–502, 2009.

DE ASSIS SOUZA, M.; BRELAZ DE CASTRO, M. C. A.; DE OLIVEIRA, A. P.; DE ALMEIDA, A. F.; DE ALMEIDA, T. M.; REIS, L. C.; MEDEIROS, A.C.R; DE BRITO, M. E. F.; PEREIRA, V. R. A. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients:

Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 27–32, 2013.

DE MACEDO-SILVA, S.T.; DE OLIVEIRA-SILVA, T.L.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms on *Leishmania amazonensis*. **Molecular biology international**, Rio de Janeiro, v. 2011, 876021, 2011.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, Rio de Janeiro, v. 2009, 642502, 2009.

DEDET JP, JAMET P, ESTERRE P, GHIPPONI PM, GENIN C, LALANDE G. Failure to cure *Leishmania braziliensis guyanensis* cutaneous leishmaniasis with oral ketoconazole. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Guiana Francesa, v. 80, n.1, p. 176, 1986.

DEPAQUIT, J.; LÉGER, N.; FERTÉ, H.. [The taxonomic status of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917, vector of *Leishmania tropica* (Wright, 1903) and *Phlebotomus similis* Perfiliev, 1963 (Diptera - Psychodidae). Morphologic and morphometric approaches. Biogeographical and epidemiological corollaries], **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, Reims, v. 91, n. 4, p. 346-352, 1998.

DINESH. N; SOUMYA. N e SINGH S. Antileishmanial effect of mevastatin is due to interference with sterol metabolism. **Parasitology research**, Índia, v. 114, n. 10, p. 3873-83, 2015.

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>>. Acesso em 02/03/2019.

DOGRA, J.; SAXENA, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomised double-blind trial in cutaneous disease. **The International Journal for Parasitology**, Jaipur, v. 26, n. 12, p. 1413-1415, 1996.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; DE VRIES, P.J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, Amsterdam, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, 2012.

DUNNING, N. *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Bioscience Horizons* 2: 73-82, 2009.

DUSSE, L.M.S.A; VIEIRA, L. M; CARVALHO, M. G.. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

DUTCHER, J.D.; YOUNG, M.B.; SHERMAN, J.H.; HIBBITS, W.; WALTERS, D.R.. Chemical studies on Amphotericin B. I. Preparation of the hydrogenation product and isolation of mycosamine, an acetolysis product. **Antibiotics annual Journal's**, Georgia, p.866-869, 1957.

DUTRA LA, DE ALMEIDA L, PASSALACQUA TG, REIS JS, TORRES FA, MARTINEZ I, PECCININI RG, CHIN CM, CHEGAEV K, GUGLIELMO S, FRUTTERO R, GRAMINHA MA, DOS SANTOS JL. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Araraquara, v. 58, n.8, p. 4837-47, 2014.

DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. e CHATTERJEE, M.. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, Kolkata, v. 56, n. 1, p. 629–636, 2007b.

DUTTA, A.; MANDAL, G.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. *In vitro* antileishmanial activity of *Aloe vera* leaf exudate: a potential herbal therapy in leishmaniasis. **Glycoconj Journal**, Kolkata, v. 24, n. 1, p. 81–86, 2007a.

FARAJZADEH S, HESHMATKHAH A, VARES B, MOHEBBI E, MOHEBBI A, AFLATOONIAN M, EYBPOOSH S, SHARIFI I, AFLATOONIAN MR, SHAMSI MEYMANDI S, FEKRI AR, MOSTAFAVI M. Topical terbinafine in the treatment of cutaneous leishmaniasis: triple blind randomized clinical trial. **Journal of Parasitic Diseases**, Kerman (Iran), v. 40, n. 4, p. 1159-1164, 2016.

FARRELL, J.P. **Leishmania**. 1ed. Estados Unidos da América: Kluwer Academic, 2012.

FERNÁNDEZ, O.L.; DIAZ-TORO, Y; OVALLE, C.; VALDERRAMA, L.; MUVDI, S.; RODRÍGUEZ, I.; GOMEZ, M.A.; SARAIVA, N.G.. Miltefosine and Antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Cali, v. 8, n. 5, p. e2871, 2014.

FERREIRA, M. U. **Parasitologia Contemporânea**. Rio de Janeiro: Guanaraba Koogan, 2012.

FIGUEIREDO J. **Nanomedicina: ficção ou realidade?** Universidade do Algarve. CNA – Centro para automação em nanobiotecnologia. 04 de dezembro de 2009. Disponível em: <http://www.observatoriodoalgarve.com/cna/opinioes_ver.asp?opinioao=683>. Acesso em: 15 dez de 2018.

FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz. **Co-infecção por HIV e leishmaniose emerge como desafio à saúde pública**, 2008. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>>. Acesso em: 15 jan, 2018.

FISCHER, C; VOSS, A; ENGEL J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical microbiology and immunology**, Alemanha, v. 190, n. 1-2, p. 85-87, 2001.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letter**, London, v. 160, p. 171-177, 2006.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>>.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. e RIBEIRO, R.R. Pentavalent Antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, Belo Horizonte, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GILLIES, E. R. e FRÉCHET, J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. **Drug Discovery Today**, n. 10, p. 35–43, 2005.

GOLDSTEIN, S. R. Selective estrogen receptor modulators: a new category of compounds to extend postmenopausal women's health. **The International Journal of Fertility and Women's Medicine**, New York, v. 44, n. 5, p. 221-226, 1999.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRAUL AI, SORBERA L, PINA P, TELL M, CRUCES E, ROSA E, STRINGER M, CASTAÑER R, REVEL L. The Year's New Drugs & Biologics - 2009. **Drug News Perspect**, Barcelona (Espanha), v. 23, n. 1, p. 7-36, 2010.

GRAYBILL, J.R.; AHRENS, J. R-51211 (itraconazole) therapy of murine cryptococcosis. **Sabouraudia**, Texas (EUA), v. 22, n. 6, p. 445-453. 1984.

GUPTA, A.K.; KOHLI, Y.; LIA, A.; FAERGEMANN, J.; SUMMERBELL, R.C. *In vitro* susceptibility of the seven *Malassezia* species to ketoconazole, voriconazole, itraconazole and terbinafine. **The British journal of dermatology**, Toronto (Canadá), v. 142, n. 4, p. 758-765, 2000.

GURSOY R.N., BENITA S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.58, 173–182, 2004.

HAUGHAN, PA; CHANCE, ML e GOAD, LJ. Synergism in vitro of lovastatin and miconazole as anti-leishmanial agents. **Biochemical pharmacology**, Inglaterra, v. 44, n. 11, p. 2199-2206, 1992.

HARPER, M. J.K.; WALPOLE, A.L. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. **Nature**, San Antonio, v. 212, n. 5057, p. 87, 1996.

HEINZEL FP, SADICK MD, HOLADAY BJ, COFFMAN RL, LOCKSLEY RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine

leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, Califórnia (EUA), v.169, n.1, p. 59–72, 1989.

HIBBS, J.B. Jr.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M.. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Utah, v. 157, n. 1, p. 81-94, 1988.

JESUS, JA; FRAGOSO, TN; YAMAMOTO, ES; LAURENTI, MD; SILVA, MS; FERREIRA, AF; LAGO, JH; GOMES, GS; PASSERO, LF. Therapeutic effect of ursolic acid in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, São Paulo, v. 7, n.1, p. 1-11, 2017.

JODAR, KS; BALCÃO, VM; CHAUD, MV; Tubino, M; YOSHIDA, VM; OLIVEIRA, JM Jr; VILA, MM. Development and characterization of a hydrogel containing silver sulfadiazine for antimicrobial topical applications. **Journal of pharmaceutical sciences**, São Paulo, v. 104, n. 7, p. 2241-54, 2015.

KAUR, G., RAJPUT, B.. Comparative analysis of the omics technologies used to study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine resistance in *Leishmania*. **Journal of Parasitology Research**, Lanarkshire, v. 2014, p. 11, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews, Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KELLY SL, KENNA S, BLIGH HFJ, WATSON PF, KELLY DE, STANSFIELD I, ELLIS SW. Lanosterol to ergosterol enzymology. **Inhibition and Genetics**. In: KHUN PJ, TRINCI APS, JUNG MJ, GOOSEY MW, COPPING EDS LG. Biochemistry of walls and membranes in fungi. **Springer - Verlag**. Berlin. Heidelberg (Alemanha). p. 224-239, 1990.

KRAUSS, J.; STADLER, M.; BRACHER, F. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel Benzylamine-Type Antifungals as Butenafine-Related Antimycotics. **Archiv der Pharmazie**, Munich, v. 350, n. 5, 2017.

KULKARNI, M.M.; REDDY, N.; GUDE, T.; MCGWIRE, B.S.. Voriconazole suppresses the growth of *Leishmania* species *in vitro*. **Parasitology Research**, Columbus, v. 112, n. 5, p. 2095-2099, 2013.

LAGO, J. H. G.; TEMPONE, André G. Natural Products as a Source of New Drugs Against *Leishmania*. In: **Luis Rivas and Carmen Gil. (Org.). Drug Discovery for Leishmaniasis**. 1ed. Londres: Royal Society of Chemistry, 2017, v. 9, p. 179-198.

LAINSON, R.. *Leishmania* e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, London, v. 11, n. 1, p. 29-40, 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas whith particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura** (Journal of the Brazilian Association for Advancement of Science), London , v. 44, p. 94-106, 1992.

LAINSON, R.; SHAW, J.J; New world Leishmaniasis - The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. **Microbiology and Microbial Infections** (9^a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.

LANGER, T. e KROVAT, E. Chemical feature-based pharmacophores and virtual library screening for discovery of new leads, **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, Austria v. 6, n. 3, p. 370-376, 2003.

LARA-SILVA, F. de O.; MICHALSKY, É. M.; FORTES-DIAS, C. L.; FIUZA, V. de O. P.; PESSANHA, J. E. M.; REGINA-SILVA, S.; DE AVELAR, D. M.; SILVA, M. A.; LIMA, A. C. V. M. da R.; DA COSTA, A. J. A.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; DIAS, E. S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recente transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128–136, 2015.

LAURENTI, M.D.; DA MATTA, V.L.; PERNICHELLI, T.; SECUNDINO, N.F.; PINTO, L.C.; CORBETT, C.E.; PIMENTA, P.P.. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared *Lutzomyia longipalpis* on the evolution and immunomodulation of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, São Paulo, v. 70, p. 389-395, 2009.

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with Strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Caracas (Venezuela), v.35, n. 4, p.736-740, 1991.

LEBLOIS, R.; KUHLS, K.; FRANÇOIS, O.; SCHONIAN, G.; WIRTH, T.. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. **Infection, Genetics and Evolution - Journal**, Paris, v. 11, n. 5, p. 1091-1095, 2011.

LEES, N.D.; SKAGGS, B.; KIRSCH, D.R. e BARD, M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* -a review. **Lipids**, Indianapolis (EUA), v. 30, n. 3, p. 221-226, 1995.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. S.T.P. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Paris v.9, p.411-418, 1999.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O.. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim (Alemanha), v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.

LEYDEN, J. Pharmacokinetics and pharmacology of terbinafine and itraconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Philadelphia, v. 38, n. 5.3, p. 42-47, 1998.

LEZAMA-DÁVILA, C.M.; PAN, L.; ISAAC-MÁRQUEZ, A.P.; TERRAZAS, C.; OGHUMU, S.; ISAAC-MÁRQUEZ, R.; PECH-DZIB, M.Y.; BARBI, J.; CALOMENI, E.; PARINANDI, N.; KINGHORN, A.D.; SATOSKAR, A.R.. Pentalinon andrieuxii root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Phytotherapy Research**, Columbus, v. 28, n. 6, p. 909-916, 2014.

LINDOSO, J.A.; LINDOSO, A.A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 247-53. Review, 2009.

LOPES, A. C. **Diagnóstico e tratamento**, volume 2. Barueri: Manole. 2006.

MACEDO-SILVA, S.T.; DE SOUZA, W. e RODRIGUES, J.C.F. Sterol Biosynthesis Pathway as an Alternative for the Anti-Protozoan Parasite Chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2186-2198, 2015.

MACEDO-SILVA, S.T.; URBINA, J.A.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 12, p. e83247, 2013.

MACIEJAK, A.; LESZCZYNSKA, A.; WARCHOL, I.; GORA, M.; KAMINSKA, J.; PLOCHOCKA, D.; WYSOCKA-KAPCINSKA, M.; TULACZ, D.; SIEDLECKA, J.; SWIEZEWSKA, E.; SOJKA, M.; DANIKIEWICZ, W.; ODOLCZYK, N.; SZKOPINSKA, A.; SYGITOWICZ, G.; BURZYNSKA, B. The effects of statins on the mevalonic acid pathway in recombinant yeast strains expressing human HMG-CoA reductase. **BioMed Central biotechnology**, v. 13, n. 68, 2013.

MACHADO, PRL; RIBEIRO, CS; FRANÇA-COSTA, J; DOURADO, MEF; TRINCONI, CT; YOKOYAMA-YASUNAKA, JKU; MALTA-SANTOS, H; BORGES, VM; CARVALHO, EM e ULIANA, SRB. Tamoxifen and meglumine antimoniate combined therapy in cutaneous leishmaniasis patients: a randomised trial. **Tropical medicine and international health**, Salvador, Bahia, v. 23, n. 9, p. 936-942, 2018.

MANSUETO, P.; VITALE, G.; DI LORENZO, G.; RINI, G.B.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, Palermo, v. 20, n. 3, p. 435-445, 2007.

MARINHO, F.A.; GONÇALVES, K.C.S.; OLIVEIRA, S.S.; OLIVEIRA, A.C. S.; BELLIO, M.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L; BRANQUINHA, M.H. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 4, p. 507-509, 2011.

MATHUR R, DAS RP, RANJAN A, SHAHA C. Elevated ergosterol protects *Leishmania* parasites against antimony-generated stress. **FASEB Journal**. New Delhi (Índia), v. 29, n. 10, p. 4201-13, 2015.

MAURER, M.; DONDJI, B.; STEBUT, E. V. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 198, p. 137-146, 2009.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A.. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MAURÍCIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A.. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, Cambridge, v. 119, n. 3, p. 237-246, 1999.

MICHEL G, POMARES C, FERRUA B, MARTY P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta Tropica**, Nice (França), v.119, n 2-3, p. 69-5, 2011.

McCAMMON, M.T.; HARTMANN, M.A.; BOTTEMA, C.D.; e PARKS, L.W. Sterol methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Dallas (EUA), v.157, n. 2, p. 475- 483, 1984.

MICHELS, P.A.; BRINGAUD, F.; HERMAN, M.; HANNAERT, V.; Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, Brussels, v. 1763, n. 12, 1463-77, 2006.

MIGUEL, DC; YOKOYAMA-YASUNAKA, JK; ANDREOLI, WK; MORTARA, RA e ULIANA, SR. Tamoxifen is effective against *Leishmania* and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* amastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, São Paulo, v. 60, n. 3, p.526-534, 2007.

MIGUEL, DC; YOKOYAMA-YASUNAKA, JK e ULIANA, SR. Tamoxifen is effective in the treatment of *Leishmania amazonensis* infections in mice. **PLoS neglected tropical diseases**, São Paulo, v. 2, n. 6, e249.

MIGUEL DC, Zauli-NASCIMENTO RC, YOKOYAMA-YASUNAKA JK, Katz S, BARBIÉRI CL, ULIANA SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 365-8, 2009.

MIGUEL, D. C. **Caracterização da atividade do tamoxifeno no tratamento da leishmaniose experimental e investigação sobre seus mecanismos de ação.** 2011. 47f. Dissertação (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOMEN, H; PACHECO, R.S.; CUPOLILLO, E; GRIMALDI JÚNIOR, G.. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. **Biological Research**, Santiago, v. 26, n. 1/2, p. 249 – 255, 1993.

MONDOLFI, A. E. P.; DUFFEY, G. B.; HORTON, L. E.; TIRADO, M.; JAIMES, O. R.; PEREZ-ALVAREZ, A.; ZERPA, O. Tropical medicine rounds Intermediate / borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 52, p. 446–455, 2013.

MORAIS-TEIXEIRA, E.; DAMASCENO, Q.S.; GALUPPO, M. K.; ROMANHA, A. J. e RABELLO, A. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, v. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.

MORENO, J.; ALVAR, J.. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399 – 405, 2002.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; MORALES, A, TESH, R.B.; WILSON, M.L.. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. **Journal of Medical Entomology**, New Haven, v. 30, p. 427-435, 1993.

MORROW, D.I.J.; MCCARRON, P.A.; WOOLFSON, A.D.; DONNELLY, R.F. Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery. **The Open Drug Delivery Journal**. n. 1, p. 36-59, 2007.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, Maryland, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **The Annual Review of Immunology**, Valbonne, v. 240, n. 1, p. 286-96, 2011.

NICOLLE, C.J.. ‘Sur trois cas d’ infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisia. **Archives of L’ Institut Pasteur de Tunis**, Tunis, n. 3, p. 1 – 26, 1908.

MURRAY, H. W. Review: Leishmaniasis in the United States: Treatment in 2012. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 434–440, 2012.

NES, W.D. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Texas (EUA), v. 1529, n. 1-3, p. 63-88, 2000.

NIWA, T.; IMAGAWA, Y.; YAMAZAKI, H. Drug interactions between nine antifungal agents and drugs metabolized by human cytochromes P450. **Current Drug Metabolism**, Tokyo (Japão) v. 15, n. 7, p. 651-79. Review, 2014.

OLDFIELD, E. Targeting isoprenoid biosynthesis for drug discovery: bench to bedside. **Accounts of chemical research**, Illinois (EUA), v. 43, n. 9, p. 1216-1226, 2010.

OLIVEIRA, T.M.; DE VASCONCELOS, E.J.; NAKAGHI, A.C.; DEFINA, T.P.; JUSI, M.M.; BALDANI, C.D.; CRUZ, A.K.; MACHADO, R.Z. A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 42-48, 2011.

OLIVIER, L.M. e KRISANS, S.K. Peroximal protein targeting and identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, San Diego (EUA), v. 1529, p. 89-102, 2000.

Organização Mundial de Saúde, 2018.
http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html (acesso em 21/01/18).

PALADI, Cde S; PIMENTEL, IA; KATZ, S; CUNHA, RL; JUDICE, WA; CAIRES, AC; BARBIÉRI, CL. *In vitro* and *in vivo* activity of a palladacycle complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Paulo, v. 6, n. 5, e1626, 2012.

PALADI, CS; DA SILVA, DA; MOTTA, PD; GARCIA, DM; TEIXEIRA, D; LONGO-MAUGÉRI, IM; KATZ, S; BARBIÉRI, CL. Treatment of *Leishmania (Leishmania)*

amazonensis-Infected Mice with a Combination of a Palladacycle Complex and Heat-Killed *Propionibacterium acnes* Triggers Protective Cellular Immune Responses. **Frontiers in Microbiology**, São Paulo, v. 6, n. 8, p. 333, 2017.

PANDHARKAR, T.; ZHU, X.; MATHUR, R.; JIANG, J.; SCHMITTGEN, T.D.; SHAHA, C.; WERBOVETZ, K.A.. Studies on the antileishmanial mechanism of action of the arylimidamide DB766: azole interactions and role of CYP5122A1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Columbus, v. 58, n. 8, p. 4682-4689, 2014.

PARAGUASSU-CHAVES, C.A. **Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental)**. Rondônia: Edufro, 2001.

PAREDES, R; MUNOZ, J; DIAZ, I; DOMINGO, P; GURGUI, M; CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, Barcelona (Espanha), v. 49, n. 1, p. 39–49, 2003.

PARIHAR, SP; HARTLEY, MA; HURDAYAL, R; GULER, R; BROMBACHER, F. Topical Simvastatin as Host-Directed Therapy against Severity of Cutaneous Leishmaniasis in Mice. **Scientific reports**, Cape (África do Sul), v. 6: 33458, 2016.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; SANTOS-GOMES, G. Modelos Roedores Utilizados no Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana. *In: Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 1a Edição ed. [s.l: s.n.]p. 75–90.

PASSERO, L.F.; ASSIS, R.R.; da SILVA, T.N.; NOGUEIRA, P.M.; MACEDO, D.H.; PESSOA, N.L.; CAMPOS, M.A.; LAURENTI, M.D.; SOARES, R.P. Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania (Viannia) shawi*. **Parasitology International**, São Paulo, v. 64, n. 4, p. 32-35, 2015.

PASSERO, L.F.D.; CRUZ, L.A.; SANTOS-GOMES, G.; RODRIGUES, E.; LAURENTI, M.D.; LAGO, J.H.G. Conventional Versus Natural Alternative Treatments for Leishmaniasis: A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, São Paulo, v. 18, n.15, p. 1275-1286, 2018.

PEREIRA-CARVALHO, R.; MENDES-AGUIAR, C. O.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COVAS, C. J. F.; BERTHO, Á. L.; DA-CRUZ, A. M.; GOMES-SILVA, A. *Leishmania braziliensis*

reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

PÉREZ-VICTORIA, F.J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Granada, v. 47, n. 8, p. 2397-2403, 2003.

PESSÔA, S.M. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

PILLAI, AB; NAIR, JV; GUPTA, NK; GUPTA, S. Microemulsion-loaded hydrogel formulation of butenafine hydrochloride for improved topical delivery. **Archives of Dermatological Research**, Kerala (India), v. 307, n. 7, p. 625-633, 2015.

PIMENTEL, L.F; JÁCOME JÚNIOR, A.T.; MOSQUEIRA, V.C. F; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Recife, v.43, n.4, 2007.

PINTO, EG; TEMPONE, AG. Activity of the antiarrhythmic drug amiodarone against *Leishmania (L.) infantum*: an *in vitro* and *in vivo* approach. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, São Paulo, p. 24-29, 2018.

PIRES, M. Q.; MADEIRA, M. de F.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PACHECO, R. da S. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: Evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 243–246, 2014.

PONCE C., PONCE E., CRUZ A., KREUTZER R., MCMAHON PRATT D., NEVA F. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. **The Lancet**, v. 337, n. 8733, p. 67–70, 1991.

PONTES, A.C.O.; CAETANO, M.N.P.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of benzathine penicillin G liposomes. **S.T.P. Journal of Pharmaceutical Sciences**, Paris, v.9, p.419-427, 1999.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S.. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, Rockville, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

REVEIZ, L.; MAIA-ELKHOURY, A.N.; NICHOLLS, R.S.; ROMERO, G.A.; YADON, Z.E.. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **PLoS One**, Washington, v. 8, n. 4, p. e61843, 2013.

RIDLEY, D. S.; RIDLEY, M. J. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. **The Journal of pathology**, v. 141, n. 1, p. 83–96, 1983.

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

ROJAS, R.; VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, M.; VARONA, M.X.; OUELLETTE, M.; SARAVIA, N.G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, Quebec, v. 193, n. 10, p. 1375-1383, 2006.

ROSS, R. Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, Londres, v. 14, p. 70-72, 1903.

RYDER, N.S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **British Journal of Dermatology**, Vienna, v. 126, n. 39, p. 2-7, 1992.

SAENZ, RE; PAZ, H; BERMAN, JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis* panamensis cutaneous leishmaniasis. **The American journal of medicine**, Panamá, v. 89, n. 2, p. 147-55, 1990.

SALMANPOUR, R.; HANDJANI, F.; NOUHPISHEH, M.K. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Dermatological Treatment**, Iran, v. 12, n. 3, p. 159-162, 2001.

SAMPAIO, R. N. R.; SALARO, C.P.; RESENDE, P.; PAULA, C.D.R. Leishmaniose tegumentar americana associada à AIDS: relato de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, n. 6, p. 651-654, 2002.

SAMPAIO, RN; TAKANO, GH; MALACARNE, AC; PEREIRA, TR; DE MAGALHÃES, AV. *In vivo* Terbinafine inefficacy on cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in C57BL/6 mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília (Brasil), v. 36, n. 4, p. 531-3, 2003.

SANTA-RITA, R.M.; HENRIQUES-PONS, A.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 4, p. 704-710, 2004.

SANTOS, R.V.; COIMBRA, C.E.A. Jr. **Saúde e Povos Indígenas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

SANTOS, N.P.; NASCIMENTO, S.C.A.; SILVA, J.F.; PEREIRA, E.C.G.; SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Usnic acid-loaded nanocapsules: an evaluation of cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v.15, p.355-361, 2005.

SARTORELLI, P; ANDRADE, SP; MELHEM, MS; PRADO, FO; TEMPONE, AG. Isolation of antileishmanial sterol from the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fractionation. **Phytotherapy Research**, São Paulo, v. 21, n. 7, p. 644-7, 2007.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligant-target liposomal anticancer drugs. **Progress in Lipid Research**, Amsterdam, v.42, p.439-462, 2003.

SCHMIDT T.J ; KHALID S.A. ; ROMANHA A ; ALVES, T.M.; BIAVATTI, M. W. ; BRUN, R.; Da COSTA, F. B. ; CASTRO, S. L. ; FERREIRA, V. F. ; LACERDA, M. V. ; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L. ; LOPES, N. P. ; Das AMORIM, R. C. N. ; NIEHUES, M. ; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A.M. ; SCOTTI, M. T. ; SETZER, W. N. ; SOEIRO, M. N. C. ; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part I e II. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 2176-2228, 2012.

SEIFERT, K.; ESCOBAR, P.; CROFT, S.L. *In vitro* activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, n. 3, p. 508–511, 2010.

SERRANO, D.R.; HERNÁNDEZ, L.; FLEIRE, L.; GONZÁLEZ-ALVAREZ, I.; MONTOYA, A.; BALLESTEROS, M.P.; DEA-AYUELA, M.A.; MIRÓ, G.; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F.; TORRADO, J.J. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, n. 1-2, p. 38-46, 2013.

SERRANO, DR; LALATSA, A; DEA-AYUELA, MA. Engineering Synergistically Active and Bioavailable Cost-effective Medicines for Neglected Tropical Diseases; The Role of Excipients. **Current Medicinal Chemistry Journal**, Madri (Espanha), v. 17, p. 1-13, 2017.

SERRANO-MARTÍN, X.; GARCÍA-MARCHAN, Y.; FERNANDEZ, A.; RODRIGUEZ, N.; ROJAS, H.; VISBAL, G.; BENAÏM, G. Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{+2} homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Caracas (Venezuela), v. 53, n. 4, p. 1403-1410, 2009.

SINGH, B.; BANDOPADHYAY, S.; KAPIL, R.; SINGH, R.; KATARE, O. Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS): Formulation Development, Characterization, and Applications. **Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 26, n. 5, p. 427-521, 2009.

SHAHBA, AA; MOHSIN, K; ALANAZI, FK. Novel Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SNEDDS) for Oral Delivery of Cinnarizine: Design, Optimization, and *In-Vitro* Assessment. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Kingdom (Arábia Saudita), v. 13, n. 3, p. 967–977, 2012.

SHARMA, S.; MALHAN, P.; PUJANI, M.; RATH, B. Acute erythroid toxicity in visceral leishmaniasis: a rare complication of antimonial therapy. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, New-Delhi, v. 51, n. 4, p. 546-547, 2008.

SHAW, JJ; ISHIKAWA, EA; LAINSON, R; BRAGA, RR; SILVEIRA, FT. Cutaneous Leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza, Póvoa, Ishikawa

& Silveira in Pará State, Brazil. **Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee**, Belém, Pará (Brasil), v. 66, n. 6, p. 243-246, 1991.

SILVA, N. S.; MUNIZ, V. D. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. **Caderno de Saúde Pública**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1325 – 1336, 2009.

SILVA, V.G.; SILVA, R.O.; DAMASCENO, S.R.B.; CARVALHO, N.S.; PRUDENCIO, R.S.; ARAGAO, K.S.; GUIMARÃES, M.A.; CAMPOS, S.A.; VERAS, L.M.C.; GODEJOHANN, M; LEITE, J.R.S.A.; BARBOSA, A.L.R.; MEDEIROS, J.V.R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**. 76, p. 1071-1077, 2013.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 525–534, 2005.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, RS; SOUZA, A. A; LAINSON, R; GOMES, CM. C., LAURENTI, MD., CORBETT, CEP. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2008.

SILVEIRA, F.T. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) in the Amazon Region, Brazil: CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS. **Gazeta Médica da Bahia**, Belém, v. 79, n. 3, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F.T. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) in the Amazon Region, Brazil: Clinical And Epidemiological Aspects. **Gazeta Médica da Bahia**, Belém, v. 79, n. 3, p. 25-29, 2009.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; BRITO, A.C.; OLIVEIRA, M.R.F.; PAES, M.G.; SOUZA, A.A.A.; SILVA, B.M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: LEÃO, R. N. Q.; BICHARA, C. N. C.; MIRANDA, E. C. B. M.; CARNEIRO, I. C. R. S.; ABDON, N. P.; VASCONCELOS, P. F. C.; SILVA, B. M.; PAES, A. L. V.; MARSOLA, L. R. **Doenças Infeciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico**. Belém: Cejup: Universidade do Estado do Pará: Instituto Evandro Chagas, p. 619-630, 1997.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CRESCENTE, J.A.; DE SOUZA, A.A.; CAMPOS, M.B.; GOMES, C.M.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Belém, v. 104, n. 8, p. 529-535, 2010.

SILVEIRA, F.T; MÜLLER, S. R.; SOUZA, A. A; LAISON, R.; GOMES, C. M. C. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* / Revisiting the pathogenesis of the american tegumentary leishmaniasis in Amazonian, with emphasis to the disease due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

SILVEIRA, FT; LAINSON, R; DE CASTRO GOMES, CM; LAURENTI, MD; CORBETT, CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Belém, Pará (Brasil), v. 31, n. 8, p. 423-31, 2009.

SINGH, S; SINGH, R; SUNDAR, S. Failure of ketoconazole treatment in cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, Varanasi (Índia), v. 34, n. 2, p. 120-1, 1995.

SIRTORI, C.R. The pharmacology of statins. **Pharmacological research**, Itália, v. 88, p. 3-11, 2014.

SMITH, L; SERRANO, DR; MAUGER, M; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F; DEA-AYUELA, MA; LALATSA, A. Orally Bioavailable and Effective Buparvaquone Lipid-Based Nanomedicines for Visceral Leishmaniasis. **Molecular pharmaceutics**, Portsmouth (Inglaterra), v. 15, n. 7, p. 2570-2583, 2018.

SOTO, J e BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Bogotá (Colombia), 100 Suppl 1:S34-40, 2006.

SOTO, J e SOTO, P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, Bogotá (Colombia), v. 4, n. 2, p. 177-185, 2006.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R.S.; PADILLA, J.; ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clinical Infectious Diseases**, Bogotá, v. 33, n. 7, p. 57-61, 2001.

SOUSA, AQ; FRUTUOSO, MS; MORAES, EA; PEARSON, RD; POMPEU, MM. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, Fortaleza, Ceará, v. 53, n. 7, p. 693–5, 2011.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R.. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, Varanasi, v. 347, p. 1739-1746, 2002.

TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; QUEIROZ-ANDRADE, M.; OLIVEIRA, S. Caracterização sociodemográfica da população do povoado de Cavunge-Bahia / Sociodemographic characterization of the Cavungeis village (Bahia, Brazil) population. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 27, n. 1/2, p. 60-75, 2003.

TEMPONE, AG; SARTORELLI, P; TEIXEIRA, D; PRADO, FO; CALIXTO, IA; LORENZI, H; MELHEM, MS. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 103, n. 5, p. 443-9, 2008.

THAKUR, C.P.; DEDET, J.P.; NARAIN, S.; PRATLONG, F.. *Leishmania* species, drug unresponsiveness and visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Patna, v. 95, n. 2, p. 187-189, 2001.

TOBINICK, EL. The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. **Drug News & Perspectives**, v. 22, p. 119–25, 2009.

ULIANA, SR; TRINCONI, CT; COELHO, AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, São Paulo, v. 145, n. 4, p. 464-480, 2018.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDINA, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 265–294, 2015.

VANNIER-SANTOS, M.A.; URBINA, J.A; MARTINY, A.; NEVES, A.; DE SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 337-346, 1995.

VIEIRA, É. L. M.; KEESEN, T. S. L.; MACHADO, P. R.; GUIMARÃES, L. H.; CARVALHO, E. M.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 2, p. 65–72, 2013.

VINOGRADOV, SV; BRONICH, TK e KABANOV AV. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. **Advanced drug delivery reviews**, EUA, v. 54, n. 1, p. 135-47, 2002.

VINOGRADOV, SV. Polymeric nanogel formulations of nucleoside analogs. Expert opinion on drug delivery, Omaha (EUA), v. 4, n. 1, p. 5-17, 2007.

WEINRAUCH, L; LIVSHIN, R; JACOBS, GP; EL-ON, J. Cutaneous leishmaniasis: failure of topical treatment with imidazole derivatives in laboratory animals and man. **Archives of dermatological research**, Jerusalem (Israel), v. 276, n. 2, p. 133-4, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). For research on diseases of poverty. **Disease Watch Focus: Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/publications/disease_watch/leish/en/> Acesso em: 17 fev. 2018.

YAMAMOTO, E.S.; CAMPOS, B.L.; LAURENTI, M.D.; LAGO, J.H.; GRECCO, Sdos S.; CORBETT, C.E.; PASSERO, L.F.. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis*

uncinella leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. **Parasitology Research**, São Paulo, v. 113, n. 1, p. 333-339, 2014.

YAMAMOTO, E.S.; CAMPOS, B.L.; JESUS, J.A.; LAURENTI, M.D.; RIBEIRO, S.P.; KALLÁS, E.G.; RAFAEL-FERNANDES, M.; SANTOS-GOMES, G.; SILVA, M.S.; SESSA, D.P.; LAGO, J.H.; LEVY, D.; PASSERO, L.F. The Effect of Ursolic Acid on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Is Related to Programed Cell Death and Presents Therapeutic Potential in Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS One**, São Paulo, v. 10, n. 12, p. e0144946, 2015.

YAMAMOTO, ES; JESUS, JÁ; BEZERRA-SOUZA, A; LAURENTI, MD; RIBEIRO, SP; PASSERO, LFD. Activity of Fenticonazole, Tioconazole and Nystatin on New World *Leishmania* Species. **Current topics in medicinal chemistry**, São Paulo, v. 18, n. 27, p. 2338-2346, 2018.