



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* DE UMA FORMULAÇÃO
LIPOSSOMAL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham.**

MATEUS ALMEIDA MACÊDO

TERESINA - PI

2017

MATEUS ALMEIDA MACÊDO

**ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* DE UMA FORMULAÇÃO
LIPOSSOMAL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.

TERESINA - PI

2017

MATEUS ALMEIDA MACÊDO

Atividade antileishmania *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *lippia sidoides* Cham.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim

Universidade Federal do Piauí (Orientadora)

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

Universidade Federal do Piauí (Coorientador)

Profa. Dra. Sabrina Maria Portela Carneiro

Universidade Federal do Piauí (Examinador externo)

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior

Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Examinador externo)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRO-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA

Prof. Dr. João Xavier da Cruz Neto

PRO-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Profa. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida;

Aos meus pais Petrônio Macêdo (*in memorian*) e Ana Maria por sempre me apoiarem e incentivarem a alcançar meus objetivos;

Aos meus irmãos Filipe e Tiago companheiros inseparáveis;

A Paloma Machado pelo amor, carinho e compreensão durante essa caminhada;

A minha orientadora Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim;

A Profa. Dra. Maria das Graças Freire de Medeiros pela co-orientação neste trabalho;

Ao Laboratório de Atividade Antileishmania na pessoa do Prof. Dr. Fernando Aécio Amorim de Carvalho;

A toda a equipe do Laboratório de Nanossistemas Farmacêuticos - NANOSFAR;

Ao Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO) – UFPI na pessoa do Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto;

À Profa. Dra. Carla Eiras e ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) – UFPI;

Ao Núcleo de Plantas Medicinais (NPPM);

Ao Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais (NUPLAN) – UFPI na pessoa do Prof. Dr. Francisco Rodrigues Leal;

A todos os mestres que contribuíram para o meu crescimento intelectual e profissional;

Ao Alexandre Xavier, Benedito Neto, Kássia Karoline, Lívia Queiroz, Maria Deusa, Shayara Siríaco e todos os meus colegas de turma da graduação e pós-graduação, pelos momentos descontraídos e de tensão que juntos compartilhamos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, e à UFPI;

A Coordenação do Curso de Farmácia da UFPI na pessoa da Profa. Dra. Waleska Ferreira de Albuquerque;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí - FAPEPI pelo prezado apoio financeiro;

Atividade antileishmania *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* cham. MATEUS ALMEIDA MACÊDO. Orientadora: Profa. Dra. Hercília Maria Lins Rolim. Defesa de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2017

RESUMO

É crescente a necessidade de criar novos sistemas terapêuticos que visem ultrapassar as limitações dos quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose e das doenças tropicais negligenciadas (DTNs). O óleo essencial (OE) de *Lippia sidoides* Cham. possui eficácia comprovada contra vários parasitas e associada à nanopartículas carreadoras como os lipossomas, surgem como uma alternativa promissora. Dessa forma, uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *L. sidoides* Cham. (LIPO-LS) foi desenvolvida e seus efeitos tóxicos e farmacológicos foram avaliados, a fim de contribuir para o conhecimento e desenvolvimento de novos medicamentos. Primeiramente, foi realizada uma prospecção científica e tecnológica sobre a utilização de lipossomas na terapia de DTNs, através da busca de artigos científicos e nos pedidos de patentes depositados em bancos nacionais e mundiais. Os resultados da pesquisa mostraram que o uso de lipossomas se mostra útil no melhoramento das terapias existentes para DTNs ao aumentar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e fornecer uma quimioterapia dirigida a locais específicos de células e órgãos. Em seguida, uma preparação lipossomal de OE de *L. sidoides* Cham. foi desenvolvida pelo método de hidratação do filme lipídico e apresentou diâmetro médio das partículas de 1.230nm, índice de polidispersão (IPD) de 0,152; potencial zeta de +37,1; pH 7,79; elevado teor (94,5%) e eficiência de encapsulação (100%) caracterizado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). e aspecto macroscópico de uma suspensão coloidal uniforme. Os testes *in vitro* mostraram que a encapsulação do OE em lipossomas potencializou a atividade antileishmania e não apresentou citotoxicidade. Portanto, a preparação lipossomal do OE de *L. sidoides* Cham. é uma promissora alternativa para o tratamento da leishmaniose. Porém, devem ser realizados mais testes com essa formulação para obtenção de mais resultados que apontem a viabilidade de um medicamento fitoterápico com segurança e eficácia comprovadas.

Palavras-chave: *Doenças Tropicais Negligenciadas, Leishmaniose, Lippia sidoides, Nanotecnologia, Lipossomas, Prospecção.*

In vitro antileishmania activity of a liposomal formulation containing essential oil of *Lippia sidoides* cham. MATEUS ALMEIDA MACÊDO. Advisor: Dr. Hercília Maria Lins Rolim. Master's defense. Post graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 2017

ABSTRACT

There is a growing need to create new therapeutic systems that aim to overcome the limitations of chemotherapy used in the treatment of leishmaniasis and neglected tropical diseases (NTDs). The essential oil (OE) of *Lippia sidoides* Cham. has proven efficacy against several parasites and associated with carrier nanoparticles such as liposomes, appear as a promising alternative. Thus, a liposomal formulation containing essential oil of *L. sidoides* Cham. (LIPO-LS) was developed and its toxic and pharmacological effects were evaluated in order to contribute to the knowledge and development of new drugs. Firstly, a scientific and technological survey was conducted on the use of liposomes in DTN therapy, through the search for scientific papers and patent applications deposited in national and world banks. The results of the research showed that the use of liposomes is useful in improving existing therapies for NTDs by increasing bioavailability, reducing toxicity and providing targeted chemotherapy to specific sites of cells and organs. Then, a liposomal preparation of OE of *L. sidoides* Cham. was developed by the lipid film hydration method and had a mean particle diameter of 1,230 nm, polydispersity index (IPD) of 0.152; zeta potential of +37.1; pH 7.79; high content (94.5%) and encapsulation efficiency (100%) characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). and macroscopic appearance of a uniform colloidal suspension. In vitro tests showed that OE encapsulation in liposomes potentiated antileishmania activity and did not show cytotoxicity. Therefore, the liposomal preparation of OE from *L. sidoides* Cham. Is a promising alternative for the treatment of leishmaniasis. However, further testing with this formulation should be performed to obtain more results indicating the viability of a herbal medicine with proven safety and efficacy.

Keywords: *Neglected Tropical Diseases, Leishmaniasis, Lippia sidoides, Nanotechnology, Liposomes, Prospecting.*

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1.** Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. 19
- Figura 2.** Status de edemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2013. 21
- Figura 3.** Estigma estético associado à leishmaniose mucocutânea em mulheres adultas iemenitas. 21
- Figura 4.** Planta *Lippia sidoides* Cham (alecrim-pimenta). 24
- Figura 5.** Características estruturais de vários tipos de lipossomas. 27

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Método de hidratação do filme lipídico adaptado de EL ASBAHANI et al., 2015. 59
- Figura 2.** Método para obtenção da taxa de eficiência de encapsulação. 61
- Figura 3.** Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtido do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. com atribuições dos picos principais e a estrutura química do Timol. 62
- Figura 4.** (A) Lipossomas vazios e (B) LIPO-LS obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico. 64
- Figura 5.** Cromatograma obtido por CG-EM mostrando a área correspondente ao timol presente na amostra de LIPO-LS (total). 69
- Figura 6.** Cromatograma do ultrafiltrado da LIPO-LS em CG-EM. 69

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Macrófagos experimentalmente infectados por *L. major* (A). Anfotericina B foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,2 (B). O tratamento foi realizado com lipossomas vazios 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C1), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C2) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C3); OE *L. sidoides* 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D1), 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D2) e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D3); Timol 6,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E1), 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E2) e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E3); LIPO-LS 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F1), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F2) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F3). As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento 1000x. 92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Número de artigos pesquisados nos sites de busca Science Direct, PubMed e Scielo envolvendo os diferentes termos utilizados. 40

Tabela 2. Número de depósitos de patentes pesquisados nas bases do INPI, EPO, USPTO e WIPO envolvendo os diferentes termos utilizados. 42

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química, tempo de retenção e abundancia relativa (área %) dos compostos identificados no óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. 63

Tabela 2. Caracterização após 24h dos lipossomas vazios e da formulação lipossomal contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (LIPO-LS). 65

CAPÍTULO III

Tabela 1. Ação leishmanicida e citotóxica do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, dos lipossomas vazios e da LIPO-LS. 85

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

- Gráfico 1:** Número de artigos encontrados no site de busca Science Direct por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados. 41
- Gráfico 2:** Número de artigos encontrados no site de busca PubMed por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados. 41
- Gráfico 3:** Número de artigos encontrados no site de busca Scielo por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados. 41
- Gráfico 4:** Número de depósitos de patentes pesquisados nas bases do USPTO por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados. 43

CAPÍTULO II

- Gráfico 1.** Distribuição do potencial zeta da LIPO-LS. 66
- Gráfico 2.** Distribuição do potencial zeta dos lipossomas vazios. 66
- Gráfico 3.** Distribuição do tamanho de partícula da LIPO-LS 67
- Gráfico 4.** Distribuição do tamanho de partícula da LIPO-LS 68
- Gráfico 5.** Curva de calibração do Timol. 68

CAPÍTULO III

- Gráfico 1.** Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, da LIPO-LS, Timol e dos lipossomas vazios sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos. 84
- Gráfico 2.** Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, da LIPO-LS, Timol e dos lipossomas vazios sobre a viabilidade de eritrócitos de carneiro. 86
- Gráfico 3.** Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, da LIPO-LS e dos lipossomas vazios sobre formas promastigotas de *Leishmania major*. 88
- Gráfico 4.** Efeitos de óleo essencial de *L. sidoides*, Timol, lipossomas vazios, LIPO-LS e da Anf B como fármaco de referência para avaliar a infectividade de macrófagos murinos por *Leishmania major*. 90
- Gráfico 5.** Efeito do óleo essencial de *L. sidoides*, Timol, lipossomas vazios, LIPO-LS e da Anf B como fármaco de referência para avaliar a infecção de macrófagos murinos por *Leishmania major*. 91

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
LV	Leishmaniose Visceral
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
IFA	Ensaio de Imunofluorescência Indireta
TAD	Teste de Aglutinação Direta
TM	Teste de Montenegro
FDA	Food and Drug Administration
PEG	Polietilenoglicol
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
USPTO	United States Patent and Trademark Office
EPO	European Property Organization
WIPO	World Intellectual Property Organization
SUV	Small Unilamellar Vesicles (vesículas unilamelares pequenas)
LUV	Large Unilamellar Vesicles (vesículas unilamelares grandes)
MLV	Multilamellar Vesicles (vesículas multilamelares)
HSPC	Hydrogenated Soy Phosphatidylcholine, Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada
DMPG	Dimiristoil fosfatidilglicerol
ORZ	Oryzalin
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
OE_s	Óleos Essenciais
OE	Óleo Essencial
TP	Tamanho das Partículas
PDI, IPD	Índice de Polidispersão

CG	Cromatografia Gasosa
EM	Espectro de Massas
CGEM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
TIC	Cromatograma de Íons Totais
OELS	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham
LIPO-LS	Formulação lipossomal contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham
B.O.D.	Demanda Biológica de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
MTT	Teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
CC₅₀	Concentração Citotóxica Média
CH₅₀	Concentração Hemolítica Média
SI_{ama}	Índice de Seletividade para amastigotas internalizadas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Leishmaniose	19
3.2 Óleos essenciais	23
3.3 Nanotecnologia	25
3.4 Lipossomas	26
Referencias Bibliográficas	29
4. CAPÍTULO I: O uso de lipossomas na terapia de doenças tropicais negligenciadas	33
Resumo	34
Resumen	35
Abstract	36
4.1 Introdução	37
4.2 Métodos	39
4.3 Resultados	40
4.4 Discussão	44
4.5 Conclusão	50
Referencias Bibliográficas	51

5. CAPÍTULO II: Obtenção de carreador lipossomal contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	55
Resumo	56
5.1 Introdução	57
5.2 Materiais	58
5.3 Métodos	58
5.3.1 Coleta das amostras	58
5.3.2 Obtenção do óleo essencial	58
5.3.3 Processo de caracterização do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).	58
5.3.4 Preparação das formulações lipossomais.	59
5.3.5 Caracterização das formulações lipossomais.	60
5.3.6 Construção da curva de calibração	60
5.3.7 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de óleo essencial de <i>L. sidoides</i> Cham na LIPO-LS.	60
5.3.8 Análises estatísticas	61
5.4 Resultados e Discussão	62
5.5 Conclusão	71
Referências Bibliográficas	72
6. CAPÍTULO III: <i>In vitro</i> atividade antileishmania e citotoxicidade de uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham.	75
Resumo	76
6.1 Introdução	77
6.2 Materiais e Métodos	78
6.2.1 Animais	78

6.2.2 Parasitos e Células	78
6.2.3 Atividade <i>in vitro</i> sobre o parasita por inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania major</i> .	80
6.2.4 Avaliação da citotoxicidade lipossomal.	80
6.2.4.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT	80
6.2.4.2 Citotoxicidade em eritrócitos de carneiro.	81
6.2.5 Atividade sobre a infecção de macrófagos por amastigotas de <i>Leishmania major</i> .	81
6.2.6 Análise Estatística	82
6.3 Resultados e Discussão	83
6.4 Conclusão	93
Referências Bibliográficas	94
7. Perspectivas	97
APÊNDICE	98

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada por protozoários do gênero *Leishmania* que afeta a pele, membranas mucosas e órgãos internos. Apesar de sua importância epidemiológica, o tratamento é feito com quimioterápicos em geral, por via parenteral que apresentam várias limitações, incluindo toxicidade, alto custo e desenvolvimento de resistência (MONZOTE et al., 2014).

É perceptível, ao longo da história, a necessidade de estudos químicos e farmacológicos com o intuito de encontrar novos compostos, menos tóxicos, economicamente mais viáveis, de efeito específico e que revertam à resistência do parasita às drogas. Nesse sentido é crescente a busca por plantas com potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose. A literatura mostra que vários óleos essenciais, que são misturas complexas de compostos secundários de plantas aromáticas, tem apresentado promissora atividade anti-leishmania como *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides*, *Copaifera reticulata*, *Chenopodium ambrosioides*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Melissa officinalis* (MACHADO et al., 2010; RONDON et al., 2012). Dentre essas, a *Lippia sidoides* Cham. destaca-se por apresentar resultados antileishmania muito promissores que são atribuídos a sua composição rica em timol (MEDEIROS et al., 2011; RONDON et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que múltiplos fármacos antileishmaniana em conjunto ou associados a óleos essenciais aumentam a eficácia da terapia sobre as Leishmanias, reduzindo ainda sua toxicidade (VAN GRIENSVEN et al., 2010). No entanto, como uma mistura de componentes lipofílicos, os óleos essenciais exibem baixa solubilidade em água, alta volatilidade e são susceptíveis a degradação física e química (PINTO et al., 2016). Para contornar essas limitações e promover uma viabilidade de administração biológica desses óleos, alguns métodos da nanotecnologia farmacêutica vêm sendo introduzidos, dentre os quais, a encapsulação lipossomal (WEN et al., 2010).

Lipossomas são vesículas esféricas anfifílicas, formadas por uma ou várias camadas fosfolipídicas com um interior aquoso. Portanto, podem carrear compostos lipofílicos como os óleos essenciais entre suas camadas fosfolipídicas, melhorando sua solubilidade e estabilidade química. Além disso, por serem biodegradáveis, não imunogênicos, não tóxicos e biocompatíveis tornam-se altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (SEBAALY et al., 2015). Os lipossomas são capazes, ainda, de aumentar a eficácia terapêutica além de diminuir os efeitos colaterais como demonstrado pela anfotericina B lipossomal (ambisome®), devido à ampla captação dos mesmos pelos macrófagos que são as células infectadas na leishmaniose (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

Com intuito de promover a administração biológica do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. unindo todas essas características positivas dos lipossomas, a presente dissertação pretende fornecer subsídios para propor uma formulação como alternativa para novos estudos e para o tratamento da leishmaniose.

Portanto, este trabalho intitulado “**Atividade antileishmania *in vitro* de uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *lippia sidoides* cham.**” foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo intitulado “O uso de lipossomas na terapia de doenças tropicais negligenciadas” encontra-se aceito para publicação na Revista Cubana de Farmácia, qualis B4 e apresenta uma prospecção científica e tecnológica, sobre o uso de lipossomas na terapia de doenças tropicais negligenciadas com enfoque na leishmaniose visceral, malária, esquistossomose e doença de Chagas. O capítulo dois teve como objetivo preparar e caracterizar uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *L. sidoides* Cham. Por fim, no terceiro capítulo avaliou-se a atividade citotóxica e leishmanicida *in vitro* do óleo essencial na forma lipossomal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de partes aéreas de *Lippia sidoides* Cham. e investigar *in vitro* as atividades citotóxica e leishmanicida em *Leishmania major*.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar o óleo essencial de folhas e flores do vegetal *L. sidoides* Cham;
- Desenvolver uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *L. sidoides* Cham;
- Comparar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. na forma livre e incorporado em preparação lipossomal sobre as formas promastigotas e amastigotas internalizadas de *L. major*;
- Avaliar o potencial citotóxico do óleo essencial e da formulação lipossomal contendo o óleo de *L. sidoides* Cham. sobre macrófagos peritoneais murinos;
- Investigar a atividade hemolítica do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. livre e na forma encapsulada em eritrócitos de carneiros;

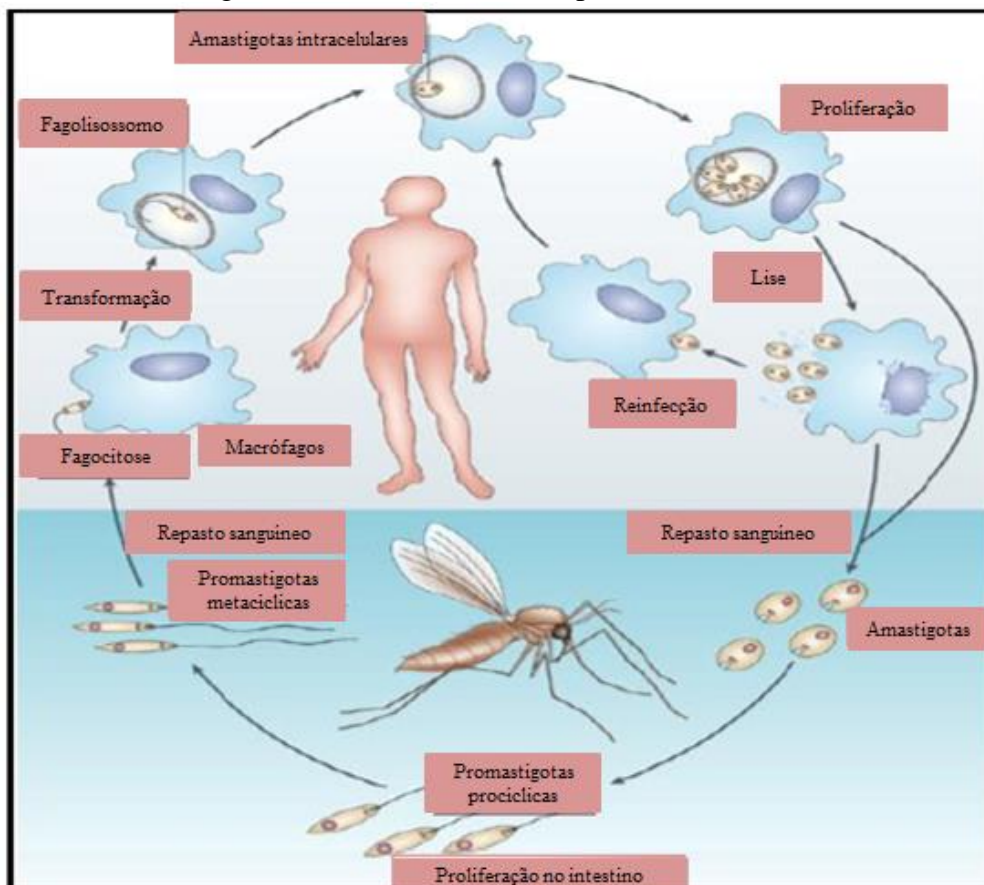
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 LEISHMANIOSE

Um dos maiores problemas de saúde pública no mundo tropical e subtropical é a leishmaniose, responsável por aproximadamente 50 mil mortes anuais (ORYAN, 2016). É considerada uma das dezoito doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (WHO, 2016). A leishmaniose é uma doença causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae), sendo transmitidos por mais de 90 espécies de flebotomíneos. Os sintomas patológicos dessa doença variam em função da espécie do parasita e do estado imunológico do hospedeiro, que inclui os seres humanos e os cães (FEASEY et al., 2010; SHUKLA et al., 2011, SABUR, 2016).

O ciclo de vida desses parasitas (figura 1) inclui duas formas distintas, uma forma promastigota móvel extracelular encontrada principalmente nos vetores dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* e uma forma amastigota intracelular não flagelada que pode ser encontrada dentro dos fagócitos mononucleares no hospedeiro mamífero (ALMEIDA et al., 2003; CHAPPUIS et al., 2007).

Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados.



Fonte: Adaptado de CHAPPUIS et al., 2007.

A infecção ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos, quando formas promastigotas infectantes (metacíclicas) são inoculadas na derme do hospedeiro, juntamente com a saliva do vetor que auxilia a lise do tecido e aumenta o fluxo de células sanguíneas para o local da picada, pois apresenta substâncias imunossupressoras (KATO et al., 2010; ASSCHE et al., 2011). O sistema retículo-endotelial reconhece essas formas promastigotas que são então fagocitadas, principalmente por macrófagos (PATIL et al., 2012). Estas células se fundem aos lisossomos formando os fagolisossomos, ou vacúolo parasitóforo onde os parasitas sofrem alterações morfológicas e bioquímicas radicais, para se transformarem em amastigotas, adaptando-se às novas condições fisiológicas e resistindo à ação destruidora do fagolisossomo e por divisão binária multiplicam-se até ocuparem todo o citoplasma. Após a lise dessas células infectadas, os parasitas ficam livres e podem reinfestar outras células. (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; BATES, 2007).

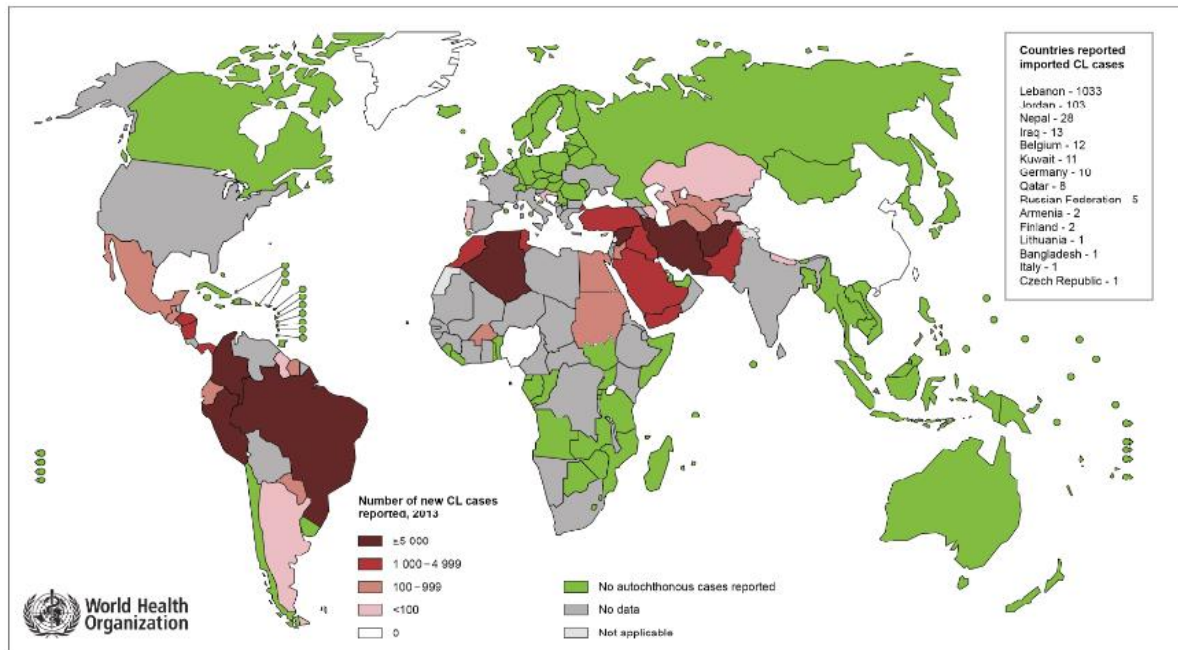
Durante a hematofagia, um novo flebotomíneo, ainda não infectado, pode ingerir formas amastigotas que se transformam no intestino do inseto em promastigotas não infectivas (procíclicas) devido à diferença de temperatura e mudança do pH e agora, se replicam intensamente. As promastigotas diferenciam-se então em promastigotas infectivas (metacíclicas) que migram para o trato digestivo anterior do inseto e podem ser regurgitadas durante um novo repasto sanguíneo do inseto vetor, dando continuidade ao ciclo de vida destes parasitos como demonstrado na figura 1 (SOARES et al., 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

As formas da Leishmaniose são definidas pela síndrome clínica causada pelas várias espécies de parasitas. Existem pelo menos sete espécies de *Leishmania* descritas e associadas com a doença humana no Brasil *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* and *L. (V.) naiffi*, resultando, portanto, em pequenas variações fisiopatológicas da mesma. (ESPIR, et al., 2016). As principais classificações da doença são a leishmaniose visceral (LV, ou calazar), leishmaniose cutânea (LC, ou tegumentar), leishmaniose mucosa (LM) ou leishmaniose mucocutânea (LMC) (ALVAR et al., 2013).

A leishmaniose visceral é a forma mais grave e fatal se não tratada. A mais comum é a LC, localizada na pele, as manifestações se desenvolvem a partir de um pequeno nódulo de feridas ulcerativas, e infecta macrófagos dérmicos, embora possa evoluir para LMC com metástases no tecido mucoso e medula óssea. O Brasil está entre os cinco países mais afetados pela leishmaniose cutânea, sendo endêmica em 98 países e cinco continentes (Figura 2). Em todo o mundo, 1.500.000 novos casos da doença são notificados anualmente (ALVAR et al.,

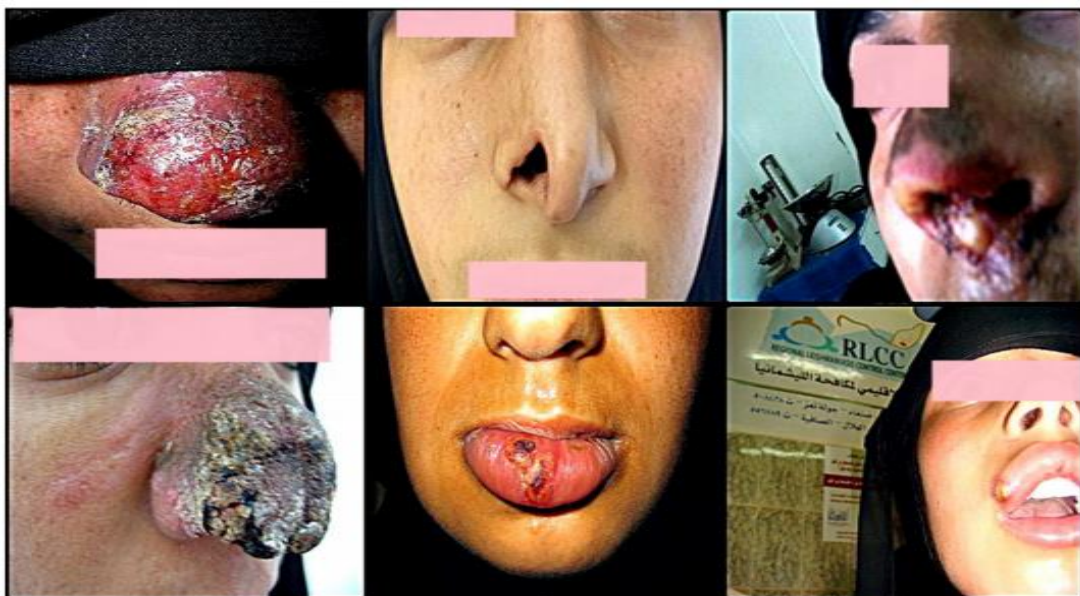
2013). Entretanto, sua importância não está apenas na sua alta incidência e ampla distribuição, mas na possibilidade de assumir formas clínicas crônicas que podem determinar lesões desfigurantes e incapacitantes, com grande estigma psicossocial no indivíduo atingido (Figura 3) (ESPIR et al., 2016).

Figura 2. Status de edemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2013.



Fonte: modificado de WHO, 2013.

Figura 3. Estigma estético associado à leishmaniose mucocutânea em mulheres adultas iemenitas.



Fonte: MOHAMED A.; AL-KAMEL, M. D. 2016.

O primeiro relato de caso no Brasil deu-se em 1934, dada a presença de parasitas no fígado de paciente com suspeita de febre amarela. A partir de então surtos foram sendo notificados, como em Sobral (CE), 20 anos após o ocorrido (GONTIJO, 2004). No entanto, somente a partir da década de 80, o aumento tornou-se bem mais significativo, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995) (Ministério da Saúde, 2007). A doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando inclusive a periferia de grandes centros urbanos (GONTIJO, 2004).

O diagnóstico da leishmaniose pode ser feito por métodos sorológicos, com base na presença de anticorpos específicos contra antígenos parasitários, como ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), análise Western blot, ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) e teste de aglutinação direta (TAD). Podem também ser utilizadas técnicas imunocitoquímicas e avaliação histopatológica com identificação de amastigotas no tecido, isolamento de promastigotas *in vitro*, o teste de Montenegro (TM) e outras. Entretanto, esses testes laboratoriais devem ser associados aos aspectos clínicos e epidemiológicos, pois possuem limitações como a presença de falsos positivos, principalmente em regiões endêmicas. O TM, por exemplo, ainda permanece positivo indefinidamente em doentes tratados. Assim, os testes imunológicos utilizados na prática clínica são indicadores indiretos de infecção por *Leishmania* (ESPIR et al., 2016).

O tratamento clássico de todas as espécies de *Leishmania* são os antimônias pentavalentes na forma de estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime®), porém, é crescente a resistência a esses compostos e a toxicidade destes medicamentos é muito alta, sendo relatados mal-estares, anorexia, mialgias, artralgias, sintomas abdominais como pancreatite química e hepatoesplenomegalia, dores de cabeça, leve leucopenia, diminuição dos níveis de plaqueta e cardiotoxicidade (CROFT & COOMBS, 2003; YASINZAI et al., 2013).

As drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas. No entanto, todas apresentam como desvantagens a via de administração (parenteral), terapia de longa duração, e principalmente a ampla gama de efeitos adversos relacionados com seu uso (SOUZA, 2007).

Outros medicamentos alternativos foram surgindo, como a Miltefosina, Paramomicina e a Anfotericina B lipossomal. A Miltefosina é potencialmente teratogênica assim, as mulheres da faixa etária fértil tem que praticar a contracepção durante quase quatro meses e deve ser administrada durante 28 dias, resultando em frequentes casos de não adesão ao tratamento. Além disso, a sua meia-vida longa torna-o vulnerável ao desenvolvimento de

resistência e ao conseqüente insucesso no tratamento. A Anfotericina B lipossomal foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da leishmaniose em 1997. Trata-se de uma formulação extremamente eficaz, que em estudos clínicos cura quase 100% dos casos de leishmaniose visceral, e que se tornou o fármaco de escolha para os casos resistentes aos antimoniais. Apesar dos lipossomas reduzirem sua toxicidade, a dificuldade de administração e principalmente o alto custo dessa formulação continua como empecilho à sua utilização. (FRIES E FAIRLAMB, 2003; ALVAR et al., 2013).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são utilizados em todo o mundo devido as suas características físico-químicas e relevantes atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antiviral, praguicidas, repelentes e etc). Eles são uma mistura complexa de mais de 100 compostos voláteis extraídos de plantas aromáticas, pertencentes a uma variedade de classes químicas por isso sua ampla atividade biológica. Os principais constituintes dos óleos essenciais são os Terpenóides e fenilpropanóides estando presentes ainda, alguns constituintes aromáticos e alifáticos, monoterpênicos, sesquiterpênicos e derivados oxigenados destes dois que são os maiores grupos de entidades químicas nos óleos essenciais (RAUT E KARUPPAYIL, 2014).

Os OEs podem ser obtidos por diferentes métodos de extração a partir de várias partes da planta como folhas, flores, frutos, galhos, cascas e raízes. Assim, são de grande interesse para a indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentos. Na área farmacêutica o número de preparações está em constante crescimento, sendo encontrados sob a forma de cremes, pomadas, cápsulas, xaropes, supositórios, aerossóis e sprays (DO et al., 2015; EL ASBAHANI et al., 2015).

O gênero *Lippia* (*Verbenaceae*) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. As espécies são principalmente distribuídas nos países da América do Sul e Central, e ainda no território tropical Africano. A maioria delas é utilizada tradicionalmente como protetora do trato gastrointestinal e respiratório, no entanto, algumas espécies apresentaram ainda, atividades antimalárica, antileishmania, antiviral e até mesmo atividade citostática (PASCUAL, 2001).

Em geral, as espécies do gênero *Lippia* mostram um conteúdo variável de óleos essenciais. Os compostos encontrados em maior frequência nestes óleos são os monoterpênicos: limoneno, p-cimeno, linalol, timol, carvacrol cânfora e o sesquiterpeno cariofileno. Os flavonóides encontrados nestas espécies são flavonas 6-hidroxilados e metoxi para a maior parte, e também são identificados alguns sulfatos flavona, mas estes têm sido identificados

apenas em alguns deles. Em geral, eles mostram pouca tendência para a toxicidade (PASCUAL, et al, 2001).

A *Lippia sidoides* Cham. é conhecida popularmente como alecrim-pimenta (figura 4), sendo encontrada no semi-árido do Nordeste brasileiro principalmente nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Na medicina popular é utilizada como antisséptico, no combate a inflamação de boca e garganta, para lavagens de pele, couro cabeludo e mucosas. Esta espécie produz um óleo essencial rico em terpenos, onde o timol destaca-se por sua potente ação antimicrobiana contra fungos e bactérias (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2007; MONTEIRO, 2007; ALBUQUERQUE, 2008). O carvacrol, outro composto abundante no alecrim-pimenta, apresenta uma grande atividade antimicrobiana que se dá por meio da alteração da permeabilidade da membrana celular do microorganismo e posterior desintegração da mesma (BURT, 2004).

Em virtude destas propriedades, este vegetal é cultivado em hortos de plantas medicinais e faz parte do elenco de plantas medicinais selecionadas pelo Governo do Estado do Ceará (COSTA, 2002).

Figura 4. Planta *Lippia sidoides* Cham (alecrim-pimenta)



Fonte: Arquivo pessoal

O aparecimento de estirpes resistentes de patógenos aos medicamentos, aumento da população imunocomprometida e limitações dos quimioterápicos têm motivado as pessoas a usar terapias complementares e alternativas, incluindo o uso de óleos essenciais (OEs) que possuem propriedades farmacêuticas importantes. Assim, podem ser utilizados para

quimioterapia de doenças infecciosas, bem como não infecciosas (RAUT E KARUPPAYIL, 2014). Dentre essas podemos citar a ação leishmanicida do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. demonstrada por Farias-Junior et al. (2012) e Medeiros et al. (2011).

Um empecilho ao uso dos óleos essenciais é o fato de apresentarem pobre solubilidade em água, tornando-se difícil promover a viabilidade biológica destes. Além disso, são facilmente degradados por ação do oxigênio, da luz, do calor e da umidade (RODRIGUEZ et al., 2016). A oxidação dos OEs geram numerosas espécies de radicais livres, produtos de oxidação primária como hidroperóxidos de lípidos e produtos de oxidação secundária como aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas e epóxidos. Assim, alguns deles podem provocar danos aos tecidos biológicos (CHANG E YEH, 2012). Como resultado desta oxidação, as propriedades e o valor nutricional dos óleos são perdidos com uma produção de odor e sabor desagradável. No entanto, algumas estratégias de Tecnologia Farmacêutica são aplicadas para permitir seu uso, dentre estas, os lipossomas.

3.3 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia tem despertado um interesse muito grande em pesquisadores e indústrias visando o desenvolvimento de vetores de fármacos inovadores. Além de servirem como um sistema de entrega de fármacos, muitos demonstraram vantagens promissoras quando comparados com medicamentos convencionais, como aumentar a biodisponibilidade oral, superar a resistência a fármacos e ainda aumentar a adesão do paciente ao tratamento (KHDAIR et al., 2016).

As nanopartículas são sistemas nanovesiculares que variam de 1 a 100nm com núcleo onde o fármaco líquido, sólido ou semi-sólido é confinado rodeado por uma membrana de polímero. Essa estrutura pode ser hidrofílica ou lipofílica dependendo dos compostos e método empregado. No entanto, o prefixo "nano" é comumente usado para partículas que possuem tamanho de até várias centenas de nanômetros (RODRIGUEZ et al., 2016).

Atualmente, várias nanopartículas já são encontradas no mercado e muitas outras estão em ensaios clínicos avançados, sendo em sua maioria lipossomas que conta com 13 formulações aprovadas para uso clínico dentre as quais podemos citar Ambisome®, Abelcet®, Amphotec®, DaunoXome®, Doxil®, Lipo-dox®, Myocet®, Visudyne®, Depocyt®, DepoDur®, Epaxal®, Inflexal V® e Lipusu® sendo todas de uso parenteral e em geral por via intravenosa (CHANG E YEH, 2012; KOUDELKA E TURÁNEK, 2012).

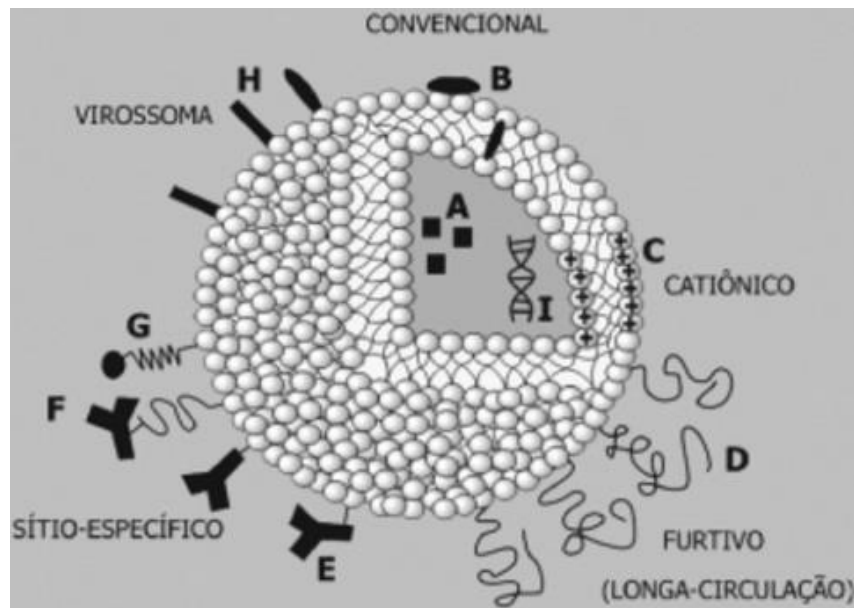
3.4 LIPOSSOMAS

Os lipossomas são estruturas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas fosfolípídicas anfifílicas orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso, o que permite o carregamento de fármacos, biomoléculas ou agentes de diagnóstico com caráter hidrofílico ou hidrofóbico (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007; RODRIGUEZ et al., 2016).

Os lipossomas são classificados segundo a interação com os sistemas biológicos em convencionais, de longa circulação e sítio-específicos (figura 5). Suas estruturas podem ainda ser alteradas possibilitando maior uso clínico. Os lipossomas convencionais são geralmente compostos por fosfolipídeos e colesterol além de lipídeos com carga positiva como a octadecilamina (estearilamina) ou negativa como fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico, para aumentar o volume aquoso interno e prevenir a agregação de vesículas. *In vivo* os lipossomas convencionais são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, sendo, então, rapidamente removidos da circulação. Como forma de inibir esse reconhecimento, podem-se adicionar polímeros de polietilenoglicol (PEG) na superfície dos lipossomas aumentando o tempo de meia-vida das vesículas e tornando a farmacocinética dos lipossomas dose-independente. Estes são chamados de lipossomas longa circulação, stealth ou furtivos. Existem ainda os lipossomas sítio-específicos onde são utilizados ligantes acoplados em sua superfície como anticorpos, glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas virais e lectinas que conferem especificidade de interação entre lipossomas e células-alvo, aumentando a quantidade de fármaco liberado nestas células. Portanto, o uso de lipossomas sítio-específicos possibilita a diminuição da dose terapêutica, minimizando ou eliminando os efeitos colaterais da terapêutica convencional (ROLIM-SANTOS et al., 2006; BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

Esses vários tipos de lipossomas são preparados por diferentes métodos. Geralmente, é utilizada a técnica de hidratação do filme lipídico, processo clássico para obter lipossomas, que envolve quatro etapas principais: secagem de lipídios diluídos em solventes orgânicos, adição de um meio aquoso, agitação e dimensionamento para se obter uma distribuição homogênea de vesículas. Este processo permite a obtenção de vesículas multilamelares (MLV) que podem ser submetidas a vários processos mecânicos, tais como a extrusão através de membranas de policarbonato, de ultra-sons e microfluidização / homogeneização para obtenção vesículas unilamelares grandes (LUV) ou pequenas vesículas unilamelares (SUVs) (ESTANQUEIRO et al., 2015).

Figura 5. Características estruturais de vários tipos de lipossomas



Lipossomas convencionais (A) fármaco hidrofílico no interior do lipossoma e (B) fármaco lipofílico adsorvido ou inserido na bicamada lipídica; catiônico (C); de longa circulação (*stealth* ou furtivo) - com polímero hidrofílico na superfície (D); sítios específicos - (E), (F) com anticorpos ligantes e (G) com peptídeos e proteínas ligadas na sua superfície; virossomas- com envelope viral na sua superfície (H); (I) DNA-plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos. Fonte: BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007.

Os lipossomas dispersos em solução aquosa geralmente enfrentam instabilidades, causadas por processos químicos, físicos e biológicos que podem resultar em um curto tempo de meia-vida. A integridade da formulação pode ser interferida pela hidrólise da cadeia lipídica que é favorecida pela variação de pH e leva à formação de um produto intermediário, a liso-fosfatidilcolina (liso-PC) que acentua a permeabilidade dos lipossomas. Dependendo da composição os lipossomas podem sofrer também oxidação da insaturação localizada na cadeia lipídica. Entretanto, a estabilidade pode ser mantida com a conservação dos lipossomas em atmosfera de nitrogênio e argônio, pelo uso de antioxidantes como alfa-tocoferol na preparação, como também pela liofilização da formulação final com a ajuda de um crioprotetor (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007).

Os crioprotectores precisam ser adicionados para manter a distribuição do tamanho de partícula dos lipossomas após o ciclo de liofilização-re-hidratação. Nos produtos liofilizados comerciais de lipossomas, a lactose tem sido utilizada como um crioprotetor nas formulações de Amphotec®, Myocet®, e Visudyne®, e foi adicionada sacarose na formulação de AmBisome® para aumentar a estabilidade dos lipossomas durante a

liofilização. Em geral, a liofilização aumenta à meia-vida das formulações lipossômicas pela maior estabilidade em estado seco, a serem reconstituídos com veículo antes da administração. Em fármacos comerciais baseados em lipossomas, AmBisome®, Amphotec®, Myocet® e Visudyne® são todos produtos liofilizados (CHANG E YEH, 2012).

Além disso, a inclusão de uma pequena quantidade de lipídeos com carga (p.ex., estearilamina ou dicetilfosfato) nos lipossomas produz repulsão eletrostática entre as vesículas, reduzindo a agregação e a fusão das vesículas. Já o extravasamento do fármaco encapsulado pode ser evitado com o acréscimo de colesterol que reduz a fluidez e deformação da membrana. A natureza dos componentes lipídicos, a carga elétrica da superfície, o tamanho das vesículas, o reconhecimento pelo sistema complementar e o reconhecimento pelos macrófagos influenciam também na eliminação dos lipossomas da circulação (VONARBOURG et al., 2006).

Assim, a caracterização físico-química das suspensões coloidais, incluindo os lipossomas é de grande importância e realizada através da avaliação morfológica, da determinação do potencial zeta, do pH, da quantificação do fármaco encapsulado, da distribuição do tamanho de partícula e da massa molar do polímero, da cinética de liberação do fármaco e também da avaliação da estabilidade durante o tempo de armazenamento. A avaliação desses parâmetros permite descrever a organização molecular das nanopartículas que podem ter sua composição quali-quantitativa alterada para obtenção de formulações mais estáveis e eficazes (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Em adição, os lipossomas tendem a se acumular no organismo e esta propriedade tem sido explorada na terapia antimicrobiana, quimioterapia do câncer, vacinas e diagnóstico por imagem. Os resultados têm indicado claramente que alguns lipossomas que encapsulam fármacos e vacinas exibem superior propriedade farmacológica em relação aos medicamentos tradicionais (CHANG E YEH, 2012; SABUR et al., 2016).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; COSTA, M. R. M.; HIGINO, J. S. Efeito antimicrobiano do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre microrganismos cariogênicos. **Arquivos em Odontologia**, v. 44, n. 4, 2008.
- ALMEIDA, M.C. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 861–870, 2003.
- ALVAR, J.; CROFT, S. L.; KAYE, P.; KHAMESIPOUR, A.; SUNDAR, S.; REED, S. G. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v.31S, p. B244– B249, 2013.
- ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 337-351, 2011.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans **Advances in Parasitology**, v. 64, p. 455-458, 2007.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288–294, 2007.
- CHANG, H.; YEH, M.; Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.49–60, 2012.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- COSTA, S. M. O. Constituintes químicos de *Lippiasidoides*(Cham.) *Verbenaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.
- CROFT, S.L., COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-208, 2003.
- DO, T. K. T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Authenticity of essential oils. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 146–157, 2015.
- ESPIR, T.T.; GUERREIRO, T. S.; NAIFF, M. F.; FIGUEIRA, L. P.; SOARES, F. V.; SILVA, S. S.; FRANCO, A. M. R. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 167, 2016.

ESTANQUEIRO, M.; AMARAL, M, H.; CONCEIÇÃO, J.; LOBO, J. M. S. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631–648, 2015.

EL ASBAHANI, A. E.; MILADI. K.; BADRI. W.; SALA. M.; AÏT ADDI. E.H.; CASABIANCA. H.; EL MOUSADIK. A.; HARTMANN. D.; JILALE. A.; RENAUD. F.N.R.; ELAISSARI. A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 483, n. 1–2, p. 220-243, 2015.

FARIAS-JUNIOR, P.A., RIOS, M.C., MOURA, T.A., ALMEIDA, R.P., ALVES, P.B., BLANK, A.F., FERNANDES, R.P.M., SCHER, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biol. Res**, v.45, p.399–402, 2012.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179–200, 2010.

FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

FRIES, D.S., FAIRLAMB, A.H.; Antiprotozoal agents. **Burger's Medicinal chemistry and Drug Discovery**, 6thEd, 2003.

GONTIJO, C. M. F. MELO, M. N.; Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, 2004.

KATO, H.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; UEZATO, H. MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 814-826, 2010.

KAYE, P.; SCOTT P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, p. 604-615, 2011.

KHDAIR, A.; HAMAD, I.; ALKHATIB, H.; BUSTANJI, Y.; MOHAMMAD, M.; TAYEM, R.; AIEDEH, K. Modified-chitosan nanoparticles: Novel drug delivery systems improve oral bioavailability of doxorubicin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 38–44, 2016.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 163, p. 322–334, 2012.

MACHADO, M.; SOUSA, M. C.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. Os óleos essenciais como agentes anti-parasitários. **Revista de Fitoterapia**, v. 10, p. 35-44, 2010.

MEDEIROS, M. G. F.; SILVA, A. C.; BORGES, A. R.; LIMA, S. G.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, p. 237–241, 2011.

MOHAMED A.; AL-KAMEL, M. D. Impact of leishmaniasis in women: a practical review with na update on my ISD-supported initiative to combat leishmaniasis in Yemen (ELYP). **International Journal of Women's Dermatology**. v. 2, p. 93–101, 2016.

MONTEIRO, M. V. B.; DE MELO LEITE, A. K.; BERTINI, L. M.; DE MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. Topical anti-inflammatory, gastro protective and antioxidante

effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 378–382, 2007.

MONZOTE, L.; PASTOR, J.; SCULL, R.; GILLE, L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1048–1052, 2014.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 1–8, 2016.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201–214, 2001.

PATIL, M. S.; KSHIRSAGAR, S. S.; CHAUDHARI, P. S.; BAYAS, J. P.; OSWAL, R. J. Synthetic and natural products against leishmaniasis: a review. **World Journal of Public Health Sciences**, v. 1, p. 7, 2012.

PINTO, N.O.F; RODRIGUES, T.H.S; PEREIRA, R.C.A; SILVA, L.M.A. et al., Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279–288, 2016.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250–264, 2014.

RODRIGUES, L.; MARTÍN, M.A.; RUIZ, M.A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41–59, 2016

RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 185–191, 2012.

ROLIM-SANTOS, H. M. L.; DE QUEIROZ, F. B; MAIOR, R. M. S; DO NASCIMENTO, S. C; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Com A-liposomes. **Drug Development Research**, v. 67, p. 430-47, 2006.

SABUR, A.; ASAD, M.; Ali, N. Lipid based delivery and immuno-stimulatory systems: Master tools to combat leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 55-60, 2016.

SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, v. 178, p. 52–62, 2015.

SHUKLA, A.K., PATRA, S., DUBEY, V.K. Deciphering molecular mechanism underlying antileishmanial activity of *Nyctanthes arbortristis*, an Indian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 996–998, 2011.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

SOARES, C. D.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, A. A.; SARAIVA, E. A. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOUZA, G. F.; **Comparação de aspectos clínicos e diagnósticos da Leishmaniose Visceral entre portadores e não portadores do vírus da imunodeficiência adquirida**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ESPIR. T. T.; GUERREIRO. T. S.; NAIFF. M. F.; FIGUEIRA. L. P.; SOARES. F. V.; SILVA. S. S.; FRANCO, A. M. R.; Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 1-6, 2016.

VAN GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis**, v. 10, n. 3, p. 184e194, 2010.

VONARBOURG, A.; PASSIRANI, C.; SAULNIER, P.; BENOIT, J. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials**, Surrey, v. 27, p. 4356-4373, 2006.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png?ua=1. Acesso: 22 setembro. 2016.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso: 27 setembro. 2016.

WEN, Z.; LIU, B.; ZHENG, Z.; YOU, X.; PU, Y.; LI, Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, p. 1102–1107, 2010.

YASINZAI, M.; KHAN, M.; NADHMAN, A.; SHAHNAZ, G. Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives. **Future Medicine Chemical**, v.5, p. 1877–1888, 2013.

CAPÍTULO I

**O USO DE LIPOSSOMAS NA TERAPIA DE DOENÇAS TROPICAIS
NEGLIGENCIADAS**

Aceito no periódico “Revista Cubana de Farmácia”

Qualis B4

**O USO DE LIPOSSOMAS NA TERAPIA DE DOENÇAS TROPICAIS
NEGLIGENCIADAS**

EL USO DE LIPOSOMAS PARA ENFERMEDADES TROPICALES OLVIDADAS

**THE USE OF LIPOSOMES IN THERAPY OF NEGLECTED TROPICAL
DISEASES**

MACÊDO, M. A.¹; MORENO, L. C. G. A. I.²; SILVA, O. A.³; ROLIM, H. M. L.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, Teresina – PI, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, Recife – PE, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Biotecnologia_RENORBIO, Teresina – PI, Brasil

RESUMO

Objetivo: Demonstrar o uso de lipossomas como alternativa promissora para o tratamento de doenças negligenciadas. **Métodos:** A busca foi efetuada utilizando as palavras-chaves: *treatment of visceral leishmaniasis and liposome, treatment of malaria and liposome, treatment of schistosomiasis and liposome e treatment of Chagas disease and liposome* e suas traduções correspondentes em português nos sites Science Direct, PubMed e Scielo e nas bases INPI, USPTO, EPO e WIPO. **Resultados:** Estudos realizados com animais infectados com parasitas do gênero *Leishmania* mostraram que os antimoniais pentavalentes encapsulados em lipossomas são de 200 a 700 vezes mais eficazes no tratamento da leishmaniose visceral que o fármaco livre. Animais infectados com parasitas do gênero *Plasmodium* também responderam melhor ao tratamento com β -artemeter e primaquina encapsuladas. Camundongos portadores de esquistossomose foram tratados com lipossomas contendo praziquantel e tártaro emético e mostraram diminuição dos ovos e parasitas, além de redução da toxicidade. Por fim, camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* foram tratados com preparações lipossomais de benznidazol e foi obtida uma maior eficácia de ação e menos efeitos colaterais. **Conclusão:** O uso de lipossomas mostra-se útil no melhoramento das terapias existentes para doenças negligenciadas ao aumentar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade e fornecendo uma quimioterapia dirigida a locais específicos de células e órgãos. **Palavras-chave:** *Leishmaniose, Malária, Esquistossomose, Doença de Chagas, Lipossomas.*

RESUMEN

Objetivo: Demostrar el uso de liposomas como alternativa prometedora para el tratamiento de enfermedades olvidadas. **Métodos:** La búsqueda fue efectuada utilizando las palabras clave: *treatment of visceral leishmaniasis and liposome*, *treatment of malaria and liposome*, *treatment of schistosomiasis and liposome* e *treatment of Chagas disease and liposome* y sus traducciones en portugués en las páginas web Science Direct, PubMed y Scielo y en las bases de datos INPI, USPTO, EPO e WIPO. **Resultados:** Estudios realizados en animales infectados con parásitos del género *Leishmania* demostraron que los antimoniales pentavalentes encapsulados en liposomas son de 200 a 700 veces más eficaces en la terapia de la leishmaniasis visceral que el fármaco libre. Animales infectados con parásitos del género *Plasmodium* también respondieron mejor al tratamiento con β -artemeter y primaquina encapsuladas. Ratones portadores de esquistosomosis fueron tratados con liposomas con praziquantel y tártaro emético y demostraron disminución de huevos y parásitos, además de reducción de toxicidad. Finalmente, ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* fueron tratados con preparaciones liposomales de benznidazol y fue obtenida una mayor eficacia de acción y menos efectos secundarios. **Conclusión:** el uso de liposomas parece útil en la mejora de las terapias existentes para enfermedades olvidadas por aumentar la biodisponibilidad, reducir la toxicidad y proporcionar una quimioterapia dirigida a sitios específicos de células y órganos.

Palabras-clave: *Leishmaniasis, Malaria, Esquistosomiasis, Enfermedad de Chagas, Liposomas.*

ABSTRACT

Objective: Demonstrate the use of liposomes as promising alternative to treatment in the neglected diseases. **Methods:** The search was performed using the keywords: *treatment of visceral leishmaniasis and liposome, treatment of malaria and liposome, treatment of schistosomiasis and liposome and treatment of Chagas disease and liposome* and their corresponding translations in Portuguese in the sites Science Direct, PubMed and Scielo and the bases INPI, USPTO, EPO e WIPO. **Results:** Studies with animals infected with *Leishmania* species showed that pentavalent antimony encapsulated in liposomes are 200-700 times more effective in the treatment of visceral leishmaniasis than drug free. Similarly, animals infected with parasites of the genus *Plasmodium* responded better to treatment with β -artemether and primaquine encapsulated. Mice with schistosomiasis were treated with liposomes containing praziquantel and tartar emetic and showed reduction in ova and parasites, and reduced toxicity. Finally, mice infected with *Trypanosoma cruzi* were treated with benznidazole liposomal preparations were obtained and greater effectiveness of action and fewer side effects. **Conclusion:** The use of liposomes proves useful in the improvement of existing therapies for neglected diseases, due to increase the bioavailability, reduce toxicity, and providing a drug targeting to specific sites of cells and organs.

Keywords: *Leishmaniasis, Malaria, Schistosomiasis, Chagas Disease, Liposomes.*

INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas são um conjunto de patologias causadas por agentes infecciosos e parasitários (protozoários, vírus, bactérias e helmintos), geralmente associadas a regiões de clima tropical com reduzido crescimento financeiro, atingindo cerca de 2,7 bilhões de pessoas no mundo^{1,2}.

Essas afecções são em grande parte causadas por protozoários e transmitidos por meio de vetores cujo tratamento é inexistente, precário ou ultrapassado. Moléstias como a leishmaniose visceral, malária, esquistossomose e doença de Chagas têm sido tratadas com medicamentos que apresentam alta toxicidade, o que debilita o paciente já tão enfraquecido pela infestação dos parasitas e induz a não adesão ao tratamento³.

Neste sentido percebe-se a necessidade urgente de criar novos sistemas terapêuticos que visem ultrapassar estas limitações, e melhorar o transporte dos fármacos até ao local alvo, garantindo aumento da eficácia terapêutica. Surge então a nanotecnologia que se expandiu amplamente nas últimas décadas, tornando possível a utilização de propriedades físico-químicas únicas de nanopartículas, como os lipossomas, em sistemas de carreamento de fármacos para compartimentos específicos de células ou órgãos normalmente inacessíveis para alguns medicamentos, o que gerou uma nova perspectiva na saúde e medicina⁴. Atualmente, 13 fármacos lipossomais têm sido aprovados e muitos outros estão realizando ensaios clínicos⁵.

Lipossomas são vesículas microscópicas esféricas compostas por uma ou múltiplas bicamadas constituídas geralmente por fosfolipídios e colesterol ao redor do núcleo aquoso⁶. Estes têm sido desenvolvidos como carreadores de fármacos por diferentes vias de administração como a via oral⁷, intravascular⁸ pulmonar⁹, ocular¹⁰ e assim por diante. Isto é possível devido à composição lipídica, carga de superfície, número e fluidez da bicamada do lipossoma poderem ser alterados, de modo a controlar a orientação, a distribuição, a entrega de fármacos e a toxicidade⁴.

A composição anfipática, dessas vesículas microscópicas esféricas, possibilita carrear moléculas hidrofílicas no núcleo aquoso, lipofílicas na membrana e substâncias anfifílicas na interface aquosa lipídica⁵. Ao alterar a composição fosfolipídica as características dos lipossomas podem ser modificadas. A adição de polímeros tais como o polietilenoglicol (PEG) na bicamada lipídica pode proteger o lipossoma de reconhecimento imunológico e perda de estabilidade devido à formação de uma barreira estérica em torno da superfície lipossomal que impede a ligação de proteínas do plasma. Resulta ainda, em um

longo tempo do fármaco na circulação sanguínea, o que pode melhorar a eficácia terapêutica¹¹.

Além disso, propriedades das nanopartículas, tais como o tamanho e a carga, desempenham um papel crucial na superação das barreiras biológicas para atingir a região alvo. Portanto, de acordo com a modalidade terapêutica pretendida, realizar adaptações nas propriedades físico-químicas pode ser um fator essencial para o sucesso dos lipossomas⁵.

Esses nanossistemas, também conhecidos como vesículas lipídicas, são geralmente classificados de acordo com seu tamanho e número de bicamadas. São denominadas small unilamellar vesicles (SUV) ou pequenas vesículas unilamelares quando variam entre 20 e 100 nm e de large unilamellar vesicles (LUV) ou grandes vesículas unilamelares quando são maiores que 100 nm e possuem uma única lamela. Entretanto, apresentam-se também como multilamellar vesicle (MLV) ou vesículas multilamelares que possuem tamanho superior a 0,5 µm e com lamelas variando de cinco a vinte dependendo da concentração de lipídeos e o método de preparação de lipossomas. Em geral, incluem hidratação de um filme lipídico seguida de sonicação ou extrusão para redução do tamanho das vesículas¹².

Os lipossomas apresentam aplicação em diversas áreas da ciência e tecnologia. No entanto, algumas de suas mais importantes utilidades estão nas áreas da farmacologia, medicina e biotecnologia, onde servem de veículo para regular a administração de medicamentos encapsulados, material genético, proteínas e outras moléculas. Vários resultados foram alcançados com os estudos realizados, sobretudo nos experimentos de manipulação molecular de carreadores e na pesquisa de suas interações com as drogas encapsuladas¹³.

Nesse contexto, este artigo visa demonstrar o uso de lipossomas no tratamento de doenças negligenciadas como uma alternativa promissora através de prospecção científica e tecnológica, com enfoque na leishmaniose visceral, malária, esquistossomose e doença de Chagas.

MÉTODOS

A metodologia de pesquisa empregada para prospecção científica e tecnológica sobre o uso de lipossomas na terapia de doenças negligenciadas foi realizada até o ano de 2015. Primeiramente, foram definidos os sites de busca *Science Direct*, *PubMed* e *Scielo* para prospecção científica e as bases de dados para prospecção tecnológica que envolveu bases internacionais, EPO (*European Property Organization*), WIPO (*World Intellectual Property Organization*), USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) e a nacional INPI (*Instituto Nacional da Propriedade Industrial*). Em seguida, foram determinadas palavras-chave tanto em português quanto em inglês, para serem utilizadas nos processos de busca.

As palavras-chaves utilizadas na prospecção científica e tecnológica foram: *treatment of visceral leishmaniasis and liposome*, *treatment of malaria and liposome*, *treatment of schistosomiasis and liposome* e *treatment of Chagas disease and liposome* e suas traduções correspondentes em português: tratamento da leishmaniose visceral e lipossoma, tratamento da malária e lipossoma, tratamento da esquistossomose e lipossoma e tratamento da doença de Chagas e lipossoma. A prospecção foi realizada durante os meses de junho a dezembro de 2015.

Dentre os artigos encontrados, aqueles que apresentaram melhor perfil de experimentos relacionados ao tratamento das doenças, mostrando resultados mais promissores, foram selecionados.

RESULTADOS

Os resultados obtidos através da prospecção científica e tecnológica foram organizados nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Além disso, também foram utilizados 4 gráficos para demonstrar a distribuição por décadas, nas diferentes bases de dados obtidos nesta prospecção.

A tabela 1 representa o número de artigos encontrados nos sites de busca *Science Direct*, *PubMed* e *Scielo* em relação as palavras-chaves utilizadas. A malária foi à doença negligenciada que apresentou a maior quantidade de artigos relacionados à terapia utilizando lipossomas, seguida pela leishmaniose, esquistossomose e por último a doença de Chagas. O Science Direct foi o site com maior número de artigos obtidos em relação a todas as palavras-chaves utilizadas.

Tabela 1: Número de artigos pesquisados nos sites de busca Science Direct, PubMed e Scielo envolvendo os diferentes termos utilizados.

Palavras-chaves	Science Direct	PubMed	Scielo
<i>Treatment of visceral leishmaniasis and liposome ou tratamento da leishmaniose e lipossoma</i>	452	368	4
<i>Treatment of malaria and liposome ou tratamento da malária e lipossoma</i>	1646	115	0
<i>Treatment of schistosomiasis and liposome ou tratamento da schistossomose e lipossoma</i>	304	20	1
<i>Treatment of Chagas disease and liposome ou tratamento da doença de Chagas e lipossoma</i>	300	8	0
TOTAL	2702	511	5

Os gráficos, 1, 2 e 3 mostram que os primeiros artigos publicados nessas bases de dados são de 1977 e a partir desse ano houve um aumento crescente no número de publicações sobre essas doenças negligenciadas, tendo um ápice por volta dos anos 2000. Atualmente, a perspectiva para essa década é a de que esse número de publicações se mantenha ou aumente considerando-se que o gráfico 3 representa apenas metade da década.

Gráfico 1: Número de artigos encontrados no site de busca Science Direct por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados.

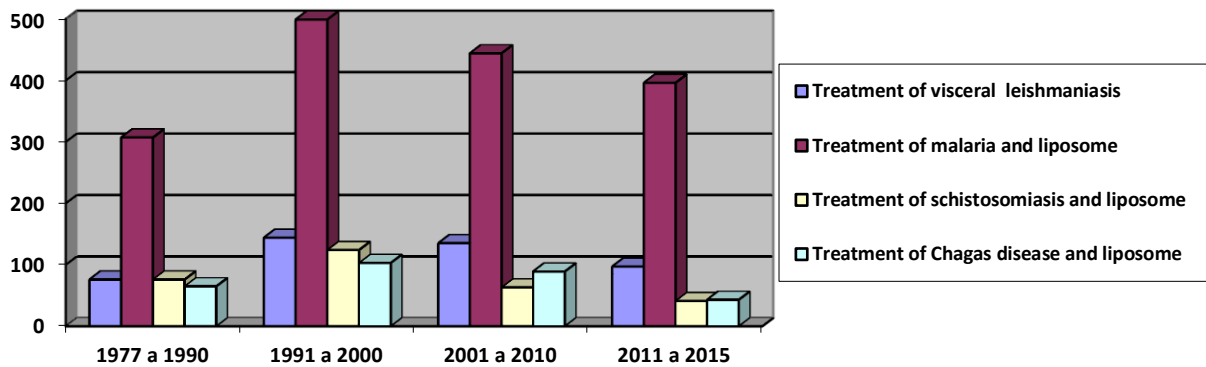


Gráfico 2: Número de artigos encontrados no site de busca PubMed por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados.

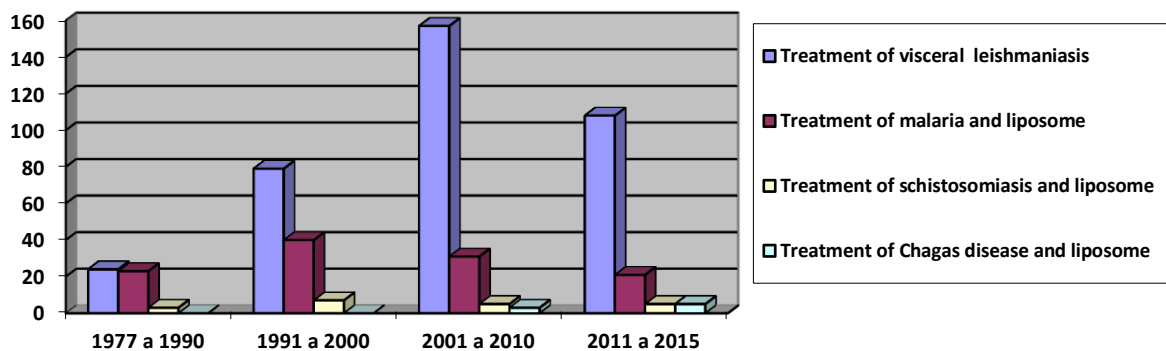
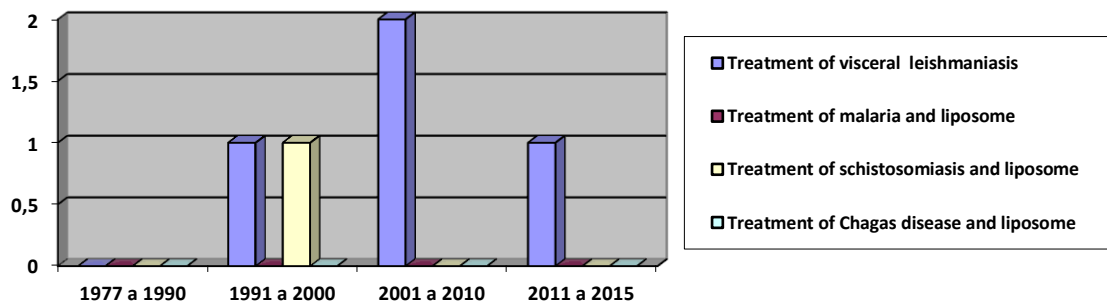


Gráfico 3: Número de artigos encontrados no site de busca Scielo por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados.



A tabela 2 representa o número de depósitos de patentes nas bases do INPI, USPTO, WIPO e EPO envolvendo os diferentes termos utilizados.

O banco de dados internacional USPTO foi o que apresentou o maior número de depósito de patentes relacionados à utilização de lipossomas na leishmaniose (36), malária (59), esquistossomose (1) e doença de chagas (1), totalizando 97 patentes. Essas patentes abordam métodos de prevenção através de vacinas, diagnósticos e tratamentos para essas doenças negligenciadas com lipossomas nas suas formulações.

No banco de dados do INPI foi obtida apenas uma patente e no WIPO duas. Todas essas relacionadas ao desenvolvimento de uma vacina para malária utilizando lipossomas na formulação. Não foi obtida nenhuma patente nessas bases de dados relacionadas a outras doenças negligenciadas pesquisadas. Além disso, nenhuma patente foi obtida nessa prospecção tecnológica nas bases do EPO.

Tabela 2: Número de depósitos de patentes pesquisados nas bases do INPI, EPO, USPTO e WIPO envolvendo os diferentes termos utilizados.

Palavras-chaves	INPI	USPTO	WIPO	EPO
<i>Leishmaniasis and liposome ou leishmaniose e lipossoma</i>	0	36	0	0
<i>Malaria and liposome ou malária e lipossoma</i>	1	59	2	0
<i>Schistosomiasis and liposome ou esquistossomose e lipossoma</i>	0	1	0	0
<i>Chagas disease and liposome ou doença de Chagas e lipossoma</i>	0	1	0	0
TOTAL	1	97	2	0

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; **EPO:** *European Property Organization*; **USPTO:** *United States Patent and Trademark Office* e **WIPO:** *World Intellectual Property Organization*.

As patentes relacionadas à utilização de lipossomas na prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças negligenciadas são em sua maioria recentes compreendendo os últimos cinco anos, como observado no gráfico 4. Os lipossomas apresentam-se como uma alternativa bastante promissora para o combate eficaz dessas patologias, porém ainda são necessários novos estudos sobre essa tecnologia.

Gráfico 4: Número de depósitos de patentes pesquisados nas bases do USPTO por décadas, envolvendo os diferentes termos utilizados.



Portanto, são promissores os resultados da utilização de lipossomas no tratamento da leishmaniose, malária, esquistossomose e doença de Chagas e conseqüentemente crescente o número de depósitos de patentes com essa tecnologia.

DISCUSSÃO

Lipossomas no tratamento da leishmaniose visceral

A leishmaniose é uma doença parasitária grave, com grande variedade de manifestações clínicas, que vão desde lesões cutâneas ulcerativas a forma visceral, que é a forma mais grave de leishmaniose e está associada à infecção generalizada e cuja letalidade pode chegar a 10% quando não tratada precocemente e de forma adequada¹⁴. Até 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e família Tripanosomatidae são patogênicas para o ser humano, sendo transmitidos por mais de 90 espécies de flebotomíneos e afetam cerca de 12 milhões de pessoas em mais de 98 países no mundo.^{15; 16; 17}

As drogas de primeira escolha para o tratamento dessa parasitose são os antimoniais pentavalentes, no Brasil o antimoniato de meglumina (Glucantime®). Injeções sistêmicas ou intralesionais desses antimoniais geralmente provoca efeitos colaterais como febre, mialgia, artralgia, hepatotoxicidade, fraqueza, náuseas e vômitos. Além disso, uma baixa adesão é induzida devido à necessidade de múltiplas injeções dolorosas por semanas, que limita a utilidade desses fármacos.^{18;19;20.}

A eficácia dos antimoniatos depende das espécies de *Leishmania*, região geográfica, presença de cepas resistentes, e esquema terapêutico.²⁰ Quando a *Leishmania* desenvolve resistência realiza-se a terapia com anfotericina-B, um antibiótico macrolídeo também usado como antifúngico, que devido a sua elevada toxicidade é comercializado na forma de preparações lipossomais. Esse medicamento alternativo desenvolvido é destaque na quimioterapia de leishmaniose, aprovado para uso pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1997, é o AmBisome®, uma preparação liofilizada de pequenas vesículas unilamelares constituídos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), colesterol, dipalmitoil fosfatidil glicerol (DMPG). Além de uma baixa toxicidade renal esse sistema apresentou grande eficácia terapêutica por ser bem absorvido pelo sistema fagocítico mononuclear, onde residem leishmanias.²¹

Nos anos 1977 e 1978, um grande experimento realizado em camundongos, hamsters e cães por pesquisadores americanos e ingleses constatou que os fármacos antimoniais encapsuladas em lipossomas eram de 200 a 700 vezes mais eficazes que o fármaco livre no tratamento da leishmaniose visceral²². O referido aumento é atribuído às propriedades do lipossoma e sua tendência natural de se fixarem em macrófagos do fígado, baço e medula óssea, principais sítios de infecção do parasita²³.

Na época, dois diferentes métodos de encapsulação do fármaco foram propostos. Um era baseado na formação de vesículas multilamelares pela hidratação de um filme lipídico com uma solução do antimoniato de meglumina. O outro, denominado procedimento de evaporação de fase reversa, era fundamentado na produção de uma emulsão água-óleo usando uma solução do fármaco como fase aquosa seguido da evaporação do solvente orgânico, o que resulta em uma mudança de fase e na formação das vesículas de suspensão²⁴.

A principal vantagem do segundo método em relação ao primeiro é que ele atinge alta eficiência de encapsulação, sendo necessária uma menor quantidade de lipídeos para encapsular a mesma quantidade do fármaco antimonial. Isso torna o tratamento mais seguro e econômico. A desvantagem é a ocorrência do vazamento do fármaco quando as preparações são armazenadas, gerando grande instabilidade. Esse problema foi solucionado pela liofilização de lipossomas contendo antimoniato de meglumina em lipossomas que são reconstituídos no momento do uso. Tais vesículas foram testadas em hamsters, modelo animal que melhor mimetiza a leishmaniose visceral em humanos, obtendo êxito na esterilização do parasita²⁵.

Posteriormente, a toxicidade e ação leishmanicida de preparações lipossomais de antimoniato de meglumina foram testados em cães infectados naturalmente com *L. chagasi*. Observou-se uma significativa redução da carga parasitária na medula óssea, linfonodos, fígado e baço dos animais tratados com os lipossomas contendo o fármaco (Grupo 1) em relação aos grupos que foram tratados com lipossomas vazios (Grupo 2) e com salina isotônica (Grupo 3). Além disso, detectou-se uma diminuição da capacidade de flebotômíneos infectar os cães que receberam a formulação lipossomal do fármaco, fato evidenciado pela redução da eficiência infectiva de espécimes de *Lutzomyia longipalpis* quando alimentados com animais do Grupo 1 em comparação com as espécimes alimentadas com cães dos Grupos 2 e 3²⁵.

Os resultados obtidos no estudo são de grande relevância, pois esse é o primeiro relato de supressão parasitária tecidual e redução da capacidade infectiva de flebotômíneos em animais naturalmente infectados. Os tratamentos atualmente utilizados em cães provocam apenas uma melhora no estado clínico, não levando a eliminação da *Leishmania*, o que torna o animal hospedeiro do parasita, devendo ser sacrificado²⁶. Desse modo, a pesquisa gera uma perspectiva de desenvolvimento de uma terapia realmente efetiva para leishmaniose visceral canina.

Um importante aspecto a ser considerado é o custo do tratamento com a droga lipossomal quando comparado com a terapia convencional. Considerando-se que o

antimoniato de meglumina nanoencapsulado é pelo menos 200 vezes mais efetivo que o fármaco livre calcula-se que nessa terapia o paciente deverá receber 2 mg/kg uma vez por semana durante um mês, dose consideravelmente menor que a atualmente usada, 20 mg/kg por dia durante 28 dias. No tratamento com lipossomas o custo se resume praticamente ao custo dos lipídeos usados na preparação. Assumindo que o preço do lipídeo é US\$50 por grama e que o preço do antimoniato de meglumina é de US\$2 por 5 mL, o tratamento com a droga encapsulada é estimado em US\$120, portanto, US\$80 mais barato que a terapia convencional, orçada em US\$200.

Testes realizados com outros compostos ativos contra a leishmaniose como o oryzalin (ORZ) uma dinitroanilina, demonstrou-se menos tóxico quando incorporado em lipossomas, pois, teve uma redução significativa da hemólise de células vermelhas do sangue e da atividade citotóxica em células THP-1 quando comparado com a ORZ livre. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram a eficácia da formulação lipossomal contra infecção intracelular por leishmaniose e carreamento passivo de ORZ para o principal órgão de infecções da *Leishmania* (fígado e baço). Estes resultados indicam que os lipossomas são importantes candidatos para modulação da terapêutica de agentes contra leishmaniose²⁷.

Lipossomas no tratamento da malária

A malária é uma das principais doenças parasitárias que acometem as regiões tropicais e subtropicais do planeta, afetando cerca de 207 milhões de pessoas em todo o mundo e ocasionando aproximadamente 627 mil óbitos por ano²⁵. A forma humana, causada por quatro espécies diferentes de protozoários (*Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. falciparum*), é transmitida pela picada das fêmeas do inseto do gênero *Anopheles*²⁶. O *P. falciparum* causa a forma mais grave da doença e é responsável pelo maior número de mortes³⁰.

A escolha da terapia adequada deve ser precedida de informações sobre a gravidade da doença, espécie do plasmódio, idade do paciente, histórico de exposição anterior à infecção e suscetibilidade/resistência dos parasitas aos antimaláricos tradicionalmente usados, no entanto a quimioterapia ainda apresenta fundamental importância na redução da morbidade e mortalidade vinculada a malária. Entre os antimaláricos mais usados estão: as quinolinas (quinina, cloroquina, primaquina, mefloquina, amodiaquina, halofantrina), diclorobenzilidina (lumefantrina), biguanidas (proguanil, clorproguanil), diaminopiridinas (pirimetamina), sulfonas (dapsona), hidroxinaftoquinonas (atovaquona) e lactonas sesquiterpênicas (derivados da artemisinina, artesunado e arteméter)³¹.

Recentemente, vários estudos vêm sendo realizados com carreadores de escala nanométrica devido a suas propriedades de aumentar a biodisponibilidade e diminuir a toxicidade dos medicamentos. Nesse sentido, vários sistemas de liberação controlada tem mostrado grande eficiência em testes com modelos animais para o tratamento e a prevenção da malária³².

O antimalárico β -artemeter, um derivado semi-sintético da artemisinina, efetivo contra os estágios eritrocíticos de *P. falciparum* resistente a cloroquina e a mefloquina, foi encapsulado em lipossomas produzidos com fosfatidilcolina de ovo e colesterol. A preparação foi analisada quanto à capacidade de encapsulação, estabilidade química, possível vazamento, atividade *in vitro* e eficiência terapêutica contra a infecção de *P. chabaudi*. Uma eficiência de encapsulação próxima a 100% e uma grande estabilidade foram atingidas. As formulações foram testadas em camundongos infectados com uma cepa virulenta de *P. chabaudi* e 100% de cura foi alcançada³³.

A primaquina, medicamento usado no tratamento e na profilaxia da malária que atua em nível de fígado destruindo o plasmódio, foi encapsulada em diversos sistemas de liberação controlada de fármacos, a exemplo de lipossomas, microesferas e nanopartículas. Em testes realizados com a primaquina encapsulada em lipossomas foi observada uma redução da toxicidade, fenômeno gerado por uma mudança na distribuição da droga, que passou a se localizar mais no fígado, sítio de maior concentração do parasita, e menos em outros órgãos³⁰.

É sabido que os principais inconvenientes da terapia da malária são o desenvolvimento de múltipla resistência aos medicamentos e a ausência de alvos específicos para a eliminação dos parasitas intracelulares, que ocasiona a administração de altas doses de fármacos e conseqüente elevada toxicidade. Os nanossistemas podem solucionar esses problemas aumentando a especificidade dos alvos dos fármacos, além de melhorar a biodisponibilidade e toxicidade dos princípios ativos tradicionalmente usados³².

Lipossomas no tratamento de esquistossomose

A esquistossomose constitui um sério problema de saúde pública, precedida entre as patologias parasitárias somente pela malária, afetando 230 milhões de pessoas no mundo³⁴. A doença é causada por trematódeos sanguíneos digenéticos, da família Schistosomatidae e a espécie *Schistosoma mansoni* é a única encontrada no Brasil³⁵. A progressão da parasitose e da sua sintomatologia está relacionada a fatores como carga parasitária e estado nutricional do paciente, estando quase sempre ligada a desnutrição³⁶.

O tratamento quimioterápico da esquistossomose feito com oxamniquina e praziquantel é recomendado para a maioria dos casos, sendo normalmente realizado em dose única por via oral. A terapia é eficaz em 80% dos casos ocorridos em adultos e em 70% dos casos em crianças. Normalmente o fármaco de escolha é o praziquantel por apresentar menor custo³⁷.

Esses fármacos possuem inúmeras reações adversas. Os efeitos colaterais mais observados no tratamento com praziquantel são náuseas, dores abdominais, tonturas, cefaléias, sonolência e exantema urticariforme. A oxamniquina, fármaco de segunda escolha, apresenta efeitos sobre o sistema nervoso central, a exemplo de alucinações, tonturas, excitação e até mesmo mudança de comportamento. Essas reações somadas ao risco de desenvolvimento de resistência mostram a necessidade de desenvolvimento de novas terapias contra a esquistossomose³⁸.

As falhas no tratamento em massa da esquistossomose foram atribuídas ao fato da terapia não ser suficientemente duradoura. Esse efeito é ocasionado pela baixa biodisponibilidade dos compostos utilizados que apresentam pouca hidrossolubilidade e metabolismo rápido.

Lipossomas compostos de fosfatidilcolina com praziquantel foram produzidos para melhorar o tratamento da esquistossomose. Essas preparações foram testadas em camundongos após 14 dias de infecção e causaram uma diminuição na quantidade de ovos e parasitas quando comparados com os animais tratados com o fármaco livre, fato que indicou que os nanossistemas podem ser utilizados para melhorar a atividade do praziquantel³⁹.

Também foi estudada a habilidade dos lipossomas melhorarem a eficácia do tártaro emético contra infecções estabelecidas de *S. mansoni*. No experimento realizado em camundongos, o tártaro emético foi usado como modelo de droga esquistossomicida e tanto lipossomas convencionais como lipossomas de longa circulação foram avaliados. O teste mostrou que os lipossomas de longa circulação são os mais adequados para o tratamento porque reduzem a toxicidade aguda do tártaro emético e promovem entrega efetiva do fármaco durante os últimos estágios de infecção de *S. mansoni*⁴⁰.

Dessa forma, o efeito benéfico dos lipossomas no tratamento da esquistossomose foi atribuído às suas propriedades de liberação prolongada, gerando um incremento da biodisponibilidade, e de direcionamento para o sítio de infecção do parasita (fígado), o que ocasionou uma maior interação do fármaco como *S. mansoni*⁴¹.

Lipossomas no tratamento da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, atinge 17 países na América Latina, sendo encontrada predominantemente na Argentina, Chile, Venezuela e Brasil³⁹. Cerca de 10 a 12 milhões de pessoas são afetadas⁴³. É causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, transmitido por insetos vetores da subfamília Triatominae⁴⁴. Ocasiona várias patologias com uma vasta gama de sintomas, acometendo diversos órgãos principalmente o coração, baço, fígado, intestino e esôfago⁴⁵.

Os fármacos historicamente utilizados na terapia da doença de Chagas são o nifurtimox e o benznidazol. O primeiro atua contra as formas sanguíneas e parcialmente contra as formas teciduais, apresentando as seguintes reações adversas: anorexia, emagrecimento, náuseas, vômitos, alergia cutânea, parestesias irreversíveis e polineuropatia. Devido a sua elevada toxicidade, foi recentemente retirado do mercado, deixando o benznidazol como o único fármaco disponível para o tratamento⁴⁶.

O benznidazol age na fase aguda da patologia, sendo ineficaz durante a fase crônica, estágio em que se encontra a maioria dos portadores da doença. Apresenta efeitos colaterais graves como: dermatite por hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica⁴⁴. Dessa forma, evidencia-se a grande necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos que atuem em ambas as fases da doença de Chagas, apresentando maior eficácia e menos efeitos colaterais.

A utilidade dos lipossomas na formulação de agentes efetivos contra a doença de Chagas vem sendo muito pouco estudada em comparação a outras doenças negligenciadas, como a leishmaniose. Isso provavelmente é devido ao local de disseminação dos parasitas, que se alojam em células que não estão inseridas no sistema fagocítico mononuclear (SFM). Assim, eles se tornam um alvo difícil para os lipossomas, uma vez que esses nanossistemas se concentram no SFM⁴⁸.

Beznidazol encapsulado em vesículas multilamelares injetados pelas vias intramuscular, subcutânea e endovenosa em camundongos mostrou menor interação com componentes sanguíneos, maior eficácia de ação e menos efeitos colaterais que a droga na forma livre⁴⁹. Tal resultado indica que preparações lipossomais do fármaco constituem um possível alvo para o desenvolvimento de uma terapia menos tóxica e mais efetiva.

CONCLUSÃO

Doenças negligenciadas como a leishmaniose visceral, malária, esquistossomose e doença de Chagas, que atingem milhões de pessoas em todo o mundo, apresentam tratamento ineficiente e tóxico. Nesse sentido, a utilização de nanosistemas de liberação controlada de fármacos se mostra útil no aperfeiçoamento das terapias já existentes. A encapsulação de fármacos em lipossomas mostrou aumentar a biodisponibilidade e diminuir sua toxicidade, além de possibilitar direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos. A tendência natural dos lipossomas serem capturados pelo sistema fagocítico mononuclear, potencializa o efeito dos fármacos encapsulados no tratamento dessas patologias. Assim, o uso de lipossomas constitui uma alternativa viável para o tratamento das doenças negligenciadas.

REFERÊNCIAS

1. Quansah E, Esther S, Thomas KK. Disregard of neurological impairments associated with neglected tropical diseases in Africa. *eNeurologicalSci*. 2016; 3: 11-14.
2. Lindoso JAL, Lindoso AABP. Neglected Tropical Diseases In Brazil. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo*. 2009; 51(5): 247-253.
3. Santos F, et al. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o controle das doenças negligenciadas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2013; 33(3): 37-47.
4. Knudsen KB, Northeved H, Kumar P, Permin A, Gjetting T, Andresen TL, et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2015; 11: 467–477.
5. Wolfram J, Suri K, Yang Y, Shen J, Celia C, Fresta M, et al. Shrinkage of pegylated and non-pegylated liposomes in serum. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*. 2014; 114: 294–300.
6. Cui M, Wu W, Hovgaard L, Lu Y, Chen D, Qi J. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 489: 277–284.
7. Niu M, Tan Y, Guan P, Hovgaard L, Lu Y, Qi J, et al. Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: A mechanistic study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 460: 119–130.
8. Gabizon A, Shmeeda H, Horowitz AT, Zalipsky S. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004; 56: 1177–1192.
9. Chattopadhyay S. Aerosol generation using nanometer liposome suspensions for pulmonary drug delivery applications. *Journal of Liposome Research*. 2013; 23: 255–267.
10. Dai YK, Zhou R, Liu L, Lu Y, Qi JP, Wu W. Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8: 1921–1933.
11. Sem K, Mandal M. Second generation liposomal cancer therapeutics: transition from laboratory to clinic. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 448: 28–43.
12. Gharib R, Greige-Gerges H, Fourmentin S, Charcosset C, Auezova L. Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers*. 2015; 129: 175–186.
13. Machado LC, Gnoatto AS, Klüppel MLW. Lipossomas aplicados em farmacologia: uma revisão da literatura. *Estudos de Biologia*. 2007; 29(67): 215-224.
14. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, et al. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in ethiopia. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6(6): 1–10.
15. Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DCW, Solomon AW. Neglected tropical diseases. *British Medical Bulletin*; 2010; 93: 179–200.

16. Shukla AK, Patra S, Dubey VK. Deciphering molecular mechanism underlying antileishmanial activity of *Nyctanthes arbortristis*, an Indian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 134: 996–998.
17. WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso: 29 maio. 2016.
18. Kashani MN, Firooz A, Eskandari SE, Ghoorchi MH, Khamesipour A, Khatami A, et al. Evaluation of meglumine antimoniate effects on liver, kidney and pancreas function tests in patients with cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Dermatology*. 2007; 17: 513–515.
19. Mussi SV, Fernandes AP, Ferreira LA. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *Parasitology Research*. 2007; 100: 1221–1226.
20. Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 2009; 14: 2317–2336.
21. Menezes JB, Silva TA, Grillo LAM, Dornelas CB. Therapeutic Arsenal against Leishmaniasis: A Review. *International Journal of tropical disease & health*, 2015; 5(2): 101-122.
22. Demicheli C, Frézard F. Novas embalagens para medicamentos a base de antimônio usados no tratamento de Leishmaniose e Esquistossomose. *Química Nova na escola*. 2005; (6).
23. Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OGF, Melo MN, Michalick MSM. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 140-147.
24. Frézard F, Michalick MSM, Soares CF, Demicheli C. Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000; 33 (7): 841-846.
25. Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, et al. Reduced tissue parasitic load infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52(7): 2564-2572.
26. Schettini DA, Costa Val AP, Souza LF, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, et al. Distribution of liposome-encapsulated antimony in dogs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2003; 36 (2): 269-272.
27. Lopes R, Eleutério CV, Gonçalves LMD, Cruz MEM, Almeida AJ. Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 45: 442–450.
28. Marques J, Moles E, Urbán P, Prohens R, Busquets MA, Sevrin C, et al. Application of heparin as a dual agent with antimalarial and liposome targeting activities toward Plasmodium-infected red blood cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014. 10: 1719–1728.

29. Vaughan AM, Aly ASI, Kappe SHI. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell Host & Microbe*. 2008; 4(3): 209-218.
30. Dierling AM, Cui Z. Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 303(2): 143-152.
31. Pimentel LF, Júnior, Agenor TJ, Mosqueira VCF, Magalhães NSS. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43(4): 504-514.
32. Santos-Magalhães NS, Mosqueira VCF. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62(4-5): 560-575.
33. Chimanuka B, Gabriëls M, Detaevernier R, Plaizier-Vercammen JA. Preparation of β -artemether liposomes, their HPLC-UV evaluation and relevance for clearing recrudescent parasitemia in *Plasmodium chabaudi* malaria-infected mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002; 28(1): 13-22.
34. Souza ALR, Andreani T, Oliveira RN, KIILL CP, Santos FK, Allegretti SM, et al. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of the schistosomiasis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 463: 31-37.
35. Gargione C, Silva RM, Thamé CM, Quadros CMS, Kanamura HY. Utilização de método sorológico como ferramenta diagnóstica para implementação da vigilância e controle da esquistossomose no Município de Holambra, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 2008; 24 (2): 373-379.
36. Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Machado SS, Ferreira HS. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41(4): 390-393.
37. Pordeus LC, Aguiar LR, Quinino LRM, Barbosa CS. The occurrence of acute and chronic forms of the schistosomiasis mansoni in Brazil from 1997 to 2006: a revision of literature. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. Brasília. 2008; 17(3): 163-175.
38. Almeida AE, De Souza ALR, Allegretti SM, Frezza TF, Pinto MC, Ferreira AG. Síntese e atividade biológica do derivado 6-formil-oxamniquina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008; 44(4): 749-754.
39. Mourão SC, Costa PI, Salgado HRN, Gremião MP. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 295(2): 157-162.
40. Melo AL, Silvia-Barcellos NM, Demicheli C, Frézard F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 255(2): 227-230.
41. Frézard F, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*. 2005; 28(3): 511-518.

42. Souza AI, Paulino-Junior D, Sousa MG, Camacho AA. Aspectos clínico-laboratoriais da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em cães de Mato Grosso do Sul. *Ciência Rural*. 2008; 38(5) 1351-1356.
43. Gomez-Hernandez C, Rezende-Oliveira K, Zárate AC, Zárate EC, Trujillo-Contreras F, Ramirez LE. Prevalência de triatomíneos (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuição na região Ciénega do Estado de Jalisco, México. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41(3) 257-262.
44. Souza AI, Oliveira TMFS, Machado RZ, Camacho AA. Soroprevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em cães de uma área rural do Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009; 29(2): 150-152.
45. Lopes ESG, Prado JJC. A influência da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no coração em ratos *Wistar* machos submetidos ao processo de adrenalectomia. *Biodiversidade*. 2007; 6(1) 62-76.
46. Neves DP. *Parasitologia humana*. 11ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
47. Oliveira RB, Zani CL, Ferreira RS, Leite RS, Alves TMA, Da Silva THA, et al. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de arilfuranos como inibidores da enzima tripanotona redutase. *Química Nova*. 2008; 31(2): 261-267.
48. Date AA, Joshi MD, Patravale VB. Parasitic diseases : Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59: 505–521.
49. Morilla MJ, Montanari JA, Prieto MJ, Lopez MO, Petray PB, Romero EL. Intravenous liposomal benznidazole as trypanocidal agent: increasing drug delivery to liver is not enough. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 278(2): 311-318.

CAPÍTULO II

OBTENÇÃO DE CARREADOR LIPOSSOMAL CONTENDO OLEO ESSENCIAL DE
Lippia sidoides Cham.

OBTENÇÃO DE CARREADOR LIPOSSOMAL CONTENDO OLEO ESSENCIAL DE

Lippia sidoides Cham.

MACÊDO, M. A.¹; RAMALHO, T.C.²; LIMA NETO, J. S.³; SOUSA, E. S.³; LIMA, S. G.³;
MEDEIROS, M.G.F.¹; CARVALHO, F. A. A.⁴; ROLIM, H. M. L.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, Teresina – PI, Brasil

²Graduando em Farmácia, UFPI, Teresina – PI, Brasil

³Laboratório de Geoquímica Orgânica, UFPI, Teresina – PI, Brasil

⁴Programa de Pós-graduação em Farmacologia, UFPI, Teresina – PI, Brasil

RESUMO

Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae) é uma planta medicinal nativa do nordeste brasileiro e popularmente conhecida como “alecrim-pimenta”. Seu óleo essencial é rico em timol e possui diversas propriedades biológicas. Contudo, limitações consideráveis são associadas aos óleos essenciais (OEs) por serem misturas de substâncias voláteis e lipofílicas susceptíveis a degradação física e química, além de baixa solubilidade em água. Visando melhorar essas limitações, este estudo teve como objetivo preparar e caracterizar uma preparação lipossomal contendo óleo essencial de *L. sidoides* Cham. Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico e mostraram diâmetro médio das partículas de 1.230nm, índice de polidispersão (IPD) de 0,152; potencial zeta de +37,1; pH 7,79; elevado teor (94,5%) e eficiência de encapsulação (100%) caracterizado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Assim, as vesículas lipossomais apresentaram características físico-químicas adequadas para iniciar testes biológicos, mostrando ainda que a técnica usada foi eficiente com alto teor de incorporação do óleo essencial. Os resultados deste estudo se apresentam como uma alternativa para o desenvolvimento de novas formulações vesiculares a partir de óleos essenciais.

Palavras-chave: *Lippia sidoides*, Óleo essencial, Timol, Lipossomas.

5.1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são uma mistura de compostos voláteis odoríferos, obtidos de diferentes partes de plantas aromáticas. Devido a sua composição química complexa, os OEs possuem diversas e relevantes atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, praguicidas, repelentes entre outras que os tornam de grande interesse para a área farmacêutica, cosméticos e de alimentos. (EL ASBAHANI et al., 2015)

A planta *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) é uma espécie nativa do nordeste brasileiro e popularmente conhecida como “alecrim-pimenta”. Vários estudos têm demonstrado que o OE de *L. sidoides* Cham possui diversas propriedades biológicas como leishmanicida (FARIAS-JUNIOR et al., 2012; MEDEIROS et al., 2011), antifúngica (FARIAS et al., 2012), antihelmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007), antimalárica (MOTA et al., 2012), moluscicida (MATOS, F. J. A., OLIVEIRA, F, 1998) e inseticida (LIMA et al., 2013). A maioria das atividades biológicas desse OE são atribuídas as altas concentrações do seu composto majoritário Timol (FERNANDES et al., 2012).

Contudo, limitações consideráveis são associadas aos OEs por serem misturas de substâncias voláteis e lipofílicas susceptíveis a degradação física (luz, temperatura, pH, etc.) e agentes químicos (ar, humidade, etc) (PINTO et al., 2016). Para proteger os óleos essenciais dessas limitações físico-químicas, aumentar sua solubilidade e preservar as suas propriedades biológicas, eles têm sido encapsulados em sistemas nanométricos de liberação (SEBAALY et al., 2015). Por essas razões, o OE de *L. sidoides* Cham foi encapsulado em nanocapsulas, obtendo-se uma suspensão estável composta por ingredientes não tóxicos e biodegradáveis que pode ser utilizada para fins agrícolas e farmacêuticos (PINTO et al., 2016).

A nanotecnologia melhora também a farmacocinética do princípio ativo, aumentando sua especificidade e eficácia terapêutica. Vários nanovetores estão sendo estudados e já são comercializados como nanotubos, lipossomas, nanocapsulas, dendrímeros, nanoesferas e micelas poliméricas.(GALVEZ, P.; RUIZ, A.; CLARES, B, 2011). Os lipossomas são vesículas esféricas, formadas por uma bicamada fosfolipídica anfifílica. Assim, podem carrear tanto fármacos hidrofílicos no seu centro aquoso como hidrofóbicos entre as bicamadas lipídicas. Além disso, os lipossomas são biodegradáveis, não imunogênicos e podem ser produzidos em larga escala. (RODRIGUES et al., 2016).

Valendo-se dessas características dos lipossomas, o objetivo desse estudo foi preparar e caracterizar uma formulação lipossomal contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

5.2 MATERIAIS

Fosfatidilcolina de soja (PC de soja) obtido da Lipoid S100; Colesterol, estearilamina (octadecilamina) e Timol (Sigma), Clorofórmio e metanol (Merck®). Todos os reagentes são de grau analítico. Cromatógrafo GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da Shimadzu.

5.3 METODOS

5.3.1 Coleta das amostras

As folhas e flores da *Lippia sidoides* Cham foram coletadas manualmente durante o mês de setembro às 8 horas no horto do Núcleo de Plantas Aromáticas e Medicinais (NUPLAN)-UFPI, em Teresina, Brasil. Uma exsicata da espécie foi depositada no Graziela Barroso Herbarium na UFPI, identificado como TEPB18743.

5.3.2 Obtenção do óleo essencial

As folhas e flores recém-coletadas (200g) foram submetidas ao processo de extração por hidrodestilação, em aparelho extrator tipo Clevenger modificado, para obtenção do óleo (MEDEIROS et al., 2011). O procedimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí. Ao término do processo extrativo, foi calculado o rendimento.

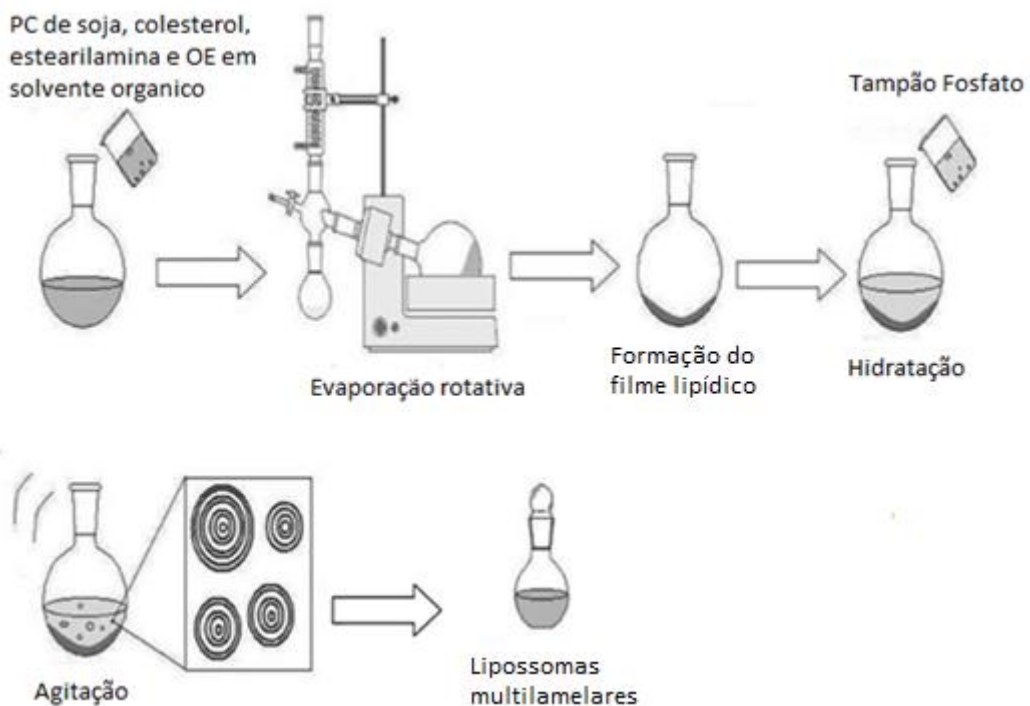
5.3.3 Processo de caracterização do óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

Foi utilizado o cromatógrafo GCMS-QP2010 SE, AOC-5000 auto injetor da Shimadzu, seguindo as seguintes condições de análise: injetor 220 °C, fluxo 1,02 mL min⁻¹, temperatura inicial do forno de 60 °C por 0 minuto, depois apresentando uma rampa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 246 °C permanecendo por 10 minutos, razão Split de 1:100, temperatura da interface 240 °C e fonte de 250 °C. Para cromatografia dos componentes foi empregada uma coluna Rtx-5MS, 30 m × 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,10 µm com fase estacionária de 5% difenil e 95% de difenildimetilpolissiloxano e hélio como gás de arraste. Modo de varredura de m/z 47 a 500, ionização por impactos de elétrons, 70 eV. O tempo total de scan para a corrida cromatográfica foi de 72 minutos, incluindo 3 minutos o corte de solvente. Os espectros de massas de cada componente foram comparados com os fornecidos pelo banco de dados do sistema (entradas da biblioteca eletrônica Wiley229) e conferidos visualmente com espectros de massas disponíveis na literatura (ADAMS, R. P, 2007).

5.3.4 Preparação das vesículas lipossomais.

Lipossomas contendo óleo essencial de *L. sidoides* Cham. denominados LIPO-LS foram preparados usando o método da hidratação do filme lipídico descrito por Anselem, 1993 com adaptações (ANCHIÊTA-JUNIOR et al., 2014; MORENO et al., 2014). Foram produzidos lipossomas de 84 μM carregados positivamente a partir de fosfatidilcolina de soja, colesterol, estearilamina e adicionado óleo essencial para formação de LIPO-LS. Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção de 3:1. Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo por um tempo médio de 50 minutos (37 ± 1 ° C, 100 rpm), resultando em um filme lipídico. Este filme foi então, hidratado com 10 mL de solução tampão fosfato pH 7,4 para obtenção de vesículas multilamelares contendo 2 mg ml⁻¹ de OE de *L. sidoides* Cham. (figura 1). Lipossomas sem óleo essencial (lipossomas vazios) foram também preparados para fins comparativos. Todas as amostras foram armazenadas a 4°C.

Figura 1. Método de hidratação do filme lipídico adaptado de EL ASBAHANI et al., 2015.



5.3.5 Caracterização das formulações lipossomais.

Após 24h de preparados, os lipossomas foram avaliados quanto aos aspectos macroscópico, pH, tamanho das partículas (TP), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta. O pH das formulações foram aferidas utilizando um medidor de pH digital a temperatura ambiente. O tamanho de partículas e o índice de polidispersão dos lipossomas foram determinados através da espectroscopia de correlação de fótons. Nestas análises 1mL da suspensão lipossomal foi diluída em 9mL de água ultra-pura e em seguida foi realizada a leitura da solução resultante em aparelho Zetatrak NC-148 (Microtrac).

5.3.6 Construção da curva de calibração

O Timol foi utilizado como marcador para a determinação do teor e taxa de encapsulação do OE em vesículas lipossomais. O método de ADAMS, R. P. (2007) foi utilizado para a caracterização do OE, no entanto, foi modificado para obtenção de um método mais rápido com apenas 10min no CG-MS. Com base neste, foi feita a construção da curva de calibração nas concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Timol (Sigma). A cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa serviu para leitura das amostras.

5.3.7 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de óleo essencial de *L. sidoides* Cham

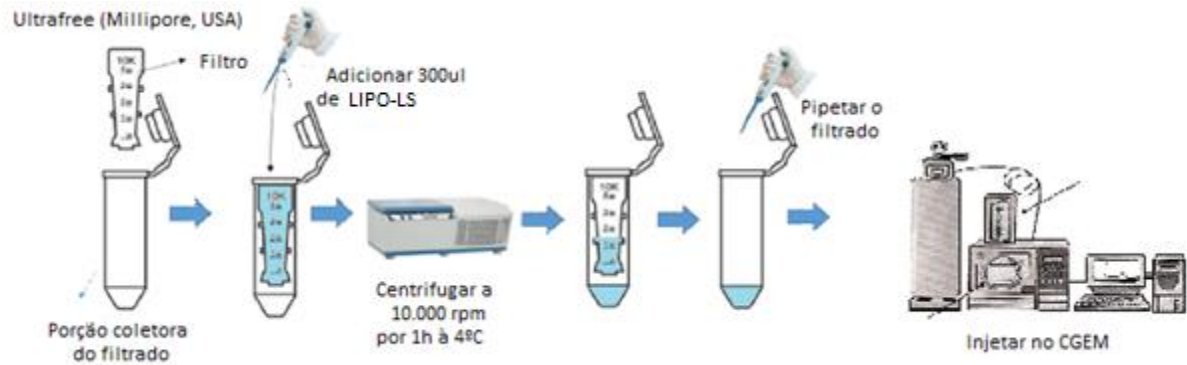
Inicialmente foi preparada uma solução $666,7\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OE de *L. sidoides* em metanol, seguida da injeção de $1\mu\text{L}$ no CG-EM que gerou um sinal cromatográfico com área de 2873209. Esse valor foi utilizado na equação da reta obtida na curva de calibração do timol encontrando-se a concentração equivalente ao timol de $653\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O conteúdo total de princípio ativo na formulação LIPO-LS foi determinado usando CG-EM através do rompimento dos nanossistemas, onde LIPO-LS foi dissolvido usando diclorometano e metanol (1:1:1v/v/v), obtendo-se uma concentração teórica de $666,7\mu\text{g.mL}^{-1}$ de OE de *L. sidoides*. Em seguida, foi injetado $1\mu\text{L}$ no CG-EM gerando um sinal cromatográfico com área equivalente a concentração de timol que permitiu estimar a concentração de OE presente na LIPO-LS.

A eficiência do método de encapsulação foi determinada após a aplicação da técnica de ultrafiltração usando unidades *Ultrafree*[®] (Millipore, USA) para ultracentrifugação à 10.000 rpm durante 1h a temperatura de 4°C, em seguida o conteúdo filtrado foi solubilizado em metanol e injetado no CG-EM (Figura 2). A concentração de timol foi determinada usando

a área do sinal cromatográfico obtido no CG-EM e calculada a partir da equação da curva de calibração obtida. A taxa de OE encapsulado foi calculada em relação ao conteúdo total de OE dosado na formulação, segundo descrito em LIRA et al., 2009.

Figura 2. Método para obtenção da taxa de eficiência de encapsulação.



Fonte: Autor

5.3.8 Análises estatísticas

Todos os resultados foram apresentados com média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de óleos essenciais a partir de plantas é realizada por vários métodos clássicos e inovadores. A hidrodestilação é o processo mais simples para extração de óleos essenciais (EL ASBAHANI, et al., 2015). Foi obtido óleo essencial a partir das folhas e flores de *Lippia sidoides* Cham. tendo ao final um rendimento de 1,2%.

O OE das plantas pode ser constituído por 20-100 metabolitos secundários diferentes pertencentes a uma variedade de classes químicas. Terpenóides e fenilpropanóides são os principais constituintes dos óleos essenciais. Além disso, também estão presentes alguns constituintes aromáticos e alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos e derivados oxigenados destes dois que são os maiores grupos de entidades químicas nos óleos essenciais (RAUT E KARUPPAYIL, 2014).

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham identificou 14 compostos, constituídos principalmente por monoterpenos como o p-cimeno, linalol, timol e o sesquiterpeno cariofileno, sendo o timol o composto majoritário com 83.82% de abundância relativa como observado na figura 3 e tabela 1. Estes resultados são similares aos encontrados por Medeiros, et al., (2011) com 78,37% de abundancia relativa para o Timol ,77,8% por Pinto, et al.,(2016) e 84,9% por Veras et al., (2012).

Figura 3. Cromatograma de Íons Totais (TIC) obtido do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. com atribuições dos picos principais e a estrutura química do Timol.

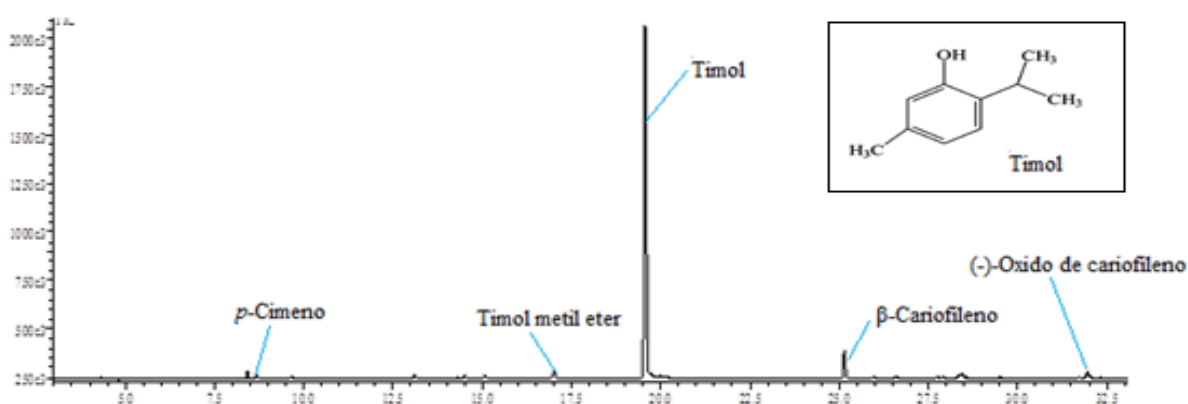


Tabela 1. Composição química, tempo de retenção e abundancia relativa (área %) dos compostos identificados no óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham.

Tempo de Retenção	Composto	Área (%)
8,41	<i>p</i> -Cimeno	1,24
8,67	1,8-Cineol	0,87
9,64	γ -Terpineno	0,44
11,18	Linalol	0,31
13,10	Ipsdienol	0,72
14,50	Terpinen-4-ol	0,62
15,08	α -Terpineol	0,50
17,00	Timol metil éter	1,42
19,56	Timol	83,82
25,14	β -Cariofileno	7,15
26,61	α -Humuleno	0,32
27,76	Germacreno-D	0,36
28,43	Bicyclogermacreno	0,87
31,96	(-)-Oxido de cariofileno	1,36

As bioatividades de um determinado OE são decididas por um ou dois dos seus componentes principais (BAKKALI et al., 2008). Medeiros, et al. (2011) comparou o OE de *Lippia sidoides* Cham. com seu componente majoritário isolado, o monoterpeno Timol contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados mostraram que o óleo essencial foi menos eficaz na inibição de crescimento do parasito (CI₅₀ de 44,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em comparação com o Timol (CI₅₀ de 19,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Porém, em certos casos a atividade global pode não ser atribuída a qualquer um dos principais constituintes, mas sim a presença de uma combinação de moléculas que agem em sinergismo potencializando o efeito. A atividade

inibitória do óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), da mesma ordem (Lamiales) do alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), contra larvas de insetos (larvas de lepidópteros) é uma consequência dos efeitos sinérgicos de vários componentes químicos, enquanto nenhum composto individualmente mostrou atividade (ISMAN et al., 2008).

Apesar das suas numerosas aplicações, os óleos essenciais são muito sensíveis a fatores ambientais, por serem compostos voláteis instáveis e frágeis. Portanto, eles podem ser facilmente degradados (por oxidação, volatilização, aquecimento, luz) se não estiverem protegidos contra fatores externos. Processos de encapsulação de biomoléculas, moléculas ativas, nanocristais e também óleos essenciais têm sido desenvolvidos e descritos na literatura. A encapsulação em lipossomas aumenta a proteção pode ainda, fornecer uma libertação controlada e prolongar sua ação. A combinação de óleos essenciais e nanopartículas estão atraindo uma atenção especial a fim de obter formulações coloidais, principalmente em dermatologia (EL ASBAHANI et al., 2015).

Em nosso estudo, visando estes benefícios o OE de *L. sidoides* Cham foi então incorporado em vesículas pelo método de hidratação do filme lipídico, processo clássico para obtenção de lipossomas. Ao final do processo foi obtida a formulação lipossomal denominada LIPO-LS (figura 4-A) com concentração teórica de 2mg ml^{-1} de OE, apresentando aspecto branco-leitoso e efeito *tyndall* evidente característico de suspensões coloidais uniformes. A formulação sem o óleo essencial (lipossomas vazios) apresentaram aspecto semelhante (figura 4-B). A tabela 2 apresenta dados de caracterização das formulações (pH, potencial zeta, tamanho de partícula e índice de polidispersão).

Figura 4. (A) LIPO-LS e (B) Lipossomas vazios obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico.

A.



B.



Tabela 2. Caracterização após 24h dos LIPO-LS e lipossomas vazios.

Parâmetro	LIPO-LS 2mg mL⁻¹	Lipossomas Vazios
Aspecto macroscópico	Suspensão coloidal uniforme	Suspensão coloidal uniforme
pH	7,79	7,78
IPD	0,152	0,239
TP (nm)	1.230 ± 281,7	907 ± 350,8
Potencial Zeta (mV)	37,1 ± 9,41	32,9 ± 6,04

pH: Potencial de Hidrogênio, IPD: Índice de Polidispersão, TP: Tamanho de Partícula.

A instabilidade dos lipossomas é causada principalmente pelos processos de agregação e fusão das vesículas e pelo extravasamento do fármaco encapsulado (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007). Visando aumentar a estabilidade das partículas, foi adicionada, uma pequena quantidade de estearilamina (octadecilamina), um lipídio que confere carga positiva as vesículas e conseqüentemente produz uma repulsão eletrostática entre as mesmas, o que reduz a agregação e a fusão dos lipossomas melhorando a estabilidade.

O potencial zeta de uma partícula é a carga global que uma partícula adquire em um meio particular. Qualquer partícula em suspensão apresenta essa propriedade física que é comumente utilizada para prever a estabilidade de sistemas coloidais (LAOUINI et al., 2012). Assim, o valor relativamente alto de 37,1 mV obtido na LIPO-LS, seguindo essa característica para a formulação sem OE (tabela 2) é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal. Partículas com um potencial zeta superior a 30 mV (valor absoluto) são consideradas fisicamente estáveis. Entretanto, geralmente suspensões coloidais com potencial zeta próximo a 20 mV (negativo ou positivo), apresentam apenas estabilidade de curto prazo, podendo-se verificar uma rápida agregação de partículas para valores de potencial zeta na ordem dos -5 mV a +5 mV (MISHRA et al., 2009).

Por serem os óleos essenciais compostos muito voláteis, o colesterol foi incorporado às preparações lipossomais a fim de reduzir a permeabilidade e o possível extravasamento do OE dos lipossomas. A literatura mostra que o colesterol reduz a fluidez da membrana, a temperatura maior que a temperatura de transição de fase (T_c), e a deformação da membrana resultando em lipossomas mais estáveis e com pouco extravasamento após administração sistêmica (BATISTA; CARVALHO; SANTOS-MAGALHÃES, 2007). Devido a essas características o colesterol foi incluído, em outro estudo, para melhorar a estabilidade das

bicamadas lipídicas e reduzir o vazamento de antimoniato de meglumina encapsulado (KALAT et al., 2014).

Gráfico 1. Distribuição do potencial zeta da LIPO-LS

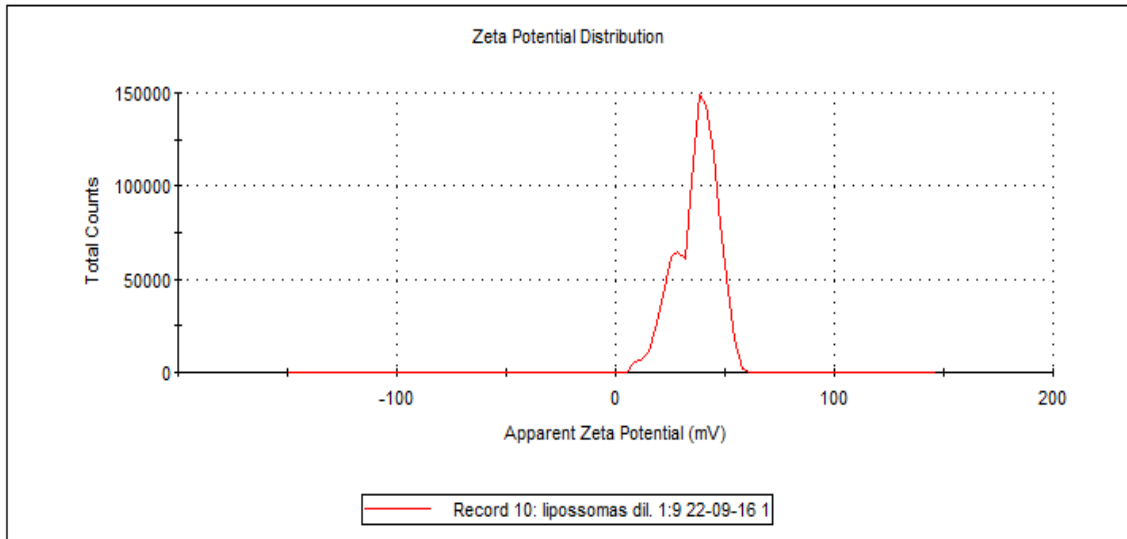
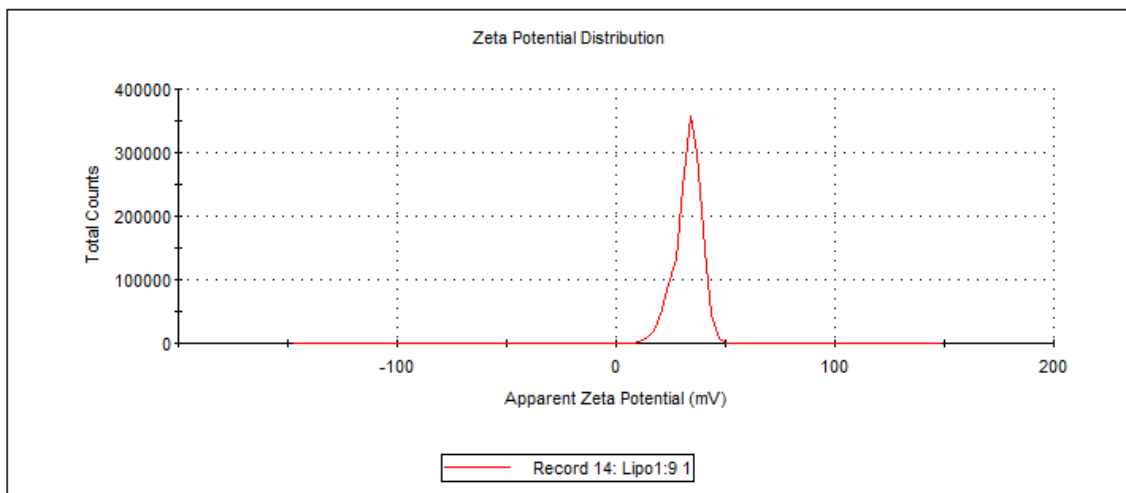


Gráfico 2. Distribuição do potencial zeta dos lipossomas vazios.



O índice de polidispersão (PDI) é utilizado para determinar a distribuição de tamanho das partículas nas amostras. Assim, através da técnica de correlação de fótons foram avaliados o diâmetro médio das nanoestruturas e o índice de polidispersão da LIPO-LS e dos lipossomas vazios, obtendo-se os respectivos valores $1230 \pm 281,7$ nm; 0,152 e $907 \pm 350,8$ nm; 0,239 (Tabela 2). Esses dados mostram que as duas preparações lipossômicas são constituídas por vesículas multilamelares (MLV) caracterizadas por apresentarem tamanho superior a $0,5 \mu\text{m}$. Varona et al.,(2011) utilizando este mesmo método de hidratação do filme

lipídico produziu lipossomas contendo óleo essencial de Lavandin (*Lavandula hybrida*) e obteve vesículas com até 1300 nm de diâmetro.

O tamanho dos lipossomas foi maior na presença do OE que tem como composto majoritário o Timol. Recentemente, a interação de cinco compostos de fenol, incluindo o Timol, com lipossomas de fosfatidilcolina de ovo foi demonstrada por ressonância magnética nuclear (RMN). Os autores relataram a localização destes fenóis na região entre os grupos polares (molécula de colina), o esqueleto de glicerol e os primeiros átomos das cadeias acil. Esta localização reduziu as forças repulsivas entre os grupos de cabeça de fosfolipídios, diminuindo assim a mobilidade das cadeias de hidrocarbonetos (REINER et al., 2013). Dessa forma o Timol pode não difundir a partir da bicamada lipídica para a fase aquosa circundante o que poderia sugerir o aumento do tamanho das vesículas (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos com lipossomas contendo Eugenol (SEBAALY, et al., 2015).

Portanto, estes resultados mostram que o óleo essencial de *L. sidoides* interferiu no tamanho das partículas lipossomais. Os valores de índice de polidispersão (IPD) baixo sugerem uma distribuição homogênea de tamanho de partícula tanto na LIPO-LS (gráfico 3) quanto nos lipossomas vazios (gráfico 4), tendo em vista que formulações com valores de IPD menores ou iguais a 0,3 apresentam-se monodispersas, ou seja, representam uma única população de nanopartículas com distribuição de tamanho normal gaussiana (FALQUEIRO et al., 2012).

Gráfico 3. Distribuição do tamanho de partícula da LIPO-LS

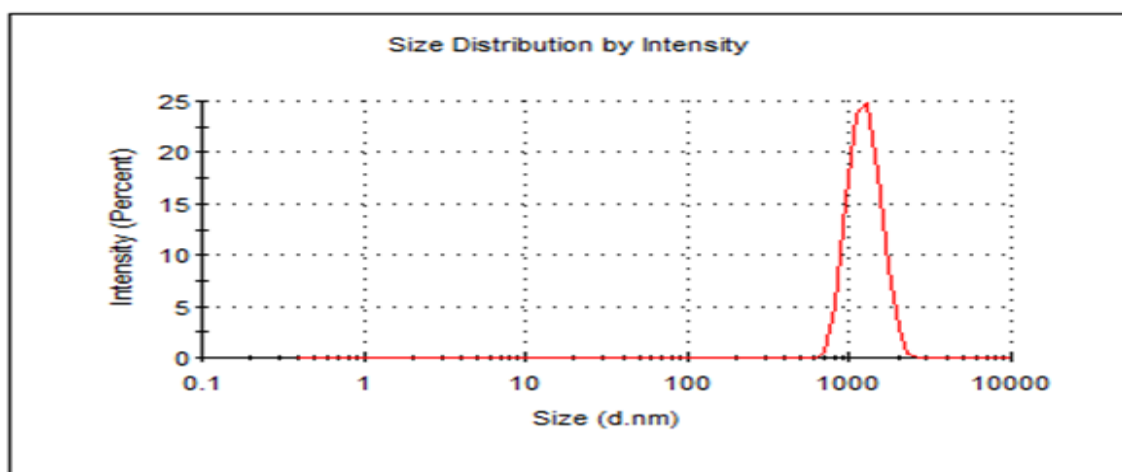
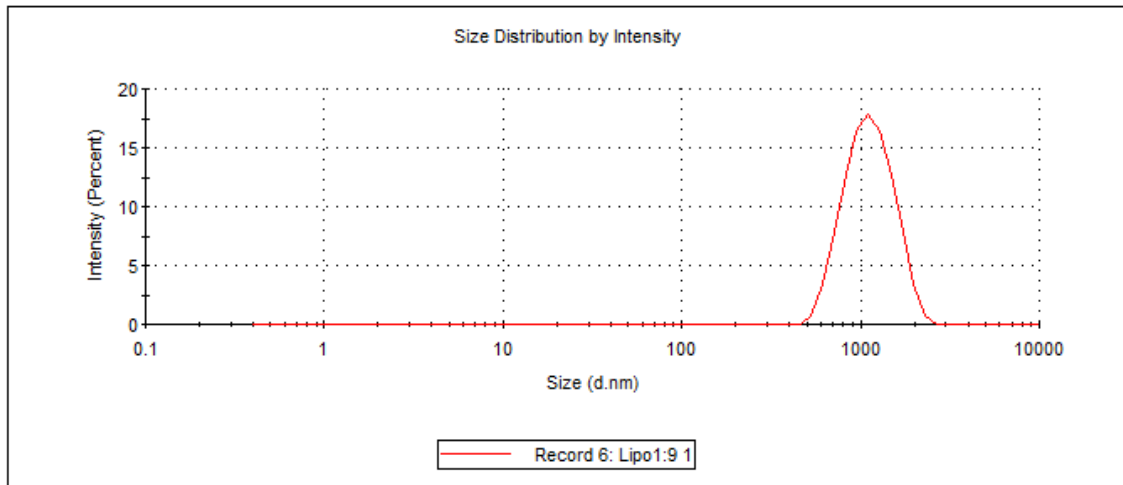


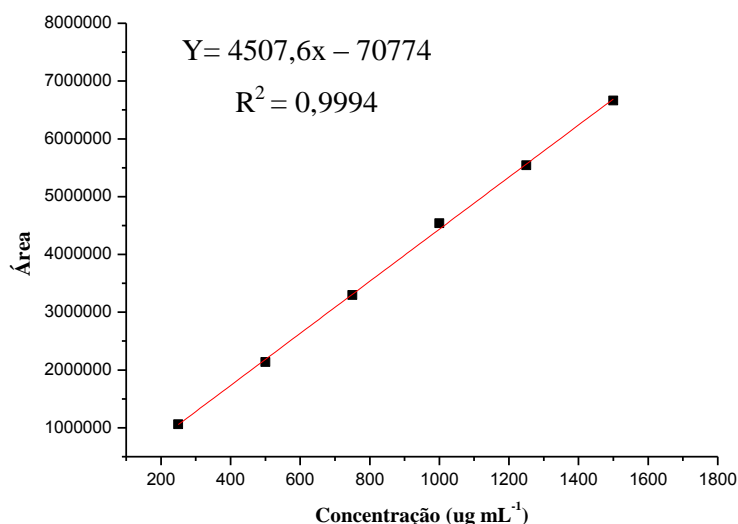
Gráfico 4. Distribuição do tamanho de partícula dos lipossomas vazios



A formulação LIPO-LS foi preparada na concentração de 2 mg.mL^{-1} de OE de *L. sidoides* Cham, porém durante o processo podem ocorrer perdas do OE principalmente por evaporação devido à alta volatilidade característica dos OEs. Assim, para quantificação do óleo essencial presente na formulação lipossomal e cálculo da taxa de encapsulação foram construídos uma curva de calibração com diferentes concentrações de timol, composto majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* Cham.

A curva de calibração construída (gráfico 5) relaciona diferentes concentrações de timol com as suas respectivas áreas do pico de concentração obtidos no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrofotômetro de massas. Esta curva apresenta uma equação da reta ($y = 4507,6x - 70774$) que permite calcularmos a concentração de timol (x) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ presente na LIPO-LS e consequentemente à concentração de OE de *Lippia sidoides* Cham a partir da área do pico obtido por CG-EM.

Gráfico 5. Curva de calibração do Timol.



Para a determinação do teor de OE presente na LIPO-LS foi inicialmente determinado à concentração total de Timol no OE de *L. sidoides*. Este OE foi diluído em metanol para a concentração de $666,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, seguida da injeção de $1 \mu\text{L}$ no CG-EM que gerou um sinal cromatográfico com área média de 2873209. Esse valor foi utilizado na equação da curva de calibração (gráfico 5) encontrando-se a concentração de $653 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de timol que equivale a 97,95% de abundância absoluta de timol presente no OE de *L. sidoides*.

O teor de OE na preparação LIPO-LS foi realizada após diluição em diclorometano (DCM) junto com o metanol (1:1:1v/v/v) a $666,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OE. O diclorometano foi utilizado para que houvesse o rompimento das vesículas lipossomais, liberando o OE encapsulado a ser doseado. Após injeção de $1 \mu\text{L}$ dessa solução no CG-EM (figura 5) obteve-se um sinal cromatográfico equivalente na curva de concentração a $617,06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de timol que comparado a concentração de timol obtido no OE $653 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ corresponde a 94,5% de OE de *L. sidoides* presente na formulação LIPO-LS.

Figura 5. Cromatograma obtido por CG-EM mostrando a área correspondente ao timol presente na amostra de LIPO-LS.

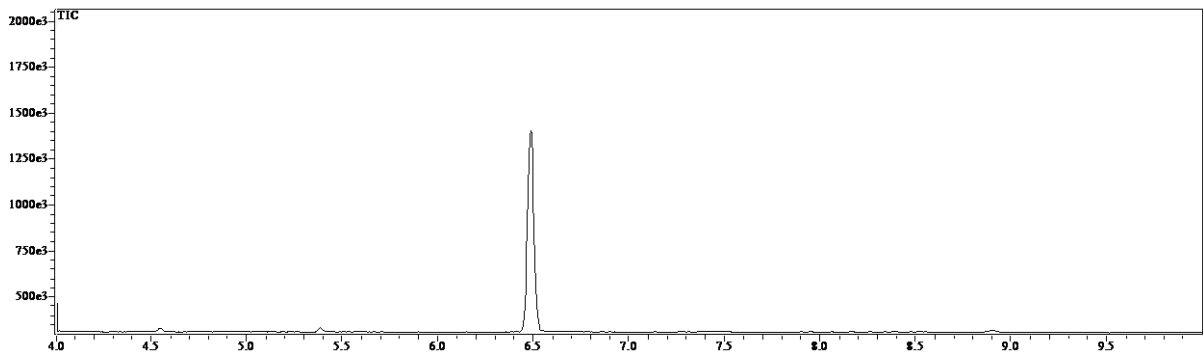
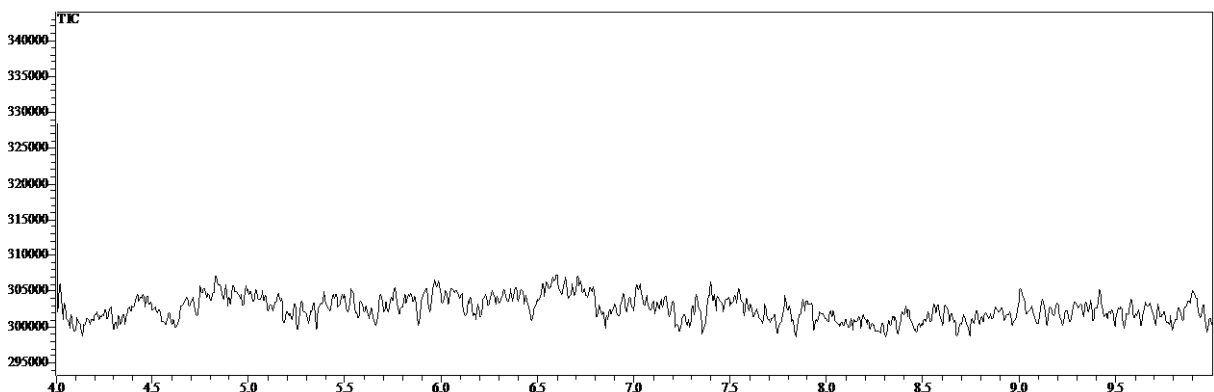


Figura 6. Cromatograma do ultrafiltrado da LIPO-LS em CG-EM



Uma técnica empregada para quantificação do fármaco em lipossomas é a ultrafiltração-centrifugação na qual uma membrana (10 kDa) é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do fármaco é determinada no ultrafiltrado e a fração de fármaco encapsulado é calculada pela subtração das concentrações total e livre (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Utilizando esta técnica foi obtido um ultrafiltrado da LIPO-LS que em seguida foi solubilizado em metanol 1:2 (v/v). e injetado no CG-EM, gerando um cromatógrafo sem sinal correspondente ao timol (Figura 6). Dessa forma, pode-se afirmar que não havendo Timol no ultrafiltrado, todo o OE de *L. sidoides* Cham. encontra-se encapsulado em lipossomas, com resultado de 100 % de OE encapsulado. Outros autores desenvolveram nanocapsulas contendo OE de *L. sidoides* e a formulação em melhores condições obteve 70,6 % de eficiência de encapsulação (PINTO et al., 2016). O óleo essencial isolado dos botões de *Syzygium aromaticum* foi encapsulado em lipossomas e obteve até 94 % de eficiência de encapsulação (SEBAALY et al., 2015).

Portanto, considerando que a LIPO-LS obteve teor de 94,5 %, taxa de incorporação do óleo essencial em lipossomas de 100 % e foi preparada na concentração teórica de 2 mg.mL⁻¹, podemos afirmar que sua concentração real é de 1,89 mg.mL⁻¹ de OE encapsulado (tabela 3). Por se tratar de óleo essencial que tem como característica a alta volatilidade, resultado como este mostra o sucesso da técnica de incorporação de óleo.

5.5 CONCLUSÃO

Óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham foi obtido e sua caracterização mostrou uma composição química rica em monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o timol o composto majoritário. Uma metodologia rápida e eficaz para quantificação do OE de *L. sidoides* Cham. por CG-EM também foi desenvolvida com sucesso. Este OE foi incorporado em vesículas lipossomais, as quais apresentaram características físico-químicas adequadas para iniciar testes biológicos, mostrando ainda que a técnica usada foi eficiente para a incorporação do óleo essencial. Portanto, os resultados deste estudo se apresentam como uma alternativa para o desenvolvimento de novas formulações a partir de vesículas lipossomais contendo óleos essenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured publishing corporation, USA 2007, 4th, ISBN 978-1-932633-21-4, 804p.

ANCHIÊTA-JÚNIOR, J. J. L.; LIMA, H. R. S.; CAVALCANTE, I. M. F.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; ROLIM, H. M. L. Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade in vitro em células tumorais humanas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 119-125, 2014.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils — a review. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., BEVILAQUA, C.M.L., MORAIS, S.M., MACIEL, M.V., COSTA, C.T.C., MACEDO, I.T.F., OLIVEIRA, L.M.B., BRAGA, R.R., SILVA, R.A., VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288–294, 2007.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BRADI, W.; Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, p. 220–243, 2015.

FALQUEIRO, A. M.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; JARDIM, D. R.; PRIMO, F. L.; MORAIS, P. C.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; SUCHOCKI, P.; TEDESCO, A. C. In vitro cytotoxicity of Selol-loaded magnetic nanocapsules against neoplastic cell lines under AC magnetic field activation. **Journal of Applied Physics**, v. 111, n. 7, p. 07B335, 2012.

FARIAS, E.M.F.G.; XIMENES, R.F.; MAGALHÃES, L.P.M.; CHIAPPETA, A.A.; et al. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. **Journal of Herbal Medicine**, v.2, n.3, p.63-67, 2012.

FARIAS-JUNIOR, P.A., RIOS, M.C., MOURA, T.A., ALMEIDA, R.P., ALVES, P.B., BLANK, A.F., FERNANDES, R.P.M., SCHER, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, v.45, p.399–402, 2012.

FERNANDES, L.P.; CANDIDO, R.C.; OLIVEIRA, W.P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and bioproducts processing**, v.90, p.425–432, 2012.

GALVEZ, P.; RUIZ, A.; CLARES, B. El futuro de la medicina clínica hacia nuevas terapias: terapia celular, génica y nanomedicina. **Medicina Clínica**, v.137, n.14, p.645–649, 2011;

ISMAN, M.B.; WILSON, J.A.; BRADBURY, R. Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni* in relation to their chemical compositions. **Pharmaceutical Biology**, v.46, p.82–87, 2008.

KALAT, S.A. M.; KHAMESIPOUR, A.;BAVARSAAD, N.; FALLAH, M.; KHASHAYARMANESH, Z.; FEIZI, E.; NEGHABI, K.; ABBASI, A.; JAAFARI, M. R. Use

of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of L. major lesion in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v.143, p. 5–10, 2014.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v.1, p.147–168, 2012.

LIMA, G.P.G., SOUZA, T.M., FREIRE, G.P., FARIAS, D.F., CUNHA, A.P., RICARDO, N.M.P.S., MORAIS, S.M., CARVALHO, A.F.U. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and Croton species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, v. 112, p.1953–1958, 2013.

LIRA MCB, SIQUEIRA-MOURA MP, ROLIM-SANTOS HML, GALETTI FCS, SIMIONI AR, SANTOS NP, ET AL. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, p. 49-58, 2009.

MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.79, p.84–87, 1998.

MEDEIROS, M. G. F.; SILVA, A. C.; BORGES, A. R.; LIMA, S. G.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.60, p.237–241, 2011.

MISHRA P. R., AL SHAAL L., MÜLLER R. H., KECK C. M. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.371, p.182–189, 2009.

MORENO, L. C; DA SILVA OLIVEIRA, G. Z; CAVALCANTI, I. M; SANTOS-MAGALHÃES, N. S; ROLIM, H. M; DE FREITAS, R. M. Development and evaluation of liposomal formulation containing nimodipine on anxiolytic activity in mice. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 116, p. 64-8, 2014.

MOTA, M.L., LOBO, L.T.C., COSTA, J.G.M., COSTA, L.S., ROCHA, H.A.O., SILVA, L.F.R., POHLIT, A.M., ANDRADE-NETO, V.F.A. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in Northeastern Brazil. **Planta Medica**, v.78, p.658–664, 2012.

PINTO, N.O.F; RODRIGUES, T.H.S; PEREIRA, R.C.A; SILVA, L.M.A. et al., Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v.86, p.279–288, 2016.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250–264, 2014.

REINER. G. N.; FRACETO. L. F.; PAULA. E.; PERILLO. M. A.; GARCÍA, D. A. Effects of Gabaergic Phenols on Phospholipid Bilayers as Evaluated by H-NMR. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 4, p. 28-34, 2013.

RODRIGUES, L.; MARTÍN, M.A.; RUIZ, M.A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p.41–59, 2016

SCHAFFAZICK, S. R; GUTERRES, S. S; FREITAS, L. L; POHLMANN A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n.5, p. 726-737, 2003.

SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**. v.178, p.52–62, 2015.

VARONA, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Liposomal incorporation of Lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas saturated solutions. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 50, p. 2088–2097, 2011.

VERAS. H. N.H.; FABÍOLA F.G. RODRIGUES.; ARACÉLIO V. COLARES.; IRWIN R.A. MENEZES.; HENRIQUE D.M. COUTINHO.; MARCO A. BOTELHO.; JOSÉ G.M. COSTA. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p. 508–512, 2012.

CAPÍTULO III

***IN VITRO* ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CITOTOXICIDADE DE UMA
FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides*
Cham.**

**IN VITRO ATIVIDADE ANTILEISHMANIA E CITOTOXICIDADE DE UMA
FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides*
Cham.**

MACÊDO, M. A.¹; RAMALHO, T.C.²; COELHO, M. B.²; LIMA NETO, J. S.³; ALVES,
M. M. M.⁴; CARVALHO, F. A. A.⁴; MEDEIROS, M.G.F.¹; ROLIM, H. M. L.¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, Teresina – PI, Brasil

²Graduação em Farmácia, UFPI, Teresina – PI, Brasil

³Laboratório de Geoquímica Orgânica, UFPI, Teresina – PI, Brasil

⁴Programa de Pós-graduação em Farmacologia, UFPI, Teresina – PI, Brasil

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (NTD) com manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas ulcerativas a forma visceral mais grave e fatal se não tratada. Apesar de sua importância epidemiológica seu tratamento ainda é feito com quimioterápicos limitados. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antileishmania *in vitro* do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. na forma livre e encapsulado em lipossomas (LIPO-LS) bem como sua citotoxicidade. Formas promastigotas de *L. major* em fase logarítmica de crescimento foram semeadas na quantidade de 1×10^6 parasitas/poço contendo concentrações seriadas das substâncias-teste a temperatura de 26 °C por 48 h. Formas amastigotas axênicas também foram cultivadas e internalizadas em macrófagos murinos para avaliação da inibição da infecção e infectividade pelas substâncias-teste. A avaliação da citotoxicidade foi realizada em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT e pelo teste de hemólise. O óleo essencial de *L. sidoides* Cham. apresentou atividade antileishmania dependente de concentração contra as formas promastigotas de *L. major*, baixa toxicidade contra macrófagos peritoneais murinos (CC_{50} de 96,849 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e não se mostrou tóxico em eritrócitos humanos ($CH_{50} > 800 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Além disso, a encapsulação do OE em lipossomas potencializou a atividade antileishmania e não apresentou citotoxicidade. Portanto, a formulação LIPO-LS é uma promissora alternativa para o tratamento da leishmaniose. Porém, devem ser realizados mais testes com essa formulação lipossomal para obtenção de um medicamento fitoterápico com segurança e eficácia comprovadas.

Palavras-chave: *Leishmaniose, Lipossoma, Citotoxicidade, Lippia sidoides, Leishmania major.*

6.1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (NTD) causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*. Cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas em mais de 98 países no mundo (WHO, 2016). Suas manifestações clínicas vão desde lesões cutâneas ulcerativas a forma visceral, que é a forma mais grave de leishmaniose (ABEBE et al., 2012). Apesar de sua importância epidemiológica seu tratamento ainda é feito com quimioterápicos que incluem antimônios pentavalentes (estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de meglumina), o antibiótico polieno anfotericina B (desoxicolato de anfotericina B, Fungizone®) e sua formulação lipossomal (AmBisome®), além de fármacos de uso oral como a Miltefosina (Impavido®) e a paromomicina (aminosidine). Estes apresentam várias limitações incluindo toxicidade significativa, desenvolvimento de resistência, custo alto e tratamento de longa duração que levam o paciente a não aderir ao tratamento (NICOLETTI et al., 2010),

Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae), popularmente conhecida como “Alecrimpimenta” é uma planta comumente encontrada no nordeste do Brasil. Estudos mostram que seu óleo essencial possui ação leishmanicida (FARIAS-JUNIOR et al., 2012; MEDEIROS et al., 2011). No entanto, como uma mistura de componentes lipofílicos, os óleos essenciais exibem baixa solubilidade em água, alta volatilidade e são susceptíveis a degradação física e química (PINTO et al., 2016). Para contornar essas limitações e promover uma viabilidade de administração biológica desses óleos, alguns métodos da nanotecnologia farmacêutica vêm sendo introduzidos, dentre os quais, a encapsulação lipossomal (WEN et al., 2010).

Lipossomas são vesículas esféricas anfifílicas, formadas por uma ou várias camadas fosfolipídicas com um interior aquoso. Portanto, podem carrear compostos lipofílicos como os óleos essenciais entre suas camadas fosfolipídicas, melhorando sua solubilidade e estabilidade química. Além disso, por serem biodegradáveis, não imunogênicos, não tóxicos e biocompatíveis, tornam-se altamente versáteis para pesquisa, terapêutica e aplicações analíticas (SEBAALY et al., 2015). Os lipossomas são capazes, ainda, de aumentar a eficácia terapêutica além de diminuir os efeitos colaterais como demonstrado pela anfotericina B lipossomal (ambisome®), devido à ampla captação dos mesmos pelos macrófagos que são as principais células no hospedeiro vertebrado que albergam a leishmania (FILIPPIN; SOUZA, 2006).

O presente estudo avaliou a atividade antileishmania *in vitro* do OE de *L. sidoides* Cham. na forma livre e encapsulado em lipossomas (LIPO-LS), do Timol e dos lipossomas

vazios contra formas promastigotas e amastigotas internalizadas de *Leishmania major* em macrófagos murinos, bem como a sua citotoxicidade em células de mamíferos.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Dimetilsulfóxido (DMSO:99%) foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, meio RPMI (Soro fetal bovino (SFB), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio Bromo, Azul Alamar (Resazurina®), o Timol e os antibióticos Penicilina e Estreptomicina foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldrich Brasil). O antibiótico Anfotericina B (Anf B 90%), panótico rápido® foram adquiridos da Cristália (São Paulo, SP). A LIPO-LS consiste de lipossomas contendo $1,89 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham, fosfatidilcolina de soja, estearilamina e colesterol, obtida pelo método de hidratação do filme lipídico descrito por Anselem, 1993 com adaptações (ANCHIÊTA-JUNIOR et al., 2014; MORENO et al., 2014), com tamanho de partícula de $1.230 \pm 281,7 \text{ nm}$; índice de polidispersão 0,152; potencial zeta $37,1 \pm 9,41 \text{ mV}$ e pH 7,79 .

6.2.1 Animais

Foram utilizados 5 camundongos BALB/c (20-30g), para obtenção de macrófagos para os ensaios *in vitro*, sendo machos e fêmeas de 4 a 5 semanas de vida, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM/UFPI), mantidos a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e ciclo claro escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de sobre dose de uma associação de cloridrato de xilazina (10 mg.Kg^{-1} de peso vivo) e cloridrato de cetamina (100 mg.Kg^{-1} de peso vivo). Também foi utilizado um carneiro adulto, mantido no biotério central do Centro de Ciências Agrárias, para a coleta de 5 mL de sangue via jugular com seringa estéril e anticoagulante (EDTA) uma única vez. Os experimentos propostos foram previamente submetidos à avaliação do Comitê de Ética em Experimentação com Animal da UFPI e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPI com o número de protocolo 090/15.

6.2.2 Parasitas e Células

Foram utilizadas cepas da espécie *Leishmania major* (MHOM/IL-80/Friedling) mantidas no Laboratório de Atividade Antileishmania, Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI), em passagens sucessivas em camundongos BALB/c. As formas promastigotas foram cultivadas em meios Schneider's, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10

mg a 26 °C em estufa de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) As formas amastigotas axênicas de *L. major* foram cultivadas em meios Schneider's, suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg a 34 °C em estufa B.O.D. obtidas após a transformação *in vitro* das formas promastigotas (CARNEIRO et al., 2012).

Os macrófagos utilizados neste trabalho foram obtidos da cavidade peritoneal dos animais descritos no item 6.2.1. Para tanto, foi administrado 2 ml de tioglicolato na cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c para indução da inflamação e após dois dias foram eutanasiados conforme o item 6.2.1, em seguida imersos em álcool a 70 % e levados para a retirada dos macrófagos presentes na cavidade peritoneal que foi feita em capela de fluxo laminar, com os animais fixados em placa de cortiça na posição de decúbito dorsal, administrando-se 6 mL de salina tamponada com fosfato (PBS – NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM, Na₂HPO₄ 1 mM, pH 7,4), estéril, a 4 °C, na cavidade abdominal. Em seguida foi feita uma massagem suave na região abdominal e realizada a aspiração do PBS injetado utilizando-se uma agulha acoplada a uma seringa estéril. O material obtido foi transferido para um tubo cônico de poliestireno com capacidade de 50 mL, centrifugado a 1000 rpm, durante 10 min.

Logo após foi lavado três vezes com PBS estéril na temperatura de 4 °C. Para averiguação da viabilidade celular, foi contado em Câmara de Neubauer, diluído em corante azul de Trypan (Sigma, EUA).

6.2.3 Atividade *in vitro* sobre o parasita por inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania major*.

As contrações utilizadas nos testes *in vitro* foram obtidas por diluições seriadas da seguinte maneira. Inicialmente foram pesados alíquotas de 80 mg do Óleo essencial, do Timol, da LIPO-LS e dos lipossomas vazios, em seguida foram diluídos em 1 mL de DMSO obtendo-se soluções de 80 mg.mL⁻¹ de OE, Timol, LIPO-LS e de lipossomas vazios respectivamente. Para realização dos testes foram alíquotados separadamente 20 µL de cada uma dessas soluções obtidas e adicionados as respectivas placas de cultivo celular juntamente com 180 µL de meio de cultura, obtendo-se um volume final de 200 µL na concentração de 800 µg.mL⁻¹ no primeiro poço de cada placa para as respectivas alíquotas testadas. Procedeu-se então uma diluição seriada retirando-se 100 µL na sequencia para obtenção das concentrações finais 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg.mL⁻¹. Para a LIPO-LS como o doseamento mostrou possuir 1,89 mg.mL⁻¹ de OE de *L. sidoides* essas concentrações obtidas com a diluição seriada correspondem a 15,12; 7,56; 3,78; 1,89; 0,95; 0,47; 0,24; 0,12; µg. mL⁻¹

¹ de óleo essencial. Em seguida, formas promastigotas de *Leishmania major* em fase logarítmica de crescimento foram semeadas na quantidade de 1×10^6 parasitas/poço em placas de cultivo celular de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa B.O.D a temperatura de 26 °C por 48 h. Após esse período avaliou-se a inibição do crescimento através de método colorimétrico, adicionando 1 mM de Azul Alamar (Resazurina®), e incubou-se novamente por 6 h nas mesmas condições anteriores. Após incubação foi feita a leitura em espectrofotômetro a 550 nm e os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento (%). O controle negativo foi realizado com meio Schneider's contendo 1×10^6 promstigotas por poço e 0,2 % de dimetilsulfoxido (DMSO) e considerado como 100 % de viabilidade dos parasitas (SOARES et al., 2007).

6.2.4 Avaliação da citotoxicidade lipossomal.

6.2.4.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos pelo teste do MTT

Avaliou-se a citotoxicidade do OE de *L. sidoides* Cham, do Timol, da LIPO-LS e dos lipossomas vazios utilizando o teste do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Em placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado e cerca de 2×10^5 macrófagos por poço que foram obtidos conforme demonstrado no item 6.2.2. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 4 h para adesão celular. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI suplementado para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de RPMI 1640 suplementado juntamente com as soluções do OE de *L. sidoides* Cham, Timol, LIPO-LS e dos lipossomas vazios em diferentes concentrações obtidas por diluições seriadas 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg.mL⁻¹. Em seguida foram incubadas por 48 h e ao final da incubação, foi adicionado 10 µL de MTT diluído em meio RPMI a 5 mg.mL⁻¹. Foram incubados por mais 4 h em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, e em seguida o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 µL de DMSO em todos os poços. Em seguida, a placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min em agitador de Kline (modelo AK 0506), a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan. Por ultimo, foi realizada a leitura a 550 nm por espectrofotometria. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração citotóxica média (CC₅₀) sendo o grupo controle considerado como 100 % (NOGUEIRA et. al., 2007).

6.2.4.2 Citotoxicidade em eritrócitos de carneiro.

Para a avaliação da atividade hemolítica foram coletados 5 mL de sangue de carneiro via jugular com seringa estéril e anticoagulante (EDTA) uma única vez. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 μL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5 % de hemácias. Em seguida foram adicionadas as soluções do OE de *L. sidoides* Cham., de LIPO-LS, do Timol e dos lipossomas vazios em oito concentrações 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ num volume de 20 μL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h a 37 °C e a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1000G, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para uma placa de 96 poços e submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm, utilizando um leitor de placas Biotek (Elx800) para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100 % de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada por igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH_{50}) considerando o controle positivo como 100 % de hemólise (LÖFGREN ET AL., 2008).

6.2.5 Atividade sobre macrófagos infectados por amastigotas de *Leishmania major*.

Macrófagos foram adicionados em placas de cultura com 24 poços na concentração de 2×10^5 células por poço em 500 μL de meio RPMI suplementado, contendo lamínulas estéreis redondas de 13 mm. As placas foram incubadas a 37 °C e a 5 % de CO_2 por 2 h para a adesão celular. Após este tempo, o meio foi substituído por 500 μL de RPMI suplementado com 10 % de SFB e penicilina-estreptomicina 10.000 UI/10 mg e as placas foram incubadas por mais 3 h. Após este período, o meio RPMI suplementado foi aspirado e novo meio foi adicionado contendo formas amastigotas de *L. major* na proporção de 10 amastigotas axênicas para 1 macrófago em cada poço. Após 4 h de incubação a 5 % de CO_2 e a 37 °C, o meio foi aspirado para remover as amastigotas livres. Em seguida 1 mL de RPMI suplementado foi adicionado em cada poço contendo os valores correspondentes de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de OE de *L. sidoides* Cham. (concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}\text{CI}_{50}$, $1 \times \text{CI}_{50}$ e $2 \times \text{CI}_{50}$ sobre as formas promastigotas), 6,25; 12,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Timol (concentrações correspondentes a $\frac{1}{4}\text{CI}_{50}$, $\frac{1}{2}\text{CI}_{50}$ e $1 \times \text{CI}_{50}$ sobre as formas promastigotas), 25, 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de LIPO-LS (concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}\text{CI}_{50}$, $1 \times \text{CI}_{50}$ e $2 \times \text{CI}_{50}$ sobre as formas promastigotas), as mesmas concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os lipossomas vazios. Após incubação de 48 h, as lamínulas foram removidas, fixadas em metanol e coradas com Panótico rápido. Para

cada tratamento, contou-se o número de macrófagos infectados (infecção) e a carga parasitária (infectividade) percorrendo os campos das amostras até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia óptica e aumento de 1000x. Estes valores foram então multiplicados para o cálculo da concentração inibitória média (CI₅₀) de formas amastigotas internalizadas. O controle negativo foi realizado com meio RPMI 1640 suplementado a 0,2 % de DMSO e o controle positivo foi realizado com Anfotericina B na concentração de 2 µg.mL⁻¹ (CARNEIRO et al., 2012).

6.2.6 Análise Estatística

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em três experimentos independentes. As CI₅₀, CC₅₀ e CH₅₀ com limite de confiança de 95 %, foram calculadas utilizando regressão de probitos, utilizando pacote estatístico SPSS® versão 20. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni tomando-se o valor de * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. como nível máximo de significância estatística, utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism® versão 5.0.

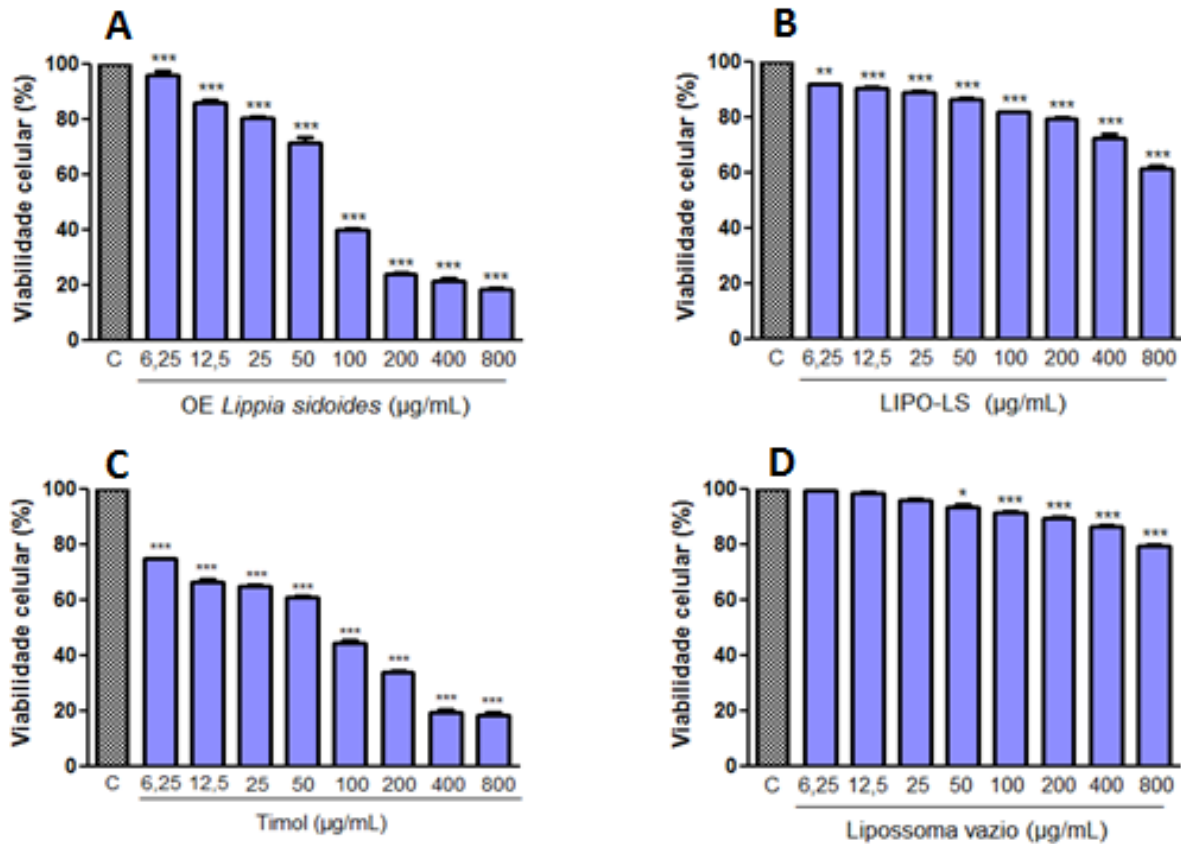
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A encapsulação dos OEs em nanopartículas além de aumentar a proteção contra ação do oxigênio, calor, luz e da umidade diminuem as limitações da terapia leishmanicida. Uma utilidade importante destes carreadores de partículas lipídicas é evitar a degradação inoportuna do fármaco e restringir a depuração. Este aspecto é crucial para a geração da resposta efetora contra a leishmaniose e também para reduzir a dose, tanto de componentes terapêuticos como profiláticos. Dessa forma, a toxicidade e resistência que são preocupações recentes de fármacos leishmanicidas atualmente utilizados, podem ser resolvidas através do uso de nanocarreadores adequados (SABUR, 2016).

Neste estudo, a formulação lipossomal do OE de *L. sidoides* Cham. (LIPO-LS) dotada de todas essas características, foi submetida a testes de citotoxicidade para determinação da sua segurança biológica. A avaliação da viabilidade celular é geralmente realizada por ensaios padronizados como o MTT que é um sal tetrazólico de coloração amarelo ouro e solúvel em água. Este sal quando incubado com células vivas, penetra pela membrana plasmática e em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial é reduzido pela succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias a cristais de MTT-formazan de coloração arroxeadada. Após a solubilização destes cristais pela adição de DMSO é realizada uma análise por espectrofotometria, onde a variação da coloração é diretamente proporcional à viabilidade celular. Isto torna o MTT um método colorimétrico rápido e sensível (LOOSDRECHT et al., 1991).

Os resultados de citotoxicidade pelo MTT do OE de *L. sidoides* Cham., da LIPO-LS, do lipossoma vazio e Timol e sobre macrófagos peritoneais murinos estão apresentados no gráfico 1. Através destes resultados, pode-se calcular a concentração citotóxica média (CC₅₀). O óleo essencial de *L. sidoides* foi capaz de reduzir 50 % da viabilidade dos macrófagos na concentração de 96,849 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seu componente majoritário timol foi ainda mais tóxico com CC₅₀ de 69,27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto a LIPO-LS e os lipossomas vazios apresentaram CC₅₀ >800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, sugere-se que essa toxicidade apresentada pelo OE se deve ao Timol ou principalmente a ele. Contudo, o OE de *L. sidoides* incorporado a lipossomas (LIPO-LS) reduziu apenas levemente a atividade mitocondrial, sendo considerado não tóxico, assim seguiu também o resultado com lipossomas vazios, usados somente como comparativo de toxicidade de nanopartículas; ao contrário do OE livre e do timol considerados tóxicos nas concentrações testadas (Tabela 1).

Gráfico 1. Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, da LIPO-LS, Timol e dos lipossomas vazios sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos.



Legenda: Óleo essencial de *L. sidoides* (A), LIPO-LS (B) Timol (C) lipossoma vazio (D). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de experimentos realizado em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos com o controle (DMSO 0,2% em meio RPMI 1640), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A investigação da ação tóxica de novas substâncias com atividade antileishmania sobre macrófagos é importante, uma vez que são as principais células do hospedeiro vertebrado parasitadas por leishmania. Além disso, a citotoxicidade a macrófagos é uma razão para a falta de aprovação de novas entidades moleculares ou formulações para o tratamento da leishmaniose (BITENCOURT et al., 2016).

Tabela 1. Ação antileishmania e citotóxica do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, Timol, da LIPO-LS e dos lipossomas vazios.

Amostra	Macrófagos	Eritrócitos	Promastigotas	Amastigotas Internalizadas	IS
	CC ₅₀ µg.mL ⁻¹	CH ₅₀ µg.mL ⁻¹	CI ₅₀ µg.mL ⁻¹	CI ₅₀ µg.mL ⁻¹	IS _{ama} µg.mL ⁻¹
O.E <i>L. sidoides</i>	96,85	>800	23,067	12,45	7,78
Timol	69,27	>800	22,57	8,55	8,10
LIPO-LS	>800	>800	54,363	3,43	ND
Lipossomas Vazios	>800	>800	808,664	286,44	ND
Anf B	8,75	ND	1,74	0,16	54,68

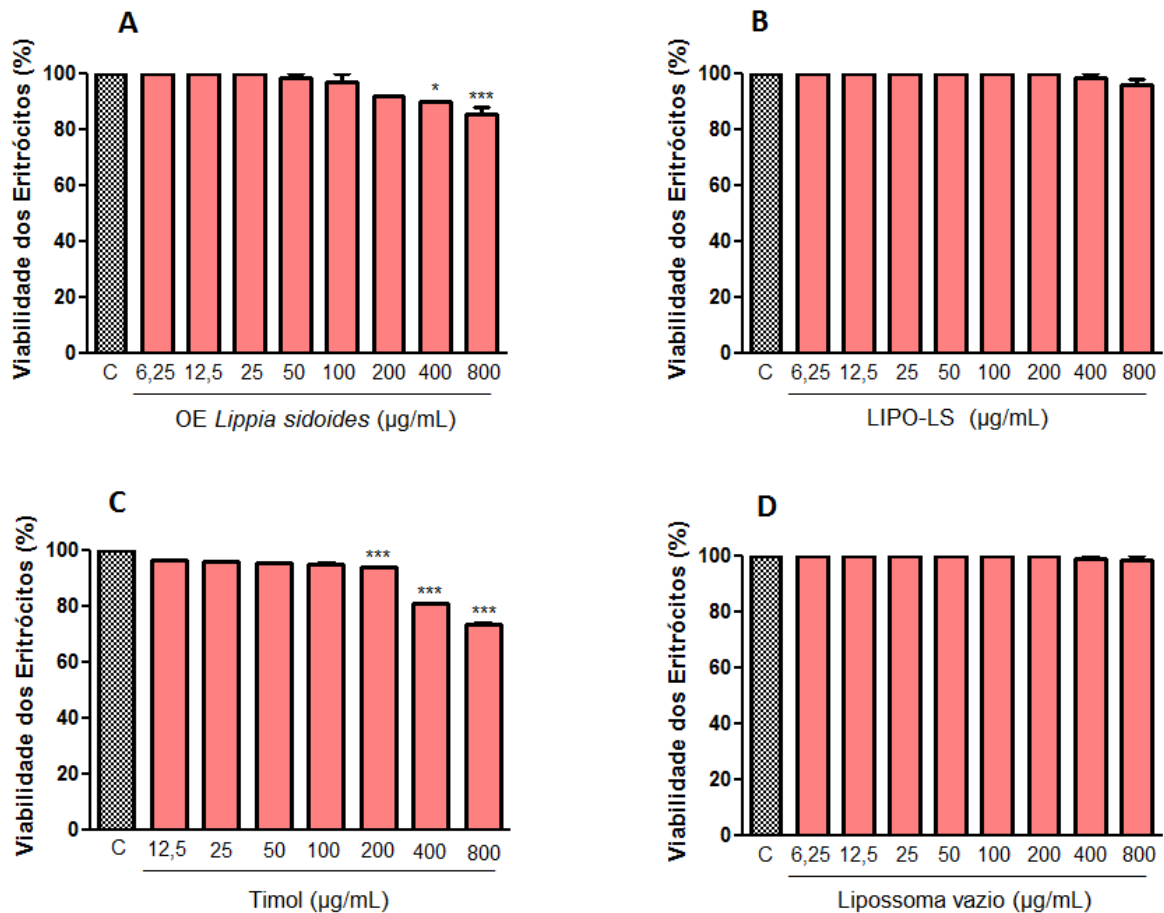
IS_{ama} (índice de seletividade)= CC₅₀ macrófagos/ CI₅₀ amastigotas internalizadas

ND- Não determinado

Além do teste do MTT outros diferentes ensaios citotóxicos também podem ser realizados para se determinar a segurança de uma formulação a células de animais e humanos, visando futuro tratamento *in vivo*. O teste de hemólise permite avaliar o potencial do fármaco em causar lesões na membrana plasmática dos eritrócitos, seja pela formação de poros ou ruptura total, causando danos à membrana plasmática ou alterações em sua permeabilidade (RODRIGUES, 2013). Para avaliar essa atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de carneiro que assim como os obtidos de sangue humano do tipo O⁺ e de coelhos, são utilizados por não apresentarem alta expressão de proteínas ou glicoproteínas, que são susceptíveis a ativação por novos fármacos, resultando em uma atividade hemolítica, falso positiva (CARNEIRO et al., 2012).

Os resultados obtidos no teste de viabilidade de eritrócitos de carneiro mostram que o OE de *L. sidoides* Cham, o Timol, LIPO-LS e os lipossomas vazios não apresentaram toxicidade. A concentração hemolítica 50 (CH₅₀) destes não pôde ser calculada, pois como mostrado no gráfico 2 e tabela 1 provocaram baixa % de lise de eritrócitos, inclusive na maior concentração testada (800 µg.mL⁻¹). Portanto, são considerados não tóxicos nas concentrações testadas ou CH₅₀ > 800, como mostrado na tabela 1.

Gráfico 2. Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, da LIPO-LS , Timol e dos lipossomas vazios sobre a viabilidade de eritrócitos de carneiro.



Legenda: Óleo essencial de *L. sidoides* (A), LIPO-LS (B) Timol (C) lipossoma vazio (D). O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de experimentos independentes realizados em duplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos com o controle (PBS), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As eficiências dos diferentes OEs são comparadas por análise das concentrações necessárias para inibir o crescimento dos organismos alvo. Geralmente, os valores das concentrações inibitórias média CI_{50} são utilizados para a comparação de bioatividades por metodologias padronizadas (RAUT E KARUPPAYIL, 2014).

Em nosso estudo investigamos a atividade antileishmania do OE de *Lippia sidoides* Cham e seu constituinte majoritário o monoterpene Timol sobre promastigotas de *L. major* e foi observado uma efetividade ligeiramente maior do Timol (CI_{50} de $22,57 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que o OE ($23,067 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Porém, o Timol isolado apresentou uma maior toxicidade contra macrófagos (CC_{50} de $69,27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) do que o OE (CC_{50} de $96,849 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O OE livre apresentou também uma atividade antileishmania dependente de concentração (gráfico 3).

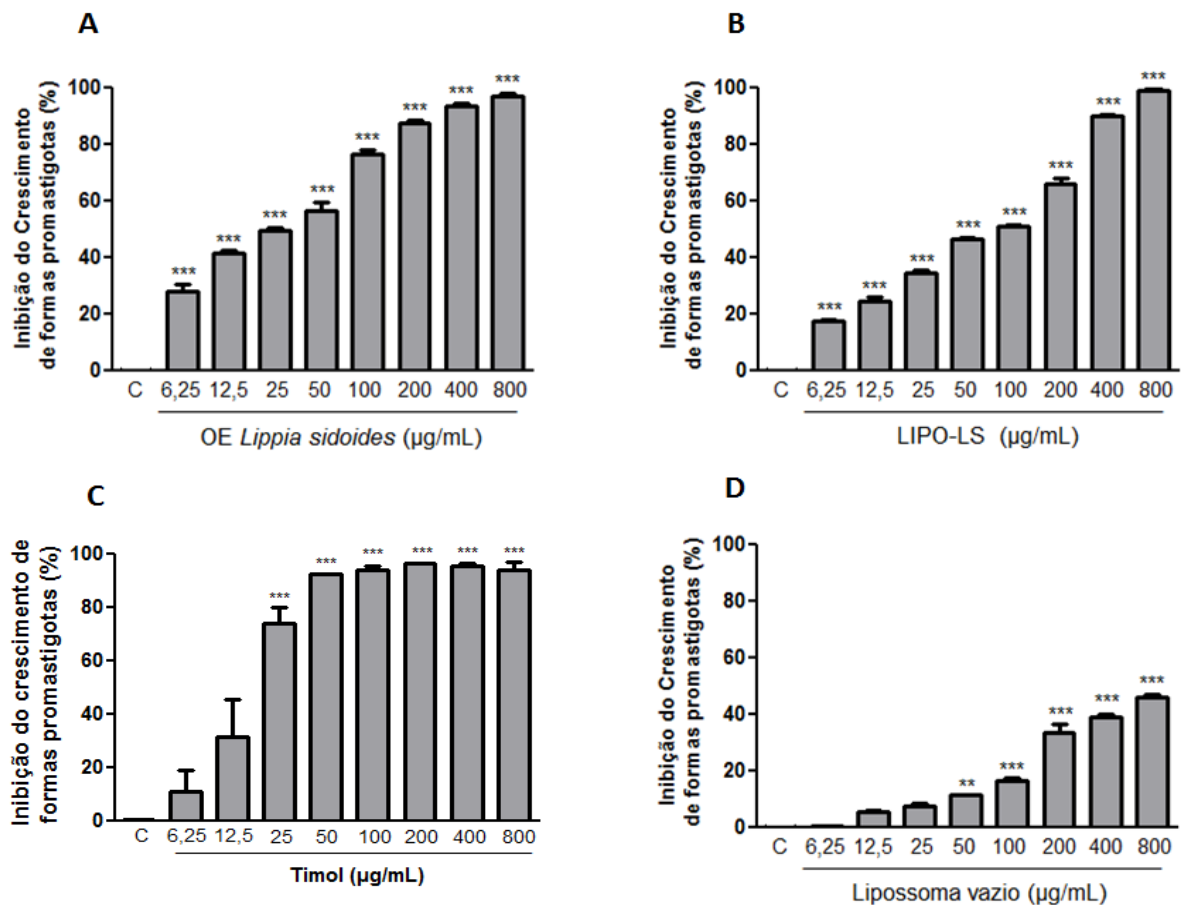
Resultados semelhantes foram encontrados por Medeiros, et al. (2011) com *L. brasilienses*, onde o Timol também apresentou uma maior efetividade e toxicidade que o OE de *L. sidoides*. Em outro estudo, o óleo essencial de *L. sidoides* apresentou CI_{50} de $19,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra promastigotas de *Leishmania chagasi* (RONDON et al., 2012). Essa baixa toxicidade apresentada pelo OELS para as células de mamíferos quando em comparação com timol pode ser devido ao efeito protetor de outros constituintes do óleo em macrófagos (MEDEIROS, et al. 2011).

O OE de *L. sidoides* Cham. encapsulado em lipossomas contra formas promastigotas de *L. major* apresentou um perfil inibitório crescente com o aumento da concentração testada e uma CI_{50} de $54,363 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (tabela 1). Porém, deve-se ressaltar que a LIPO-LS contém apenas $1,89 \text{ mg.mL}^{-1}$ de OE de *Lippia sidoides* Cham na sua composição, ou seja, a concentração de OE presente na LIPO-LS esta em torno de 50 vezes menos concentrado que o OE livre testado. Dessa forma, pode-se inferir que a eficácia da LIPO-LS foi muito superior à apresentada pelo OE de *L. sidoides* Cham. (CI_{50} de $23,067 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Portanto, a encapsulação do óleo essencial potencializou sua ação leishmanicida contra promastigotas de *L. major* quando comparado a sua forma livre.

Os lipossomas vazios não inibiram 50% dos promastigotas em nenhuma das concentrações testadas o que impossibilitou o cálculo da CI_{50} , atribuiu-se então que seu valor é superior a 800 mg. mL^{-1} (Gráfico 3, Tabela 1). Neste caso, sugere-se que a atividade leishmanicida da LIPO-LS resulta principalmente da ação do OE, mas também deve-se considerar um sinergismo com seus lipossomas carreadores.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos em outros estudos, evidenciando que os sistemas de administração de fármacos normalmente conferem atividade semelhante, ou mesmo, superior ao fármaco livre. Por exemplo, nanocápsulas lipídicas contendo miltefosina foram administradas por via oral em camundongos e melhoraram a atividade anti-esquistossomótica do fármaco (EISSA, et al., 2015). Enquanto isso, a hexadecilfosfolina lipossomal demonstrou atividade amebicida significativa *in vitro* e em um modelo experimental em ratos exibiu efeito antitumoral superior à sua forma livre (KAUFMANN-KOLLE, et al., 1994).

Gráfico 3. Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* Cham, da LIPO-LS, do Timol e dos lipossomas vazios sobre formas promastigotas de *Leishmania major*.



Legenda: Óleo essencial de *L. sidoides* (A), LIPO-LS (B) Timol (C) lipossoma vazio (D) nas concentrações seriadas de 800 a 6,25 µg/mL. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de dois experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado *One-way ANOVA* para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações ao controle (DMSO 0,2% em meio Schneider's), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

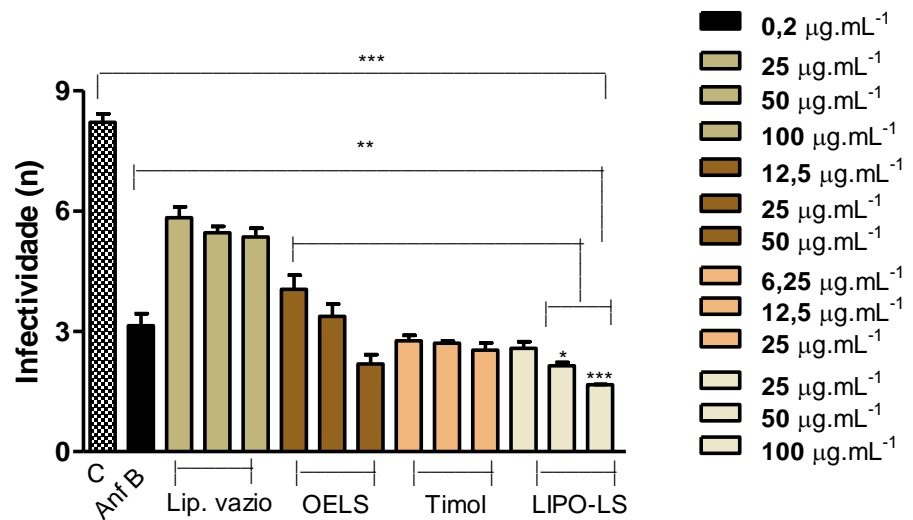
Neste trabalho também avaliamos a atividade antileishmania utilizando formas amastigotas internalizadas em macrófagos, tendo em vista que estas formas são as responsáveis pelas manifestações clínicas da leishmaniose (DI GIORGIO et al., 2005). Além disso, ao desenvolvermos terapias eficazes devemos considerar as principais características da célula hospedeira, como membrana plasmática e permeabilidade do vacúolo parasitóforo nos macrófagos, ou mesmo a presença de moléculas que podem interferir ou inativar o fármaco (AULNER, et al., 2013). Assim, para que um fármaco tenha eficácia contra leishmania ele deve ser capaz de atravessar a membrana da célula hospedeira e atuar sobre a amastigota no interior do vacúolo.

Os lipossomas são conhecidos por sua tendência de serem reconhecidos e internalizados pelos macrófagos por endocitose e por serem compostos seguros com toxicidade mínima (BHATIA E KATARE, 2004, GHCZY E GAREISS, 1994, PATEL E MOGHIMI, 1993). Portanto, esta estratégia foi aplicada para a entrega do OE de *L. sidoides* através da LIPO-LS buscando uma eficácia maior que a sua forma livre contra as leishmanias que residem num parasitóforo localizado dentro dos macrófagos do hospedeiro e uma menor toxicidade, já demonstrada pelo teste do MTT (gráfico 2).

A atividade antileishmania foi então adicionalmente avaliada sobre formas amastigotas de *L. major* internalizadas em macrófagos peritoneais murinos. O resultado foi ainda melhor que sobre as formas promastigotas, em 48 h de exposição para o OE de *L. sidoides* (CI_{50} 12,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), Timol (CI_{50} 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), LIPO-LS (CI_{50} 3,43 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e lipossomas vazios (CI_{50} 286,44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (tabela 1). Estes resultados corroboram com Tariku et al. (2010) que demonstraram maior atividade dos óleos essenciais de *Artemisia absinthium* e *Satureja punctata* contra formas amastigotas do que para formas promastigotas.

Ao analisar a infectividade de macrófagos murinos por *L. major*, o controle obteve em média 8 amastigotas/macrófago. A Anfotericina B utilizada como controle positivo reduziu essa razão de parasitas/macrófagos para aproximadamente 3 na concentração de 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os lipossomas vazios reduziram para menos de 6, valor muito superior ao apresentado pela LIPO-LS que diminuiu para em média 2 amastigotas/macrófago. Kalat et al., 2014 utilizou lipossomas contendo antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. major* em camundongos BALB/c e observou que além dos lipossomas contendo Glucantime os lipossomas vazios também apresentaram uma diminuição do número de parasitas no baço. O OE livre reduziu a infectividade de forma proporcional pelo aumento da concentração testada, obtendo na maior concentração uma razão menor que 2 amastigotas/macrófago. As concentrações avaliadas do timol foram menores que as das demais substâncias devido a sua alta toxicidade apresentada no teste do MTT e surpreendentemente, apresentou grande diminuição do número de leishmanias/macrófago para aproximadamente 2 não havendo diferença estatística entre as concentrações avaliadas (gráfico 4).

Gráfico 4. Efeitos de óleo essencial de *L. sidoides*, LIPO-LS, Timol, lipossomas vazios e da Anf B como fármaco de referência para avaliar a infectividade de macrófagos murinos por *Leishmania major*.



Legenda: número de amastigotas por macrófagos infectados. C: controle negativo; Anfotericina B: controle positivo; OELS: óleo essencial de *L. sidoides*; Timol: constituinte do óleo essencial de *L. sidoides*; LIPO-LS: óleo essencial de *L. sidoides* nanocarreado em lipossoma. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos com o controle negativo DMSO 0,2% em meio RPMI 1640 e controle positivo Anfotericina B, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

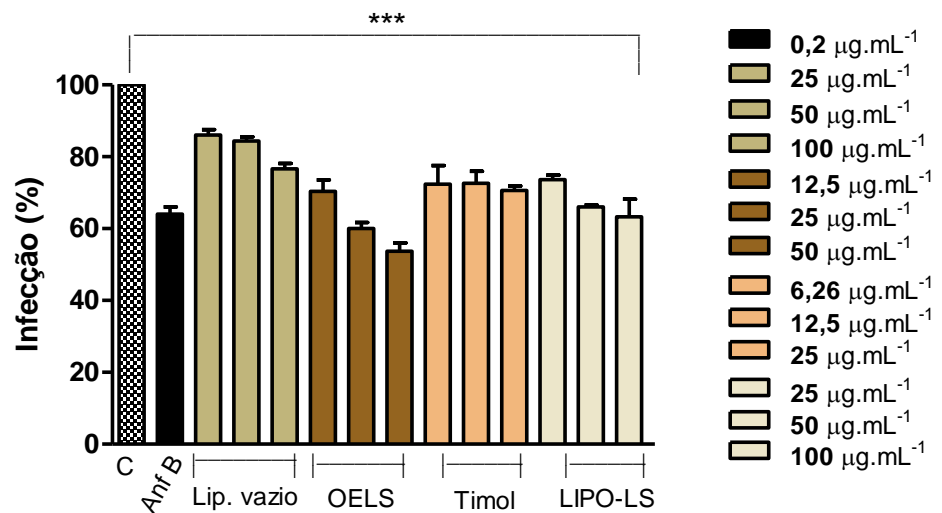
Na pesquisa de compostos ativos com potencial terapêutico contra *L. major*, é importante determinar a ausência de efeitos tóxicos nas células do hospedeiro. A citotoxicidade para macrófagos murinos e para protozoários foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) para macrófagos e IC₅₀ para protozoários. Os resultados do IS apresentados na Tabela 1 mostram que o OE de *L. sidoides* e o Timol são 7,78 e 8,10 vezes menos tóxicos para os macrófagos murinos do que para as leishmanias. Para a LIPO-LS e lipossomas vazios não foi possível determinar este índice tendo em vista que também não foi possível calcular as suas CC₅₀. A literatura recomenda que para amastigotas internalizadas em macrófagos este índice deve ser próximo ou superior a 20 (OSORIO et al., 2007). Portanto, apenas o OE livre não apresentou interessante toxicidade seletiva sobre o parasita.

Estes dados demonstram ainda que a LIPO-LS possui uma forte atividade *in vitro* contra amastigotas intracelulares tendo uma eficácia >150 vezes maior do que o OE livre, considerando-se a concentração de 1,89 mg. mL⁻¹ de óleo presente na formulação lipossomal.

Além disso, a LIPO-LS foi ≥ 2 vezes mais eficaz que a Anfotericina B (CI_{50} de 0,16) que apresentou uma inibição contra amastigotas internalizadas de *L. major* semelhante ao Timol (CI_{50} 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

A atividade antileishmania apresentada pelos lipossomas vazios provavelmente ocorra devido serem capazes de modificar a resposta imunológica ativando macrófagos e assim, a liberação de macromoléculas e por consequência à lise celular do parasita.

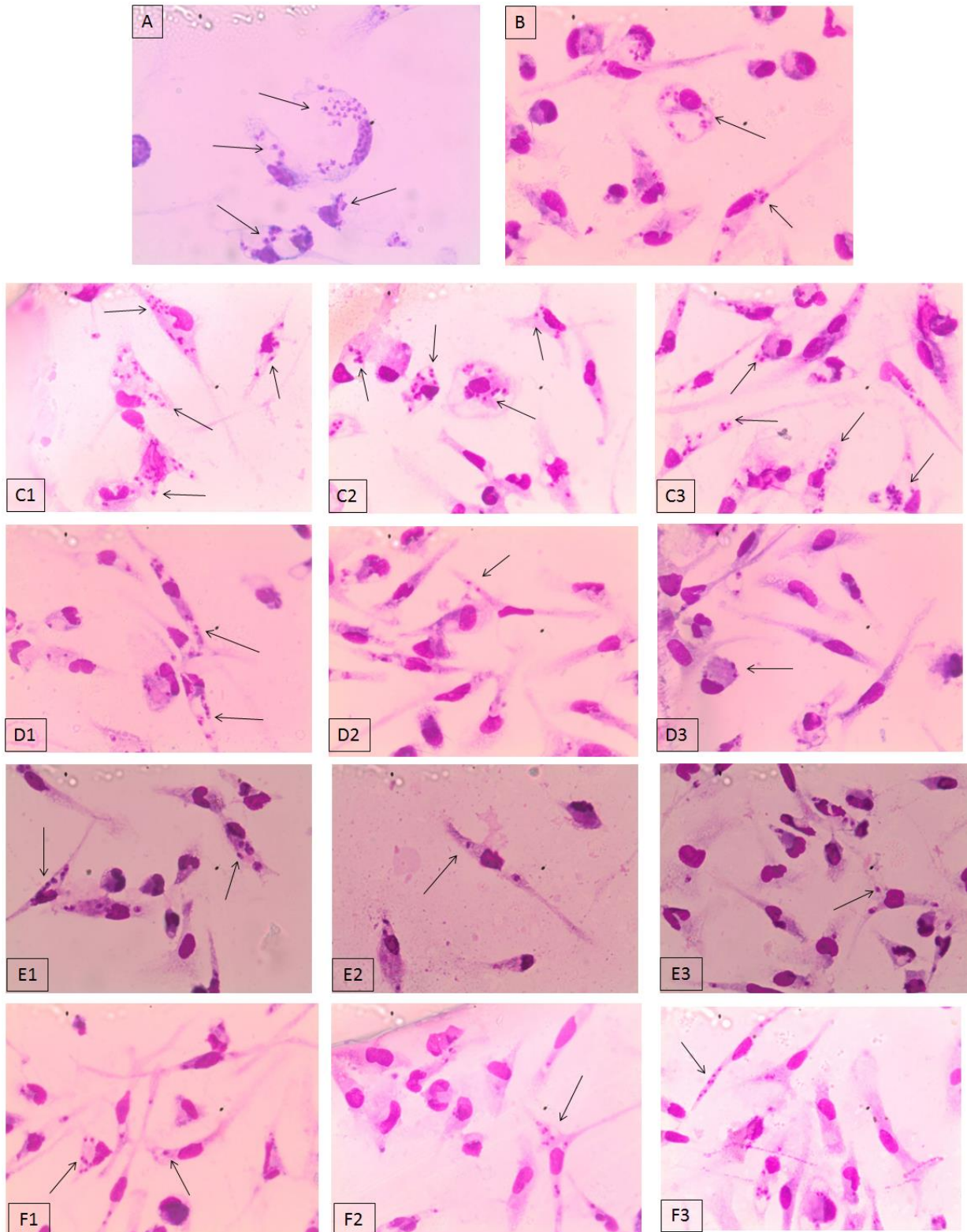
Gráfico 5. Efeito do óleo essencial de *L. sidoides*, Timol, lipossomas vazios, LIPO-LS e da Anf B como fármaco de referência para avaliar a infecção de macrófagos murinos por *Leishmania major*.



Legenda: Percentual de macrófagos infectados, considerando o controle negativo (C) como 100% de infecção; Anfotericina B: controle positivo; OELS: óleo essencial de *L. sidoides*; Timol: constituinte do óleo essencial de *L. sidoides*; LIPO-LS: óleo essencial de *L. sidoides* nanocarreado em lipossoma. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. *One-way* ANOVA foi realizado para comparar os grupos com o controle negativo DMSO 0,2% em meio RPMI 1640 e controle positivo Anfotericina B sendo * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

O percentual de macrófagos infectados por amastigotas de *L. major* foi também avaliado para essas substâncias (gráfico 5). O grupo controle foi considerado como 100% de infecção e apresentou diferença estatística de todos os demais. A Anf B reduziu a infecção para aproximadamente 65%, similar à apresentada pelas demais substâncias, com exceção dos lipossomas vazios que apresentaram em média mais de 80% de infecção. Tanto essa redução da infecção quando da infectividade apresentada por essas substâncias podem ser visualizadas na figura 1.

Figura 1. Macrófagos experimentalmente infectados por *L. major* (A). Anfotericina B foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,2 (B). O tratamento foi realizado com lipossomas vazios 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C1), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C2) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C3); OE L. sidoides 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D1), 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D2) e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (D3); Timol 6,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E1), 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E2) e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (E3); LIPO-LS 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F1), 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F2) e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (F3). As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento 1000x.



Portanto, a reduzida citotoxicidade das nanopartículas lipídicas carregadas com OE de *L. sidoides* desenvolvidas no presente estudo contra macrófagos não se traduziu na falta de capacidade do fármaco para atingir os parasitas dentro dos macrófagos. De fato, a LIPO-LS foi capaz de reduzir a toxicidade a células de mamíferos, como já foi observado para a nanopartículas lipídicas contendo miltefosina (BITENCOURT et al., 2016), microemulsão óleo-em-água carregada com anfotericina B (SILVA et al., 2013) e lipossomas contendo antimoniato de meglumina (BORBOREMA et al., 2011). Tais sistemas constituem uma estratégia para melhorar o tratamento da leishmaniose, juntamente com a descoberta de novos fármacos e a combinação de fármacos existentes.

6.4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham apresentou atividade antileishmania dependente de concentração contra as formas promastigotas e amastigotas internalizadas de *Leishmania major*, com baixa toxicidade para macrófagos peritoneais murinos, e não foi tóxico para eritrócitos de carneiro. Os lipossomas potencializaram a atividade antileishmania do OE contra as formas promastigotas e amastigotas internalizadas de *L. major* reduzindo o índice de infecção e infectividade das células murinas e não apresentou citotoxicidade. Portanto, a formulação LIPO-LS é uma promissora alternativa para o tratamento da leishmaniose. Porém, devem ser realizados mais testes *in vivo* para obtenção de um medicamento fitoterápico com segurança e eficácia comprovadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE T, HAILU A, WOLDEYES M, MEKONEN W, BILCHA K, CLOKE T, et al. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in ethiopia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.6, p.1–10, 2012.
- AULNER, N; DANCKAERT, A; ROUAULT-HARDOIN, E; DESRIVOT, J; HELYNCK, O; COMMERE, P. H; MUNIER-LEHMANN, H; SPÄTH, G.F; SHORTE, S.L; MILON, G; PRINA, E. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery, **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013. e2154.
- BHATIA, A.R.K., KATARE, O.P. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 252–259, 2004.
- BITENCOURT, J.J.G; PAZIN, W.M; ITO, A.S; BARIONI, B.M.B; PINTO, C.P; SANTOS, M.A; GUIMARÃES, T.H.S; SANTOS, M.R.M; VALDUGA, C.J. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: Improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythrocytes and its cytotoxic effect on macrophages. **Biophysical Chemistry**, v. 217, p. 20–31, 2016.
- BORBOREMA, S.E.; SCHWENDENER, R.A; OSSO JR. J.A., ANDRADE JR. H.F; NASCIMENTO, N. Uptake and antileishmanial activity of meglumine antimoniate-containing liposomes in *Leishmania* (Leishmania) major-infected macrophages, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 341–347, 2011.
- CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A.; SANTANA, L. C. L. R.; SOUSA A. P. L.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.
- EISSA, M.M; EL-MOSLEMANY, R.M; RAMADAN, A.A; AMER, E.I; EL-AZZOUNI, M.Z; EL- KHORDAGUI, L.K. Miltefosine lipid nanocapsules for single dose oral treatment of schistosomiasis mansoni: a preclinical study. **PLoS One**, v. 10, n.11, 2015. e0141788.
- FARIAS-JUNIOR, P.A., RIOS, M.C., MOURA, T.A., ALMEIDA, R.P., ALVES, P.B., BLANK, A.F., FERNANDES, R.P.M., SCHER, R. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biological Research**, v.45, p.399–402, 2012.
- FILIPPIN, F. B., SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.
- GHYCZY, M., GAREISS, J. Liposomes from vegetable phosphatidylcholin: their production and effects on the skin. **Cosmetics & Toiletries**. 109, 75–81. 1994.
- KALAT, S. A. M.; KHAMESIPOUR, A; BAVARSAD, N; FALLAH, M; KHASHAYARMANESH, Z; FEIZI, E; NEGhabi, K; ABBASI, A; JAAFARI, M. R. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of *L. major* lesion in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 5–10, 2014.
- KAUFMANN-KOLLE, P; DREVS, J; BERGER, M.R; KÖTTING, J; MARSCHNER, N; UNGER, C; EIBL, H. Pharmacokinetic behavior and antineoplastic activity of liposomal hexadecylphosphocholine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 393–398, 1994.

- LÖFGREN, S. E.; MILETTI, L. C.; STEINDE, M. L.; BACHÉRE D. E.; BARRACO, M. A. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental parasitology**, v. 118, p. 197-202, 2008.
- LOOSDRECHT, V.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H. J.; LANGENHUIJSEN, M. M. A. C. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **The Journal of Immunological Methods**, v. 141, p. 15-22, 1991.
- MEDEIROS, M. G. F.; SILVA, A. C.; BORGES, A. R.; LIMA, S. G.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.60, p.237–241, 2011.
- NICOLETTI, S.; SEIFERT, K.; GILBERT, I. H. Water-soluble polymer–drug conjugates for combination chemotherapy against visceral leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.2559–2565, 2010.
- NOGUEIRA, I. A. L.; LEAO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeito Citotoxico do *Synadeniumum bellatum*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p.50-53, 2007.
- OSORIO, E; ARANGO, G. J; JIMÉNEZ, N; ALZATE F; RUIZ, G; GUTIÉRREZ, D; PACO, M. A; GIMÉNEZ, A; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and citotoxic activities in vitro of colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-5, 2007.
- PATEL, H.M., MOGHIMI, S.M. Liposomes and Skin Permeability Barrier. **Harwood Academic Publisher**, Langhorne, PA. 1993.
- PINTO, N.O.F; RODRIGUES, T.H.S; PEREIRA, R.C.A; SILVA, L.M.A. et al., Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Industrial Crops and Products**, v.86, p.279–288, 2016
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p.250–264, 2014.
- RODRIGUE, K. A. S. **Determinação das atividades anti-leishmania, citotóxica e de parâmetros de ativação de macrófagos dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* L. e *Syzygium cumini* (L.) skeels**. 2013. Universidade Federal do Piauí.
- RONDON, F. C. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ACCIOLY, M. P.; MORAIS, S. M.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; CARVALHO, C. A.; LIMA, J. C.; MAGALHÃES, H. C. R. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n. 3, p.185-191, 2012.
- SABUR, A.; ASAD, M.; Ali, N. Lipid based delivery and immuno-stimulatory systems: Master tools to combat leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 55-60, 2016.
- SEBAALY, C.; JRAIJ, A.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C.; GREIGE-GERGES, H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food Chemistry**, v. 178, p.52–62, 2015.

SILVA, A.E; BARRATT, G; CHÉRON, M; EGITO, E.S.T. Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 641–648, 2013.

SOARES, C. D.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, A. A.; SARAIVA, E. A. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernae montana atharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

WEN, Z.; LIU, B.; ZHENG, Z.; YOU, X.; PU, Y.; LI, Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. **Chemical Engineering Research and Design**, v.88, p.1102–1107, 2010.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso: 29 maio. 2016.

7. PERSPECTIVAS

- Dar continuidade aos testes de estabilidade acelerada e longa duração com a LIPO-LS.
- Validação da metodologia analítica adotada para quantificação por CG-EM.
- Prosseguir com os testes antileishmania em protocolos experimentais *in vivo*.
- Esclarecer o possível mecanismo de inibição das leishmanias pela LIPO-LS.
- Realização de estudos de liberação do fármaco *in vitro*.
- Depósito de patente reivindicando o direito de prioridade sobre a formulação desenvolvida LIPO-LS.

APÊNDICES



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

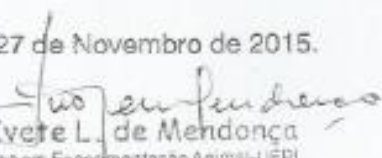


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de lipossomas contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* com potencial atividade Leishmanicida", protocolo nº 090/15, sob a responsabilidade de **HERCÍLIA MARIA LINS ROLIM**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/11/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/ 2015 à Março/ 2017
Espécie/Linhagem	1. Camundongo isogênico/ <i>Balb/c</i> ; 2. Ovino.
Nº de Animais	1. 40 machos e 52 fêmeas; 2. 1 macho.
Peso/ Idade	1. 25 a 30g/ 2 meses; 2. 25 kg/ 1 ano.
Sexo	—/—
Origem	1. Biotério do NPPM/CCS/UFPI; 2. Biotério do Centro de Ciências Agrárias-CCA/UFPI.

Teresina, 27 de Novembro de 2015.


 Prof^a. Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

Apêndice A- CARTA DE ACEITE DO CAPÍTULO 1 PELA REVISTA CUBANA DE FARMÁCIA

Re: Artigo: O uso de lipossomas na terapia de doenças tropicais negligenciadas



Manuel Cue

seg 27/06/2016 21:25

Para: Mateus Almeida Macêdo (mateus.macedo@hotmail.com) ↗

Estimado Mateus:

Ya fue aprobado su artículo O uso de lipossomas na terapia de doenças negligenciadas.

Este saldrá publicado en la RCF Vol. 51, No. 1, enero-marzo 2017.

Saludos,

M. Cue

From: Mateus Almeida Macêdo

Sent: Monday, June 27, 2016 2:57 PM

To: Manuel Cue

Subject: Re: Artigo: O uso de lipossomas na terapia de doenças tropicais negligenciadas