

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo um derivado sintético de chalcona visando ao tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana**

**CRISTIANE BASTOS DE MATTOS**

**PORTO ALEGRE, 2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo um derivado sintético de chalcona visando ao tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana**

Dissertação apresentada por **Cristiane Bastos de Mattos** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Letícia Scherer Koester

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.03.2010 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Martin Steppe  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Mattos, Cristiane Bastos

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo um derivado sintético de chalcona visando ao tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana / Cristiane Bastos Mattos. -- 2011.  
165 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. leishmaniose. 2. chalcona. 3. nanoemulsão. 4. validação. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) e Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS



Aos meus pais.





## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Letícia Scherer Koester, pela oportunidade, profissionalismo, sabedoria e dedicação com que orientou esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Helder Teixeira, pela orientação durante um curto período, convívio e ensinamentos.

Aos professores e funcionários desta universidade que contribuíram para minha formação e, conseqüentemente, para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do LDG Alexandre, Bárbara, Daiane, Francini, Juliana C., Laura, Liege, Lílian, Lísias, Mariana, Paula, Pedro, Renata, Samuel, Sheron, Simone, Thiago, Ueiler, Vanessa e Vinícius. Obrigada pela amizade, companheirismo, ótima convivência, apoio e ajuda constante.

E principalmente aos amigos Débora, Fabrício, Regina, e Juliana B. que disponibilizaram o seu tempo para contribuir com o desenvolvimento deste trabalho.

À incansável bolsista Vânia, pela disponibilidade em todos os experimentos e pelas conversas.

Aos meus sogros, Luiz Carlos e Loiva, pelo incentivo constante.

Ao Rafael, por estar ao meu lado nessa etapa tão importante da minha vida, pelo incentivo constante e apoio.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Zulema, pela formação que me proporcionaram, pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos. Vocês sempre serão a grande inspiração da minha vida.

Às minhas irmãs e amigas, Cíntia e Patrícia, pelo apoio incondicional, pela força e por sempre acreditar que eu conseguiria realizar qualquer obstáculo.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, órgão financiador da bolsa de estudos recebida durante a realização deste trabalho.



## RESUMO

A leishmaniose tem sido considerada pela Organização Mundial de Saúde como a terceira doença parasitária mais importante, e devido à toxicidade dos fármacos utilizados no atual tratamento, novos sistemas de liberação de fármacos estão sendo desenvolvidos. Entre os compostos estudados, uma série de derivados sintéticos de chalconas foi testada contra a *Leishmania braziliensis*, agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e a 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida apresentou maior atividade leishmanicida sendo descrita como molécula promissora no tratamento da LTA. Levando-se em consideração as potencialidades das nanoemulsões para a administração tópica de compostos de baixa hidrossolubilidade, o presente trabalho teve por objetivo investigar a veiculação da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida em nanoemulsões de uso tópico, visando ao tratamento da LTA. Primeiramente, foi realizada a caracterização físico-química da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida a fim de garantir sua identidade e pureza. Em um segundo momento, foi desenvolvido e validado um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência, e realizado um estudo de cinética de degradação frente à luz e hidrólise básica. O método mostrou-se linear, preciso, exato, específico, robusto e capaz de separar o produto de degradação formado quando a 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida foi exposta à radiação UV. O estudo de cinética de degradação apresentou reação de segunda ordem, em ambas as condições experimentais. Por fim, foi realizado o estudo de desenvolvimento de um sistema nanoemulsionado, em que as formulações foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea. Formulações preliminares foram preparadas através de alterações na concentração da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida e tensoativos a fim de selecionar a(s) nanoemulsão(ões) as mais promissoras. As formulações selecionadas compostas por lecitina de soja, vitamina E, misturas de TCM:ricino ou TCM:soja como núcleo oleoso, apresentaram tamanho de gotícula de 98,5 e 156,0 nm, o que foi confirmado pela análise da microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta de -36,2 e -37,0 mV, viscosidade de 0,95 e 1,72 cp e pH 4,98 e 5,2, respectivamente.

**Palavras-chave:** leishmaniose, chalcona, validação, nanoemulsão.



## ABSTRACT

Leishmaniasis has been considered by the World Health Organization as the third most important parasitic disease, and due to the toxicity of drugs used in current treatment, new drug delivery systems are being developed. From the compounds studied, a series of chalcones synthetic derivatives has been tested against *Leishmania braziliensis*, the etiological agent of American cutaneous leishmaniasis (ACL), and the 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide presented the highest leishmanicidal activity, being described as a promising molecule for the treatment of ACL. Taking into consideration the nanoemulsion's potential for the topical delivery of low water soluble compounds, this study aimed to investigate the encapsulation of 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide in topical nanoemulsions, in view to treat ACL. Firstly, we performed a physical-chemical characterization of the 5 - (2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide in order to ensure its identity and purity. In a second set of experiments, a stability indicating method was developed and validated by high performance liquid chromatography, and a study of degradation kinetics under light and basic hydrolysis was performed. The method was linear, precise, accurate, specific, robust and able to separate the degradation product formed when the 5 - (2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide was exposed to UV radiation. The degradation kinetics study showed a second-order reaction in both experimental conditions. Finally, a nanoemulsion development study was performed, in which the formulations were prepared by spontaneous emulsification. Preliminary formulations were prepared by altering the concentration of 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide and surfactants in order to select the most promising nanoemulsion(s). The selected formulations, composed by soybean lecithin, vitamin E and of MCT: castor oil mixtures or MCT: soybean oil with oil core, presented droplet size of 98.5 and 156.0 nm, which was confirmed by the transmission electron microscopy analysis, zeta potential of -36.2 and -37.0 mV, viscosity of 0.95 and 1.72 cP, pH 4.98 and 5.23, respectively.

**Keywords:** leishmaniasis, chalcone, validation, nanoemulsion.



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1.	Lesão cutânea da LTA.....	12
Figura 2.	Formas promastigotas e amastigotas de <i>L. braziliensis</i> .....	14
Figura 3.	Ciclo biológico da LTA.....	15
Figura 4.	Distribuição da LTA no Brasil.....	18
Figura 5.	Estrutura química das chalconas.....	28
Figura 6.	Estrutura química da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	36

### Capítulo II

Figura 1.	Imagem em microscópio óptico da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	72
Figura 2.	Espectro de absorção no UV da em metanol, meio ácido e meio básico.....	73
Figura 3.	Espectro da absorção na região do IV da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	74
Figura 4.	Espectro do RMN <sup>1</sup> H em CDCl <sub>3</sub> da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	78
Figura 5.	Estrutura química da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida e respectivas atribuições de espectro de RMN <sup>1</sup> H em CDCl <sub>3</sub> .....	79
Figura 6.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	79
Figura 7.	Difratograma de raio-X da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	80
Figura 8.	Curva de aquecimento do DSC para 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	82

### Capítulo III

Figura 1.	Chemical structure of 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide.....	93
Figura 2.	Representative chromatograms of specificity study.....	101
Figura 3.	Chromatograms of the 5 - (2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide degradation in the absence and presence of 254 nm UVC radiation.....	102
Figura 4.	Plots of concentration (zero-order reaction), log of concentration (first-order reaction) and reciprocal of concentration (second-order reaction) of remaining 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide <i>versus</i> time.....	108

### Capítulo IV

Figura 1.	Chemical structure of 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide.....	122
Figura 2.	Solubility of 5 - (2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide in different oils.....	128
Figura 3.	Transmission electronic microscopy images of the nanoemulsions.....	131
Figura 4.	Plots of concentration (zero-order reaction) [A], log of concentration (first-order reaction) [B] and reciprocal of concentration [C] (second-order reaction) of remaining 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide <i>versus</i> time in photodegradation.....	134



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

Tabela 1.	Máximos de absorção da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida no espectro de UV.....	73
Tabela 2.	Atribuição das principais bandas do espectro de IV da 5-(2-Benzoiletênica)- N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	75
Tabela 3.	Atribuições do espectro de RMN <sup>1</sup> H da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	78
Tabela 4.	Intensidades relativas nos diferentes ângulos para difração de raios X da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida.....	81

### Capítulo III

Table 1.	Recovery of the 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide in nanoemulsion.....	103
Table 2.	Results from the inter- and intra-day precision of the 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide assay in nanoemulsions.....	104
Table 3.	Results of the robustness test of the chromatography method for 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide determination.....	105
Table 4.	Results of the residual concentration of 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide after photodegradation in the methanolic solution and in the nanoemulsion, using the LC method.....	106

Table 5.	Results of the residual concentration of 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide after basic degradation in the metanolic solution and in the nanoemulsion, using the LC method.....	107
Table 6.	Degradation rate constant ( <i>k</i> ) and <i>t</i> <sub>90</sub> for 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide after photodegradation and basic degradation determined by the LC method.....	109

#### Capítulo IV

Table 1.	Nanoemulsions composition (% w/w) and nanoemulsions content.....	128
Table 2.	Physicochemical properties of blank and 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide-loaded nanoemulsions.....	130
Table 3.	Results of the residual concentration of 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide after photodegradation in the metanolic solution and in the nanoemulsion, using the LC method.....	133
Table 4	Degradation rate constant ( <i>k</i> ) and <i>t</i> <sub>90</sub> for 5-(2-Benzoylethenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide after photodegradation determined by the LC method.....	134

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b> .....	1
<b>Objetivos</b> .....	7
<b>Capítulo I – Revisão da Literatura</b> .....	9
Leishmaniose.....	11
Chalconas.....	28
Nanoemulsões.....	37
Referências.....	45
<b>Capítulo II - Caracterização da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida como matéria prima</b> .....	63
Introdução.....	67
Objetivos.....	69
Materiais e Métodos.....	70
Resultados e Discussão.....	72
Conclusão.....	82
Referências.....	83
<b>Capítulo III - Desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade por HPLC e estudo de cinética de degradação da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida</b> .....	85
<b>Publicação 1:</b> Development of a stability-indicating LC method for determination of a synthetic chalcone derivative in a nanoemulsion dosage form.....	89
<b>Capítulo IV - Desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico contendo 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida para tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana</b> .....	113
<b>Publicação 2:</b> Development and characterization of a nanoemulsion containing a synthetic derivative of chalcone intended to the treatment of cutaneous leishmaniasis.....	117
<b>Conclusões gerais</b> .....	143



## **INTRODUÇÃO**

---



As leishmanioses são infecções parasitárias causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* que ocorrem em inúmeras espécies animais. Tem sido considerada pela Organização Mundial de Saúde como a terceira doença parasitária mais importante visto que há uma prevalência global de 12 milhões de pessoas infectadas e de 350 milhões vivendo em área de risco, afetando populações de 88 países, sendo que desses, 76 são países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (ANVISA, 2009; WHO, 2009). A doença manifesta-se de formas distintas, mas o presente trabalho dará ênfase à Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), em que o paciente pode apresentar lesões cutâneas ulcerosas.

Os fármacos utilizados no atual tratamento das leishmanioses apresentam toxicidade, podem manifestar resistência e, eventualmente, não promover a cura da doença. Estudos recentes mostraram que fármacos administrados pelas vias oral ou tópica, apresentam resultados encorajadores, embora sejam necessários testes clínicos adicionais (BASANO; CAMARGO, 2004).

Estudos recentes mostraram que compostos derivados de plantas consistem em uma alternativa de tratamento para as leishmanioses, podendo apresentar melhor eficácia e adesão dos pacientes (WENIGER et al., 2001; ROCHA et al., 2005). Entre esses compostos, as chalconas têm sido descritas como moléculas promissoras no tratamento dessa zoonose, visto que apresentam potencial farmacológico e estão presentes em uma variedade de espécies de plantas (TORRES-SANTOS et al., 1999b ; KAYSER; KIDERLEN, 2001; NIELSEN et al., 2004; NI et al., 2004; ROCHA et al., 2005; BOECK et al., 2006; NOWAKOWSKA, 2007; ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2009).

Andrighetti-Fröhner e cols. (2009) investigaram o efeito leishmanicida de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona. O composto 5-(2-benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida foi o mais ativo contra as formas parasitárias de *Leishmania braziliensis*, o principal agente etiológico da LTA, inclusive sendo 5,6 vezes mais ativo que um dos fármacos usados no tratamento desta parasitose, o isotianato de pentamidina.

Devido a sua baixa hidrossolubilidade e biodisponibilidade, as chalconas impõem dificuldades para o desenvolvimento de formas farmacêuticas, tornando necessária a administração de doses extremamente altas (NIELSEN et al, 2004). Dessa forma, novos sistemas de liberação de fármacos vem sendo investigados visando reduzir a toxicidade e aumentar a atividade de compostos leishmanicidas, com consequente diminuição da dose e frequência de administração (PINERO et al., 2006; SAMPAIO et al., 2009).

A incorporação de compostos lipofílicos em nanoemulsões pode conduzir a um aumento na taxa de penetração dos mesmos através da pele, intensificando o efeito tópico. Esses sistemas agem como carreadores e liberadores de substâncias de reduzida hidrossolubilidade, que podem estar associadas às gotículas oleosas de tamanho nanométrico e/ou à interface do sistema (WASHINGTON, 1996; TROTTA et al., 2002; SONNEVILLE–AUBRUN et al., 2004). O aumento na taxa de penetração é atribuído ao prolongamento do tempo de permanência nas camadas superiores da pele, à maior área de superfície de contato e à baixa tensão superficial das gotículas de óleo (KLANG; BENITA, 1998; BENITA, 1999).

Levando-se em consideração a potencialidade destes sistemas para a administração tópica de compostos de baixa hidrossolubilidade, como as chalconas, o presente trabalho teve por objetivo investigar a veiculação da 5-(2-Benzoiletênila)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida em nanoemulsões de uso tópico, visando ao tratamento da LTA.



Esta dissertação está estruturada em quatro capítulos como segue:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo os principais aspectos tratados ao longo do trabalho, leishmaniose, chalconas e nanoemulsões;
- O capítulo II apresenta a caracterização físico-química da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida, visando garantir a qualidade da matéria-prima utilizada nos estudos posteriores de formulações;
- O capítulo III apresenta os resultados experimentais relativos à validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida visando à determinação da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida nas formulações desenvolvidas, e no estudo de cinética de degradação;
- O capítulo IV apresenta o estudo de formulação, o efeito da composição do núcleo oleoso sobre as propriedades físico-químicas, o teste de citotoxicidade e a cinética de degradação das nanoemulsões frente à luz.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Investigar a viabilidade de veiculação da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida em nanoemulsões de uso tópico, por meio do emprego da técnica de emulsificação espontânea.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar as propriedades físico-químicas da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida;
- Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade por CLAE para identificação da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida em nanoemulsões;
- Realizar estudos de cinética de degradação da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida incorporada ou não em nanoemulsões;
- Realizar o desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico contendo 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida para tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana;
- Realizar estudos de cinética de proteção da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida incorporada ou não em nanoemulsões, frente à luz ambiente;
- Avaliar a citotoxicidade da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida incorporada ou não em nanoemulsões, frente a células J774-A1.



**Capítulo I**  
Revisão Bibliográfica

---



## *Leishmaniose*

As leishmanioses são infecções parasitárias que ocorrem em inúmeras espécies animais, incluindo o homem, sendo causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Estima-se uma prevalência global de 12 milhões de pessoas infectadas e de 350 milhões vivendo em área de risco, afetando populações de 88 países, sendo que desses, 76 são países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Dessa forma, tem sido considerada pela Organização Mundial de Saúde como a terceira doença parasitária mais importante (ANVISA, 2009; WHO, 2009). A incidência anual de novos casos é de 2 milhões de pessoas ao ano. O aumento da incidência da leishmaniose encontra-se associado ao desenvolvimento urbano, às devastações florestais, às mudanças ambientais e às migrações de pessoas para áreas onde a doença é endêmica, além de mudanças na suscetibilidade do hospedeiro humano à infecção, como no caso de imunossupressão e desnutrição (TORRES-SANTOS *et al.*, 1999a; CARVALHO *et al.*, 2000; PATZ *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2005).

Um aumento acentuado nos casos de leishmaniose vem sendo observado nos países industrializados, não endêmicos, devido ao aumento no número de viagens internacionais, nas atividades militares e de imigração na última década, sendo que mais de 50% dos casos de infecção relatados ocorreram depois de 2000. A doença pode passar despercebida, em virtude da falta de conhecimento dos médicos, de países não endêmicos, e do fato de que em muitos casos de leishmaniose cutânea pode ocorrer a cura espontânea da ferida. A incidência de leishmaniose em viajantes internacionais tende a aumentar nos próximos anos, devido à crescente popularidade das viagens e ecoturismo em regiões endêmicas, bem como pelas operações militares e imigração (PAVLI, 2010).

A doença manifesta-se de formas distintas: (1) Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em que o paciente apresenta lesões cutâneas ulcerosas ou não (Fig. 1); (2) Leishmaniose Mucocutânea ou Leishmaniose cutâneo-mucosa, que se caracteriza pelo aparecimento de lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas do nariz,

boca e faringe, e que raramente levam à morte; (3) Leishmaniose cutâneo-difusa, forma disseminada cutânea, não ulcerosa, que se apresenta em indivíduos anérgicos (que não respondem aos antígenos do parasito), ou que aparece tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados por calazar (REY, 1992); (4) Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, em que os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfóides. Esta última, quando não tratada, ocasiona elevadas taxas de mortalidade (ASHFORD, 2000). No presente trabalho, dar-se-á ênfase à LTA, também conhecida como Úlcera de Bauru.



**Figura 1.** Lesão característica de Leishmaniose Tegumentar Americana.

#### *Leishmaniose Tegumentar Americana*

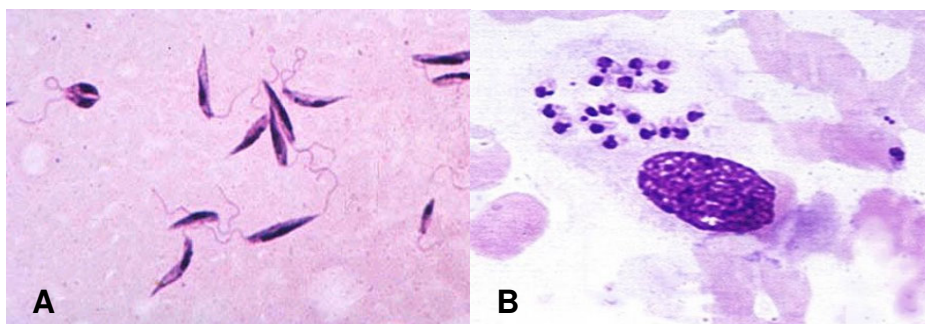
A LTA é considerada uma enfermidade polimórfica da pele e das mucosas. As principais manifestações observadas podem ser classificadas de acordo com os aspectos clínicos, patológicos e imunológicos. As primeiras descrições clínicas datam do século XVI e era referida como uma doença que destruía o nariz e as cavidades bucais. No Brasil, era conhecida desde 1855, e em 1908, ocorreram numerosos casos, na cidade de Bauru (SP), durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, ficando assim conhecida como Úlcera de Bauru. Já o parasita foi denominado como *Leishmania braziliensis* por Gaspar Vianna em 1911 (NEVES, 2005).



O agente etiológico responsável pela ocorrência da doença, principalmente da forma cutânea (LTA), é a *Leishmania braziliensis* (RATH et al., 2003). Trata-se de um protozoário digenético que tem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. O primeiro inclui uma grande variedade de mamíferos, entre eles o homem, enquanto que os invertebrados são pequenos insetos pertencentes à ordem *Díptera*, família *Psychodidae*, sub-família *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (BASANO; CAMARGO, 2004).

De acordo com Carvalho e colaboradores (2000), este parasito apresenta-se obrigatoriamente na forma intracelular durante sua multiplicação no hospedeiro. Os protozoários apresentam três formas básicas durante seu ciclo evolutivo: promastigotas, amastigotas e paramastigotas. As promastigotas são formas alongadas, flageladas e móveis, que vivem no tubo digestivo do inseto vetor. O tamanho dessa forma é variável, medindo entre 16,0-40,0  $\mu\text{m}$  de comprimento x 1,5-3,0 de largura, o citoplasma apresenta pequenos vacúolos e o núcleo situa-se na região anterior. (Fig. 2, A). Já as amastigotas são formas arredondadas, sem flagelo e que infectam células do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado. O tamanho, relativamente pequeno, varia de acordo com a espécie, medindo entre 1,5-3,0 x 3,0-6,5  $\mu\text{m}$ ; no citoplasma encontram-se vacúolos, o núcleo esférico disposto em um dos lados da célula, e o cinetoplasto na forma de bastão situado próximo ao núcleo (Fig. 2, B). As formas paramastigotas são ovais com cinetoplasto margeando o núcleo e um pequeno flagelo livre. Seu tamanho varia entre 5,0-10,0 x 4,0-6,0  $\mu\text{m}$ , e são encontradas aderidas ao epitélio do trato digestivo do vetor pelo flagelo.

O processo de reprodução é feito por divisão binária. Nas formas promastigotas ocorre a produção de um segundo flagelo e o núcleo divide-se em dois. O cinetoplasto fende-se e o corpo do parasito separa-se longitudinalmente pela região anterior. Em formas amastigotas, a reprodução ocorre no interior dos fagossomas de macrófagos de forma semelhante a das promastigotas (NEVES, 2005).



**Figura 2.** Formas promastigotas (A) e amastigotas (B) de *L. braziliensis* (Fonte: SAE, 2009)

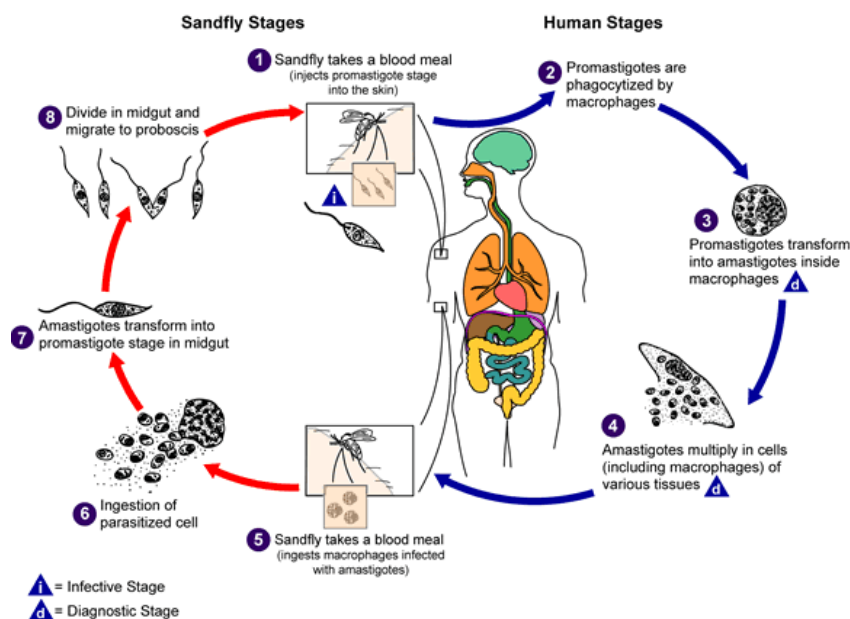
### *Ciclo Biológico*

O vetor, ao exercer o hematofagismo, inocula as formas promastigotas que dentro de quatro a oito horas são interiorizados pelos macrófagos do hospedeiro vertebrado através de receptores específicos. A saliva do flebotomíneo possui neuropeptídeos vasodilatadores que atuam facilitando a alimentação do inseto e, ao mesmo tempo, imunossuprimindo a resposta do hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas transformam-se, após algumas horas, em formas amastigotas, que estão adaptadas ao novo meio fisiológico e resistem à ação destruidora dos lisossomas. Começa, então, a multiplicação por divisão binária, e no momento em que a célula hospedeira está densamente parasitada, ocorre o rompimento de sua membrana e as formas amastigotas disseminam-se pelos tecidos, infectando novos macrófagos, o que agrava o quadro de infecção (RATH et al., 2003; BASANO; CAMARGO, 2004).

Ao sugar o sangue de mamíferos infectados, as fêmeas dos mosquitos ingerem macrófagos parasitados pelas formas amastigotas da *leishmania*. No trato digestivo, ocorre o rompimento dos macrófagos e a liberação das amastigotas que se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. Essa diferenciação ocorre em aproximadamente quatro dias, e as formas promastigotas dirigem-se para o intestino, onde se transformam em paramastigotas, as quais colonizam o epitélio intestinal ficando aderidas pelo flagelo. O ciclo biológico de transmissão deste

protozoário encerra-se quando as formas paramastigotas diferenciam-se em formas infectantes, promastigotas, e migram através do estômago em direção à faringe do inseto (ALEXANDER et al., 1999; BURCHMORE; BARRETT, 2001; RATH et al., 2003) (Fig. 3). Além das alterações morfológicas, ocorrem transformações bioquímicas, entre elas a variação do tamanho das porções glicídicas da molécula de lipofosfglicano (LPG) ancoradas na superfície das membranas das promastigotas. Esse processo denomina-se metaciclo gênese, em que as promastigotas que migram para a parte anterior do tubo digestivo do vetor atingem um estágio infectivo (NEVES, 2005).

Na área onde ocorreu a inoculação do parasito pela picada do inseto, observam-se modificações histológicas que produzem localmente uma reação inflamatória caracterizada por hiperplasia e hipertrofia histiocitária, aparecendo em cortes histológicos como áreas claras da derme (clareiras de Montenegro); edema e infiltração celular, representados por grande número de linfócitos e plasmócitos, dispostos em torno dos focos de proliferação histiocitária; e hiperplasia do epitélio que recobre a zona inflamada, formando cordões que penetram profundamente na derme. Pode ainda haver hiperqueratose, que se caracteriza pelo espessamento da camada córnea.



**Figura 3.** Ciclo biológico da Leishmaniose Tegumentar Americana. (Fonte: DPDx, 2009)

No início, o número de parasitos é considerável. Posteriormente, ocorre a completa regressão das manifestações cutâneas, ou uma discreta progressão sem ulceração. Em outros casos, a inflamação cutânea progride para a necrose, formando-se uma úlcera de bordos salientes e endurecidos. Removido o material necrótico que o recobre, o fundo da úlcera mostra-se granuloso e limpo. A úlcera leishmaniótica caracteriza-se por sua tendência à cronicidade e a uma lenta evolução, tanto na expansão, como na regressão, mesmo sem tratamento. A cicatrização pode ocorrer em um prazo de seis a quinze meses. Nas lesões não ulcerosas, quando predominam os processos de hiperplasia da epiderme, observa-se um crescimento verrucoso da pele na região afetada (NEVES, 2005; REY, 1992).

Durante a picada, os flebotomíneos provocam lesões na derme, onde as formas promastigotas encontrarão diversas substâncias, como proteínas do soro, saliva e fluidos digestivos do inseto. Quanto aos elementos sorológicos do hospedeiro, destacam-se as proteínas do complemento, os anticorpos (IgG), e a fibronectina. A saliva contribui na infecciosidade por meio de substância vasodilatadora (Maxidilan). Esse imunossupressor parece inibir a apresentação de antígenos de *Leishmania* pelos macrófagos. Além disso, exerce um papel de imunomodulador da resposta imune, inibindo a secreção de citocinas tipo I (IL12 e INF $\gamma$ ) (CORWARE et al., 2010). Desta forma, citocinas tipo II (IL4 e IL10) agem suprimindo a resposta imune celular favorecendo a infecção. Os anticorpos da classe IgG e as fibronectinas participam do processo de adesão das formas promastigotas infectantes ao macrófago por meio de receptores para IgG (NEVES, 2005).

Quando a *leishmania* é introduzida pela primeira vez na pele do hospedeiro não imune, ocorre a proliferação de células histiocitárias e a fagocitose dos flagelados por esses macrófagos teciduais que, além de não destruírem os parasitos, ainda permitem sua multiplicação no interior dos vacúolos digestivos. Nessa etapa, o crescimento numérico das *leishmanias* continua até que uma infiltração de linfócitos e plasmócitos apareça no local. Os macrófagos deixam de se proliferar como anteriormente,

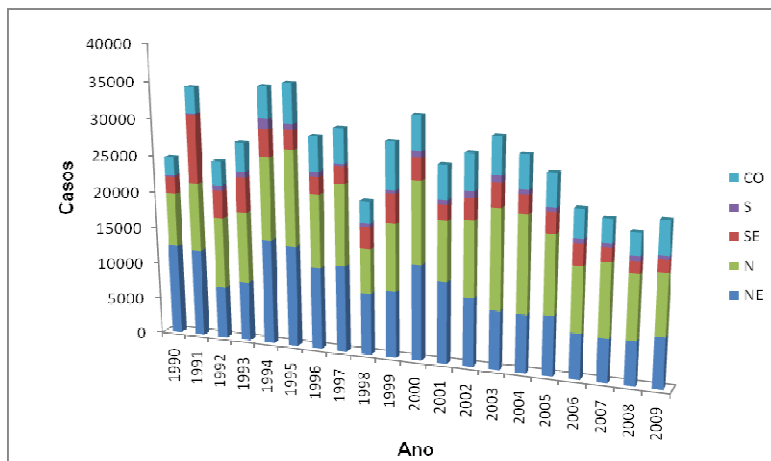
diminuindo assim sua população. Dessa forma, diminui o número de parasitos e a reação inflamatória local regride, ocasionando um processo de reparação e cura. A cura espontânea é seguida de imunidade sólida e duradoura em relação à espécie de *Leishmania* que a produziu. O mesmo não ocorre se a lesão for removida cirurgicamente, antes de completar sua evolução (NEVES, 2005).

Já quando o parasito é injetado em indivíduos imunes, nem todos os flagelados são destruídos imediatamente. Isso ocorre na leishmaniose recidiva, em que a área de infiltração que confina com a margem da lesão (aparentemente curada) segue expandindo-se, indicando que a imunidade resultante da cura espontânea das lesões não foi totalmente eficiente. As reações celulares consistem também na expressão de um mecanismo de defesa, porém não tem capacidade de destruir os parasitos, conseguindo reduzi-los em número, mas a reação inflamatória mantém-se (NEVES, 1985).

Na leishmaniose cutânea difusa, em que a infiltração de leucócitos e plasmócitos não desenvolvem sua função protetora, suprimindo ou reduzindo o número de *leishmanias*, o processo tende a se agravar. Na ausência de mecanismos de defesa eficazes, a proliferação de parasitos prossegue sem limite. Ocorre uma hipertrofia e uma hiperplasia do sistema fagocitário mononuclear, que passa a ocupar extensas áreas cutâneas. Além disso, observa-se a falta de uma resposta imune celular pela negatividade da prova de Montenegro (reação observada quando é realizada uma injeção intradérmica de parasitos). Esta prova é positiva quando o paciente desenvolve uma imunidade celular (REY, 1992).

Segundo o Ministério da Saúde (2010), observou-se uma expansão geográfica da LTA no Brasil no período compreendido entre 1990 e 2009, sendo a região Norte a que vem apresentando o maior número de casos (38,04% do total em 2009), seguida das regiões Nordeste (31,78%) e Centro-Oeste (20,65%). Na região Sudeste ocorreu

um decréscimo em casos de LTA, enquanto a região Sul é a que possui os menores índices da doença (2,13%) (Figura 4).



**Figura 4.** Número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil no período de 1990 a 2009 (Fonte: adaptado site Ministério da Saúde).

O controle da LTA é difícil nas vastas áreas florestais do Brasil. O uso, em larga escala, de inseticidas nas florestas tropicais torna-se inviável tanto do ponto de vista econômico quanto biológico, uma vez que causaria a destruição de espécies de pequenos mamíferos (NEVES, 2005).

O desmatamento das florestas para o desenvolvimento da agricultura e pecuária reduz as áreas endêmicas de leishmaniose, mas por outro lado, causa o aparecimento de grande número de casos durante este processo. Em áreas de colonização recente, próximas a florestas, recomenda-se a construção de casas a uma distância mínima de 500 metros da mata, devido à baixa capacidade de vôo dos flebotomíneos (NEVES, 2005).

Em algumas situações é possível evitar a picada dos flebotomíneos através de proteção individual, com a utilização de repelentes e mosquiteiros de malha fina. A solução ideal para o controle de LTA seria a produção de uma vacina. Atualmente, estudos estão sendo conduzidos a fim de aumentar os níveis de proteção e de viabilizar sua utilização em áreas de alto risco (NEVES, 2005).

O diagnóstico clínico pode ser feito com base na característica da lesão associado à anamnese, no qual os dados epidemiológicos são importantes (NEVES, 2005). Realiza-se sem dificuldade, mas necessita de confirmação ou é estabelecido mediante provas de laboratório (VEGA-LOPEZ, 2003).

O diagnóstico laboratorial é realizado através da pesquisa do parasito, e pode ser feito através de exame direto de esfregaços corados, método que consiste na raspagem das lesões cutâneas ulceradas, podendo ser feita a impressão em lâminas de microscopia após corá-las (VEGA-LOPEZ, 2003). Também pode ser realizado o exame histopatológico, em que o fragmento de pele obtido pela biópsia é submetido a técnicas histológicas e exame por parte de um patologista. Cultura pode ser feita através de fragmentos de tecidos ou de aspirados dos bordos da lesão. O método mais indicado consiste no inóculo em animais, em que se inocula via intradérmica, no focinho ou patas de hamsters, um triturado do fragmento com solução fisiológica (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; SING; SIVAKUMAR, 2003; NEVES, 2005).

O diagnóstico imunológico consiste em métodos para a avaliação da resposta celular, sendo o mais utilizado a Reação de Montenegro (intradermorreação de Montenegro), realizado com o antígeno preparado a partir de culturas (VEGA-LOPEZ, 2003). Este consiste em formas promastigotas de *L. braziliensis*, mortas na concentração de 40 µg de N/mL. Injeta-se 0,1 mL do antígeno na face anterior do antebraço. No terceiro dia, é realizada a leitura, e o aparecimento de um nódulo ou pápula eritematosa com base dura indica um resultado positivo (REY, 1992). Outro método é avaliação da resposta humoral, em que é realizada a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), método sorológico mais utilizado, porém como o teste não é espécie-específico, ocorrem reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, dificultando o uso em áreas endêmicas onde ocorrem a doença de Chagas e o Calazar (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; SING; SIVAKUMAR, 2003).

A pesquisa do DNA do parasito, feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), além de sua grande sensibilidade, permite identificar o agente etiológico em nível de gênero a partir do material clínico obtido para os exames parasitológicos convencionais (ABDA, 2011; COELHO, 2010; NEVES, 2005).

Estudos com sistemas de imagens estão sendo desenvolvidos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no início de uma infecção por *Leishmania* e a conseqüente indução e regulação da resposta imune (MILLINGTON et al.; 2010). Entre as técnicas utilizadas destacam-se a bioluminescência, que permite imagens de corpo inteiro de pequenos animais através de fótons emitidos por uma reação enzimática, e a microscopia de fluorescência, que emite luz de um comprimento de onda para excitar uma molécula fluorescente e, em seguida, detectar os fótons emitidos. Embora isso proporcione a oportunidade de visualizar as células e parasitas, com boa resolução, há pouco controle sobre o plano focal. Outro sistema consiste na microscopia confocal que produz imagem em 3 e 4 dimensões com muito mais precisão. Por exemplo, microscopia confocal tem sido usada para fornecer imagens de alta resolução de fagossomos contendo *Leishmania* (FLOHE et al.; 1997). No entanto, a intensidade do laser pode resultar em danos biológicos e fotodegradação de amostras.

Recentemente, foi desenvolvido um modelo de *Leishmania braziliensis* em macaco Rhesus, induzindo lesões cutâneas que afetam a mucosa nasal a fim de elucidar os mecanismos para combater patógenos intracelulares (CAMPOS et al.; 2010).



## ***Tratamento***

O tratamento quimioterápico tem como objetivo eliminar o parasito, propiciando assim a cura do paciente. Entretanto, devido à localização interna do parasito no macrófago, este objetivo torna-se difícil de ser alcançado (ROCHA, 2005).

O uso medicinal de compostos de antimônio era conhecido desde a Antiguidade para diversos fins terapêuticos. Mas somente em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna observou que o tártaro emético  $Sb^{3+}$  era eficaz no tratamento da LTA (VIANNA, 1912). Devido aos efeitos tóxicos e graves efeitos colaterais, esses foram sendo substituídos por compostos estibiados pentavalentes (RATH et al., 2003).

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{5+}$ ) são os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, por provocar rápida regressão das manifestações clínicas e hematológicas, além da eliminação do parasita (RATH et al., 2003; BASANO; CAMARGO, 2004). No Brasil, o antimoniato de metilglucamina é o medicamento de primeira escolha usado no tratamento da leishmaniose. O composto é obtido sinteticamente a partir do ácido antimônico e da N-metil-glucamina. Devido às baixas doses e tratamentos descontínuos, ocorrem falhas na terapia e aumento das formas resistentes dos parasitas (BALÃNA-FOUCE et al., 1998). A OMS preconiza que as doses não podem ultrapassar 20 mg/Kg/dia, devido a sua elevada toxicidade. Após administração, o antimoniato de metilglucamina é rapidamente absorvido e praticamente 90% do antimônio é excretado nas primeiras 48h pelos rins (LIMONGI, 1973), sendo necessária a administração de doses elevadas do fármaco para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e, dessa forma, obter a eficácia do tratamento. Efeitos colaterais como nefrites, distúrbios gastrointestinais, cardiovasculares e respiratórios tem sido observados. Em alguns casos, o medicamento pode levar o paciente ao óbito (MARSDEN, 1985). Além disso, estes compostos apresentam problemas de toxicidade, dificuldade em estabelecer a concentração de antimônio na solução utilizada e requerem administração parenteral (MARSDEN, 1985; FRANCO, 1992; LAGUNA-TORRES *et al.*, 1999). Há indícios que o  $Sb^{3+}$  seja

mais potente do que o  $\text{Sb}^{5+}$  contra formas promastigotas e amastigotas de leishmania, reforçando assim, a hipótese de uma conversão metabólica intramacrofágica do  $\text{Sb}^{5+}$  em  $\text{Sb}^{3+}$ , sendo este último o elemento tóxico às leishmanias no estado intracelular (SERENO; LEMESRE, 1997). Sugere-se que o  $\text{Sb}^{5+}$  possa ser um pró-fármaco, sendo convertido em  $\text{Sb}^{3+}$  após sua administração, e, dessa forma, interfira no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasita, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALÃNA-FOUCE et al., 1998). Além disso, existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, essencial para o desenvolvimento do parasita (BANGS et al., 2001). Miekeley e colaboradores verificaram que após a administração intramuscular de antimoniato de N-metilglucamina, ocorre conversão *in vivo* do composto orgânico estibiado para as formas iônicas  $\text{Sb}^{3+}$  e  $\text{Sb}^{5+}$ . Além disso, observaram a bio-redução do  $\text{Sb}^{5+}$  para sua forma trivalente, corroborando com estudos anteriores.

Um estudo recente selecionou populações *in vitro* de *Leishmania guyanensis* Viannia, *L.V. braziliensis*, *L. L. amazonensis* e *L.L.infantum chagasi* para avaliar a resistência frente ao tartarato de potássio e antimônio (SbIII). Não foram observadas mudanças nos índices de resistência de *L.V. guyanensis* e *L.L. infantum chagasi*. Em contrapartida, houve uma diminuição nesse índice para *L.V. braziliensis* (de 20 a 10 vezes) e *L.L. amazonensis* (de 6 a 3 vezes), no entanto, não apresentaram resistência a anfotericina B e miltefosina. As populações de *L.V. braziliensis*, *L.L. amazonensis* e *L.L. infantum chagasi* também foram resistentes a paromomicina (LIARTE, 2010).

O antimônio pode ser usado também na forma intralesional, visando minimizar os efeitos colaterais sistêmicos. A dose pode variar de 1 a 3 mL, em dias alternados ou semanal, em que é observado o branqueamento da base da lesão. Foram observados como efeitos adversos dor e hiperpigmentação local e apresentou cura na faixa de 68 a 100% da leishmaniose cutânea (FARI et al., 1993).

De acordo com Laguna-Torres (1999), a mefloquina, um potente antimalárico de via oral, de meia-vida prolongada e com efeitos colaterais pouco freqüentes, teve sua eficácia avaliada em uma região endêmica de leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*. Estudo prévio relatou 100% de cura antes de 6 semanas em 16 pacientes infectado pela *L. panamensis* (GÓMEZ et al., 1995). Porém, a administração de mefloquina não se mostrou eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, já que apenas somente um paciente apresentou cicatrização após o tratamento e outro teve progressão no número de lesões. Os demais pacientes obtiveram evolução lenta, porém, as úlceras permaneciam com grande infiltração e sinais de atividade do parasito.

Derivados de quinolina possuem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, anti-HIV, antitumoral e antimalárica. Devido às semelhanças morfológicas e metabólicas entre os parasitas do gênero *Plasmodium* e *Leishmania*, há um interesse no desenvolvimento e investigação de novos agentes quimioterápicos derivados da quinolina contra a *Leishmania sp.* Compostos foram sintetizados a partir da 4,7-dicloroquinolina, triptamina, triptofano metil éster e avaliados para a atividade *in vitro* contra formas promastigotas de quatro espécies diferentes de *Leishmania*. Da série de compostos testados, todos apresentaram boa atividade leishmanicida, sendo maior quando avaliados contra a *L. braziliensis* (COIMBRA et al.; 2010).

Os fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento também apresentam toxicidade, podem manifestar resistência e eventualmente não promover a cura da doença. Um resultado positivo foi obtido com a pentamidina, uma diamidina que se une ao DNA do cinetoplasto do parasito e pode também interferir com o transporte de aminoácidos, competindo com poliaminas pelos ácidos nucléicos. Há relatos na literatura de que duas doses de 4 mg/kg/dia com intervalo de 48h, apresentou 100% de cura na LTA, sem efeitos adversos importantes (NACHER, 2001). No Brasil, o isotianato de pentamidina apresentou eficácia semelhante ao antimoniato de N-

metilglucamina (71,05% e 73,17%, respectivamente), com a vantagem de redução do tempo de tratamento e menor toxicidade cardíaca (PAULA et al., 2003; LIMA et al., 2007). Por outro lado, foram observados efeitos colaterais que são divididos em imediatos e tardios, como hipotensão, náuseas, vômitos e síncope, além dos efeitos sistêmicos no metabolismo da glicose como hipoglicemia (8% dos casos) e efeito diabetogênico (5% dos casos). Entretanto, a alteração renal é a mais freqüente, chegando a 23% (CHAN-BACAB, PENA-RODRIGUEZ, 2001).

A anfotericina B é um antibiótico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada para o tratamento da leishmaniose mucocutânea (RATH et al., 2003). Seu mecanismo de ação está relacionado com a sua ligação aos esteróides da membrana bacteriana. Como a membrana da *leishmania* contém ergosterol, o fármaco reduz a permeabilidade da célula do parasita, com a perda de pequenos cátions, principalmente  $K^+$ , causando a morte celular (ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007).

Trabalhos recentes mostraram que a anfotericina B associada a lipossomas possui vantagens no tratamento da LTA quando comparada com a forma clássica, uma vez que apresentou menor nefrotoxicidade, maior eficácia e tolerabilidade. O macrófago, onde o parasito encontra-se, incorpora o lipossoma, e dessa forma, o antibiótico não reage com o colesterol da membrana celular do hospedeiro e, conseqüentemente, não altera a permeabilidade celular e o equilíbrio iônico (SAMPAIO; MARSDEN, 1997; ROBERTS, 2003; MOTTA, 2006; LIMA et al., 2007).

Esse fármaco possui diversos efeitos colaterais entre o quais se destacam alterações renais em aproximadamente 80% dos pacientes (CHAN-BACAB, PENA-RODRIGUEZ, 2001). A forma lipossomal apresentou-se altamente efetiva para o tratamento da leishmaniose visceral, mas seu custo torna-se alto quando comparado a outros fármacos leishmanicidas (RICHARD; ERBOVETZ, 2010).

Considerando a necessidade de um tratamento não-tóxico e de baixo custo para a leishmaniose cutânea, Corware e colaboradores (2010), sintetizaram e testaram *in vivo* uma anfotericina B-poli (ácido metacrílico), (AmB-PMA), que já havia mostrado atividade *in vitro* contra os parasitas *L. donovani* e *L. major*. Para fins de estudo, a eficácia foi determinada através da infecção por *L. major* em pata de camundongo BALB/c. Houve uma redução de aproximadamente 80% no tamanho das lesões no 35º dia após a infecção em 18 camundongos tratados em comparação com seis controles, sem tratamento, e cura completa das lesões após o 50º dia sem recidiva da lesão em 12 animais tratados. A cura foi associada com diminuição da IL-10 e aumento de IFN- $\gamma$  na pata.

De acordo com Martinez e colaboradores (1992 e 1997), o alopurinol apresenta vantagem no arsenal terapêutico da leishmaniose cutânea e visceral por sua administração oral e baixa toxicidade. Constitui em substrato para enzimas da via da purina e incorpora-se no ácido nucléico do parasito, além de inibir a xantina oxidase e a produção de reativos de oxigênio úteis na eliminação dos parasitos (SAMPAIO et al., 1997b). Porém, mostrou-se eficiente no tratamento da leishmaniose apenas quando associado a antimônios.

A miltefosina, medicamento desenvolvido como antineoplásico na década de 80, apresentou potente ação contra leishmanias durante a avaliação terapêutica. Este fármaco age na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, modulando a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolipídeos, induzindo morte celular por apoptose (COSTA FILHO et al., 2008). Sua administração consiste em doses de 133 a 150 mg/dia durante 4 semanas por via oral, e foram observados índices de cura de 100 e 89%, respectivamente (JHA et al., 1998). Porém, seu uso é limitado pela elevada toxicidade gastrointestinal, teratogenicidade e custos relativamente altos (OLLIARO et al., 2009; BERMAN J. 2006). Foi observada cura parasitológica em 90% de camundongos BALB/c infectados com *L. mexicana* quando 20 mg/kg/dia de miltefosina combinado

com 50 mg/kg/dia de amiodarona foram administrados via oral durante 21 dias (SERRANO-MARTÍN et al., 2009).

A terapia fotodinâmica (TFD) é potencialmente aplicável, segura e tecnologicamente disponível, sendo utilizada para o tratamento de câncer e degeneração macular relacionada com a idade (MONTANARI et al., 2010). A TFD é baseada no conceito de que um composto fotoativo, chamado fotossensibilizador, pode ser ativado por uma luz de comprimento de onda adequado para gerar oxigênios singlete citotóxicos e radicais livres (HANSAN et al., 2006). Tornou-se uma opção para quimioterapia antimicrobiana convencional, uma vez que não provoca resistência. Porém, a falta de dados padronizado e a necessidade de lâmpadas especiais, têm dificultado o uso do TFD contra a leishmaniose cutânea (VAN DER SNOEK et al., 2008).

Montanari e colaboradores (2010) determinaram a atividade leishmanicida *in vitro* de luz fotodinâmica disparando lipossomas Ultradeformáveis (UDL). ZnPc é uma ftalocianina Zn hidrofóbica que apresentou 20% de atividade contra formas promastigotas e antiastigote de *L. braziliensis* (cepa 2903), após 15 min de irradiação solar (15 J/cm<sup>2</sup>). No entanto, quando colocado na UDL como UDL-ZnPc (1,25 mM ZnPc-1 fosfolipídios mM) aumentou a atividade para 100% contra promastigotas e 80% para amastigotas na mesma intensidade de luz. Através de varredura da pele humana em microscópio confocal a laser, demonstrou-se que a administração transcutânea de ZnPc penetrou cerca de 10 vezes mais em UDL-ZnPc em relação à ZnPc carregada em lipossomas convencionais (L-ZnPc). A determinação quantitativa da ZnPc confirmou que a UDL-ZnPc penetrou de forma homogênea no estrato córneo. Prevê-se que os múltiplos efeitos leishmanicida da UDL-ZnPc poderia desempenhar um papel sinérgico na profilaxia ou terapêutica nas fases iniciais da infecção.

Outro tratamento empregado na LTA é a termoterapia, que consiste em três aplicações de calor gerado por radiofrequência (50°C, 30s), com intervalo de sete dias e apresentou cura clínica e parasitológica em 73% dos pacientes. Outro tipo de tratamento é a crioterapia, já que todas as espécies de leishmania são termosensíveis, sendo recomendada para lesões de tamanho inferior a 1 cm. Consiste em duas aplicações de nitrogênio líquido (15-20 s), com intervalo de duas semanas. Este mostrou ser mais eficaz quando associado com antimoniato de N-metilglucamina, apresentando 90% de cura (LIMA *et al.*, 2007).

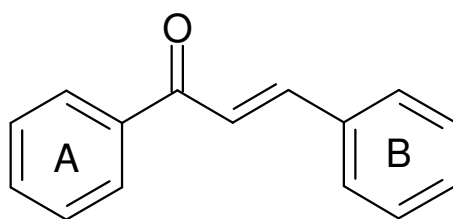
Estudos recentes têm mostrado que fármacos administrados por via oral ou forma tópica apresentam resultados encorajadores, embora sejam necessários testes clínicos adicionais (BASANO; CAMARGO, 2004). Apesar da intensa investigação, sem novas opções para o tratamento clínico de *Leishmania*, com exceção da miltefosina e uma formulação lipossomal de anfotericina B, uma formulação tópica de paramomicina, foi aprovada para uso nos últimos 25 anos (COIMBRA *et al.*; 2010). O uso de produtos tópicos, contendo, por exemplo, paramomicina e imiquimode, associados ou não à medicação parenteral, apresentam resultados satisfatórios, com índice de cura entre 74% a 85%, e 90% respectivamente (AREVALO *et al.*, 2001; DAVIES *et al.*, 2003). Formulação tópica contendo 15% de paramomicina e 0,5% de gentamicina mostrou resultados promissores contra leishmaniose cutânea causada por *L. major* (BEN SALAH *et al.*, 2009). Formulação tópica de sulfato de paramomicina lipossomal apresenta atividade maior contra *L. major* que quando em solução, além de apresentar cura em modelo de BALB/c infectados com *L. major* (JAAFARI *et al.*, 2009).

Um tratamento para LTA de baixo custo, eficaz, simples e de fácil administração ainda é um tema a ser pesquisado (MONTANARI, *et al.*, 2010). O atual tratamento para leishmaniose tem sido insatisfatório devido a sua limitada eficácia, longo prazo, efeitos colaterais e custos onerosos (CROFT; COOMBS, 2003; SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Dessa forma, novas moléculas estão sendo estudadas a fim de se encontrar uma terapia que apresente melhor eficácia e adesão dos pacientes. Estudos recentes mostram que extratos de plantas ou compostos derivados das mesmas consistem em uma alternativa de terapia para essa zoonose (WENIGER et al., 2001; ROCHA et al., 2005). Entre esses compostos, as chalconas têm sido descritas como moléculas promissoras no tratamento da leishmaniose (TORRES-SANTOS et al., 1999b ; KAYSER; KIDERLEN, 2001; ROCHA et al., 2005; ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2009), em especial a forma cutânea (LTA), causada por *Leishmania braziliensis*, uma vez que derivados de diidrochalconas e de sulfonamida 4-methoxichalconas apresentaram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas *in vitro* e *in vivo* (HERMOSO et al., 2003; LUNARDI et al., 2003; ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2009).

### **Chalconas**

Quimicamente, as chalconas (figura 5) podem ser definidas como cetonas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas, onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas a grupamentos aromáticos (RODRIGUES et al., 1998; SIMÕES et al., 2003).



**Figura 5.** Estrutura química das chalconas

As chalconas são compostos estruturalmente simples precursores dos flavonóides e estão presentes em uma variedade de espécies de plantas (BOECK et al., 2006). As chalconas naturais e sintéticas apresentam vasto potencial farmacológico, por exercerem atividades antiinflamatória, antibacteriana, tripanomicida, antiviral, antitumoral, antimalárica e leishmanicida (NIELSEN et al., 2004; NI et al., 2004; NOWAKOWSKA, 2007; ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2009).



A inibição da produção do óxido nítrico (NO), da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) são os mecanismos de ação propostos para terapias em doenças inflamatórias de células mononucleares de sangue periférico humano (NOWAKOWSKA, 2007). Algumas moléculas derivadas de chalconas demonstraram inibir a produção do óxido nítrico (NO), que quando em excesso causa dano tecidual, e da PGE<sub>2</sub>, por inibir respectivamente a expressão da NO sintetase e da ciclooxigenase-2 (COX-2), podendo ser utilizadas no desenvolvimento de novos agentes antiinflamatórios (KIM, 2007). Estudos identificaram a ação de alguns derivados de chalconas quanto a sua potencial ação inibitória na produção do TNF- $\alpha$ , uma citocina responsável pela indução do processo inflamatório (NI et al., 2004).

Xantohumol (20,40,4-tri-60-metoxi-30 prenilchalcona) é um derivado de chalcona isolado de lúpulo (*Humulus lupulus L.*), que possui atividade anticarcinogênica, de eliminação de radicais livres e propriedades anti-inflamatórias, mas seus mecanismos exatos não estão esclarecidos. Neste contexto, Lee e colaboradores (2011) testaram a atividade anti-inflamatória do xantohumol em células microgliais de camundongo, sendo observada uma inibição significativa na produção de mediadores inflamatórios NO, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , além de aumento do nível de antioxidantes GSH endógeno. De acordo com os resultados encontrados, o xantohumol poderia ser um candidato atrativo para a regulação das respostas inflamatórias no cérebro.

Chalconas com propriedades bactericidas são descritas desde a década de 40. As licochalconas A e C mostraram-se potentes contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Esses compostos inibiram o consumo de oxigênio em células infectadas (NI et al., 2004). Segundo Nielsen e colaboradores (2004), o mecanismo de ação das carboxichalconas é bacteriostático, enquanto que o das hidroxichalconas é bactericida.

De acordo com Brandão e colaboradores (2010), *Polygonum spectabile*, conhecido como erva-de-bicho, é usado no Brasil para o tratamento de várias doenças infecciosas. Extratos e componentes isolados desta espécie foram avaliadas quanto a toxicidade e efeitos em 15 de bactérias e leveduras, bem como sobre quatro cepas de vírus. Extratos menos polares foram eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *M. canis* e *Tricophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Foram isoladas duas chalconas conhecidas e o 3-O-d-glicosil-sitosterol. O extrato etanólico foi o único a apresentar atividade antiviral. Uma das chalconas avaliadas inibiram o crescimento de várias bactérias, e foram significativamente ativa contra dermatófitos.

Nesse contexto, em estudo recente foram sintetizados 19 compostos híbridos possuindo chalcona e moléculas de ácido rodanina-3-acético e avaliados quanto à sua atividade bactericida. Alguns compostos apresentaram ótimas atividades contra as bactérias Gram-positivas, incluindo os isolados clínicos multirresistentes. Esta classe de compostos apresentou alta potência contra *Staphylococcus aureus*, entre os quais o derivado com substituição dois cloros no anel fenil da chalcona foi tão ativo (2µg/mL) quanto o controle utilizado, norfloxacino, porém não inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* a 64 mg/mL. Os compostos híbridos apresentaram maior atividade que seus intermediários isolados, sugerindo que a síntese desses compostos pode ser uma nova estratégia contra a infecção bacteriana (CHEN et al., 2010).

O efeito antitumoral das chalconas está relacionado a diversos mecanismos. Entre eles, a inibição da polimerização das tubulinas responsáveis pela formação dos microtúbulos, essenciais para a divisão celular. Algumas chalconas ligam-se fortemente a tubulinas inibindo o crescimento tumoral. Outro mecanismo sugere a inativação de oncoproteínas e de sua interação com o p53, impedindo, assim, a inativação deste último. Algumas chalconas são capazes de inibir receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que está super expresso em diversos tipos de

tumores (NI et al., 2004). Um dos mecanismos da atividade antitumoral das chalconas pode ser a supressão da angiogênese (MOJZIS, 2008).

Dados da literatura sugerem que a 2'-hidroxi-4'-metoxichalcona pode ser um promissor candidato a inibidor da angiogênese, por inibir a indução da COX-2, proteína que tem sido detectada nos tumores de cólon, pulmão, mama, próstata, e na angiogênese (LEE et al., 2006). Entretanto, o mecanismo molecular das propriedades anti-angiogênicas *in vivo* das chalconas não está amplamente elucidado, mas parece estar associado à habilidade de inibir eventos chave do processo angiogênico, tais como proliferação e migração das células endoteliais, bem como a expressão de alguns fatores pró-angiogênicos (MOJZIS, 2008).

Com base na atividade antitumoral de chalconas e retinóides, uma nova classe de híbridos retinóide-chalcona foi desenhada e sintetizada a fim de descobrir produtos naturais anticancerígenos. Esses compostos foram testados contra a linhagem celular HT-29 do câncer do cólon, e apresentaram considerável atividade inibitória (MIZUNO et al., 2010).

Uma série de híbridos de cumarina-chalcona foram sintetizados e avaliados quanto à sua citotoxicidade *in vitro* contra quatro linhagens de células de câncer humano e fibroblastos normais (NIH3T3). Dentre os 21 compostos selecionados, três apresentaram uma faixa IC<sub>50</sub> 3,59 a 8,12 µM. O composto mais promissor apresentou seletividade 30 vezes maior para células C33A (carcinoma cervical), quando comparado com células de fibroblastos normais NIH3T3 (SASHIDHARA et al., 2010).

Uma nova diidrochalcona, chamado evelynin, foi isolada das raízes e rizomas de *Tacca chantrieri*. Esse composto apresentou citotoxicidade contra quatro linhagens de células humanas de câncer, o melanoma MDA-MB-435, de mama MDA-MB-231, próstata PC-3, e carcinoma de células cervical HeLa (PENG et al., 2010).

Por apresentarem atividade estrogênica, as chalconas podem competir com esteróides endógenos por sítios ativos de enzimas como aromatase, 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase  $\Delta^5/\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD). Essas enzimas estão envolvidas na biossíntese de hormônios esteroidais e, particularmente, de estrógenos, que possuem efeito no desenvolvimento de câncer em células mamárias humanas. As chalconas, por possuírem estrutura bifenólica semelhante aos estrógenos, podem interagir, assim, com os receptores, e inibir as enzimas envolvidas nesse processo, podendo diminuir a produção local dos hormônios esteroidais (LE BAIL et al., 2001).

Estudos recentes indicam efeitos antinociceptivos relevantes em ratos frente a modelos químicos e térmicos de dor induzida, mostrando tanto a atividade analgésica periférica quanto central. A flavokawin B (6'-hidroxi-2', 4'-dimetoxichalcona) é uma chalcona sintética amplamente utilizada em modelos de nocicepção química e térmica em camundongos. Quando administrada, concomitantemente, via oral e intraperitoneal (0,3, 1, 3 e 10 mg/kg), produziu uma significativa inibição dose-dependente das contrações abdominais induzidas por ácido acético, e o efeito antinociceptivo obtido pela via intraperitoneal foi cerca de 7 vezes mais potente que a via oral. Além disso, o tratamento de flavokawin B apresentou significativa inibição da nocicepção neurogênica induzida por injeção intraplantar de glutamato e capsaicina. Da mesma forma, este composto também induziu um aumento significativo no período de latência de resposta a estímulo térmico quente, e seu efeito antinociceptivo não estava relacionado a relaxamento muscular ou ação sedativa (MOHAMAD et al., 2010).

Alguns derivados sintéticos de chalconas possuem moderadas propriedades antifúngicas, porém, essa atividade mostrou-se apenas contra os dermatófitos e não contra outros tipos de fungos. Dermatófitos infectam áreas queratinizadas do corpo, e estas dermatomicoses são de difícil cura (LÓPEZ et al., 2001; NOWAKOWSKA, 2007). Derivados de diidrochalconas mostraram relativa atividade contra dois fungos

oportunistas de pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), *Candida albicans* e *Candida neoformans* (NOWAKOWSKA, 2007).

A propriedade antiviral das chalconas depende de substituições específicas na molécula (NOWAKOWSKA, 2007). Segundo Wu e colaboradores (2003), um derivado de chalcona apresentou potente atividade anti-HIV com um bom índice terapêutico. A presença do grupo 4-metoxi ligado ao esqueleto da chalcona pareceu ser crítico para essa atividade.

Estudos apontam os derivados de chalconas como potenciais agentes antimaláricos (RAM et al., 2000; DOMÍNGUEZ et al., 2001, GO et al., 2004). A licochalcona A apresentou atividade antimalárica através da inibição seletiva da fumarato redutase na cadeia respiratória do parasito (ZHAI et al., 1999; CHEN et al., 2001).

Uma série específica de compostos híbridos contendo chalcona e dienona (compostos estruturalmente relacionados) foi sintetizada e avaliada a atividade *in vitro* contra a malária. Chalconas podem ser facilmente sintetizadas, e têm apresentado notável atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* (GUTTERIDGE et al., 2006). O estudo teve como objetivo explorar esse recurso através da incorporação da molécula 7 cloroquinolina em moléculas híbridas com chalconas e dienones. A estratégia de hibridização levou à identificação de compostos altamente ativos contra três linhagens testadas de *P. falciparum* (GUANTAI et al., 2010).

De acordo com Lunardi e colaboradores (2003), algumas chalconas possuem efeito inibitório ao crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis*. Esses compostos sintéticos, contendo substituintes em C1, exibiram promissoras atividades leishmanicida, além de ausência de efeito citotóxico em macrófagos de ratos. Esse efeito também foi observado nas formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, apresentando atividade anti-tripanososomal. A posição dos substituintes parece ser

importante para a efetividade da atividade antiprotozoária (TOMAZELA et al., 2000). Dados sugerem que o mecanismo das chalconas ocorre através da inibição potencial das atividades da fumarato redutase, succinato desidrogenase, NADH desidrogenase, ou succinato- e NADH-citocromo c redutase nas mitocôndrias do parasito (LUNARDI et al., 2003).

De fato, na década passada, as chalconas emergiram como uma nova classe de agentes leishmanicidas (BOECK et al., 2006). Estudos recentes mostraram que uma série de derivados sintéticos das chalconas possui propriedade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* (LUNARDI et al., 2003; BOECK et al., 2006; NOWAKOWSKA, 2007). Esses compostos mostraram uma inibição na viabilidade das formas promastigotas e amastigotas de várias espécies de leishmania (KAYSER; KIDERLEN, 2001). De acordo com Gilbert e Favoreto (2005), as chalconas agem diretamente no parasito, diferindo de outras classes terapêuticas que abrangem substâncias fenólicas, terpênicas e polissacarídeos, que agem sobre o macrófago. Sugere-se que a atividade leishmanicida ocorra através da inibição da enzima fumarato redutase da mitocôndria do parasito (ZHAI et al., 1999; CHEN et al., 2001; BOECK et al., 2006). A ausência desta enzima nas células de mamíferos faz dos derivados de chalcona potenciais agentes terapêuticos para o tratamento das leishmanioses e outras doenças, como as úlceras gástricas causadas pela bactéria *Helicobacter pylori* (NI et al., 2004). Chalconas oxigenadas inibiram a respiração de promastigotas de *Leishmaniose major*, por diminuir o consumo de oxigênio do parasito, a acumulação de CO<sub>2</sub> e o declínio do pH na cultura do parasito (ZHAI et al., 1999; CHEN et al., 2001).

Torres-Santos e colaboradores (1999a) mostraram que a 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona apresenta atividade leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas *in vitro* de *Leishmania amazonensis*, um dos principais agentes responsáveis pela manifestação cutânea da doença (LTA). Hermoso e colaboradores (2003) observaram um aumento na atividade leishmanicida de derivados de

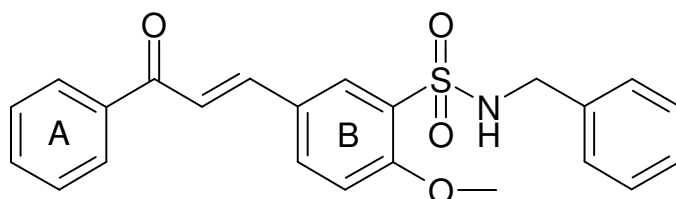
diidrochalconas, contra o mesmo agente etiológico, com a substituição de um grupo metoxi no carbono 4 do anel B.

Aponte e colaboradores (2010) avaliaram a atividade de 43 chalconas substituídas contra formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, e a atividade de nove chalconas contra *L. braziliensis* e *L. peruviana*, usando macrófagos infectados com os respectivos parasitas. O estudo mostrou que a atividade leishmanicida de chalconas aumenta na presença de grupamento hidroxil polar nas posições 2' e 4'. Dessa forma, as cinco chalconas mais ativas e seletivas foram estudadas *in vivo*, sendo observada a identificação de duas chalconas com alto potencial de redução dos parasitas.

De acordo com Richard e Erbovetz (2010), novas chalconas foram sintetizadas e avaliadas contra *L. donovani*. O composto contendo cloro na posição *para* do anel B e adição do grupamento  $\alpha$ -ionona no anel A inibiu 88% da parasitemia na concentração de 2 mg/mL (6,3  $\mu$ M) (SURYAWANSHI et al., 2008). Em outro estudo, chalconas que tiveram a adição de um grupo 2-(3-aryl-3-oxopropenil) juntamente com um grupo 9-terc-butil no anel B e metoxilas no anel A, resultou em compostos que mostraram boa atividade no ensaio de macrófagos infectados com *L. donovani* e baixa toxicidade contra células THP-1 (precursoras de macrófagos) não infectadas. Sendo que o composto mais eficaz reduziu 86% da parasitemia em células THP-1 infectadas com *L. donovani* na concentração de 5 mM, não tendo qualquer efeito perceptível sobre a célula hospedeira não infectada na mesma concentração (RECHWALD et al., 2008).

Com o propósito de encontrar um composto de melhor efetividade leishmanicida, inúmeros trabalhos investigaram a relação estrutura atividade de derivados sintéticos das chalconas (TOMAZELA et al., 2000; LUNARDI et al., 2003; BOECK et al., 2006). Kayser e Kiderlen (2001) estudaram a atividade antileishmaniose de várias chalconas naturais hidroxiladas e metoxiladas.

Recentemente, uma série de derivados sintéticos 3-sulfonamida 4-metoxichalcona foi obtida pelo Laboratório de Síntese, Estrutura e Atividade (LABSEAT), do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e avaliada quanto à sua atividade leishmanicida frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis* (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2009). Entre os derivados estudados, o composto 3i (figura 6) denominado 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida, que provém da substituição do átomo de cloro do intermediário cloreto de sulfonila de 4-metoxichalcona pelo grupo benzilamino, foi o que mostrou maior atividade, sendo esta 20 vezes maior que a apresentada pelo derivado fenilamino. O derivado 3i apresenta massa molecular e cLogP de 407,49 e 4,11, respectivamente, e baixa hidrossolubilidade.



**Figura 6.** Estrutura química da 5-(2-Benzoiletênica)-N-benzil-2-metoxibenzenosulfonamida

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa avaliou a atividade dos derivados sintéticos da 3-sulfonamida 4-metoxichalcona contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Entre os compostos avaliados, o 3i apresentou a quarta maior atividade contra a espécie, e a presença do grupamento sulfonamida mostrou ser essencial para o perfil leishmanicida (SOUZA *et al.*, 2009).

*L. braziliensis* é um dos agentes etiológicos da LTA e a inibição desse parasito através de um tratamento tópico pode impedir a evolução da doença para casos mais sérios, como por exemplo, o aumento das lesões que podem ser destrutivas,



desfigurantes e incapacitantes, afetando psicologicamente o paciente, já que destroem as estruturas da pele (GUEDES et al., 2008).

A baixa solubilidade aquosa das chalconas tem sido o maior obstáculo no desenvolvimento de formas de administração, tanto tópica, quanto oral, visto que não dissolvem no intestino, tornando baixa a biodisponibilidade e sendo necessária a veiculação de doses extremamente altas (NIELSEN et al., 2004). De acordo com Torres-Santos e colaboradores (1999b), a 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona (DMC) isolada de *Piper aduncum*, mostrou seletiva atividade, *in vitro* e *in vivo* através da administração intraperitoneal, contra amastigotas intracelular de *L. amazonensis* e o aumento dessa atividade terapêutica, em ratos, foi obtida pela encapsulação da molécula em nanosferas biodegradáveis.

Novas formulações e sistemas de liberação de fármacos podem reduzir a toxicidade e aumentar a atividade de compostos leishmanicidas (CROFT et al., 1991; BERMAN, 1997; TORRES-SANTOS et al., 1999b). Sua vantagem inclui a diminuição da dose e frequência de administração, a redução de possíveis efeitos adversos e a potencialização na eficácia do tratamento (TORRES-SANTOS et al., 1999b; PINERO et al., 2006; SAMPAIO et al., 2009).

### ***Nanoemulsões***

As emulsões são sistemas heterogêneos que consistem na mistura de uma fase aquosa, uma fase oleosa e um agente emulsificante, permitindo assim a preparação de misturas homogêneas e relativamente estáveis de dois líquidos imiscíveis entre si (AULTON et al., 2005; CAMARGO, 2008).

Nanoemulsões são sistemas de aspecto leitoso nos quais gotículas oleosas de tamanho nanométrico estão uniformemente dispersas em uma fase aquosa externa, estabilizadas por um sistema tensoativo adequado. Possuem diâmetro reduzido de gotícula (geralmente de 100 a 300 nm) e baixa viscosidade, sendo também

denominadas de emulsões lipídicas ou emulsões submicrométricas (BENITA; LEVY, 1993; BOUCHEMAL et al., 2004). Moléculas de reduzida hidrossolubilidade associam-se preferencialmente a esses sistemas pela solubilização no interior da gotícula de óleo e/ou adsorção na interface da nanoestrutura (WASHINGTON, 1996; TROTTA et al., 2002; SONNEVILLE–AUBRUN et al., 2004; FRONZA et al., 2004; SAKULKU et al., 2009).

Durante muito tempo, a pele foi considerada como uma barreira impermeável, porém este conceito foi modificado e se reconheceram diferentes graus de permeabilidade (PRISTA et al., 1992). A pele e as mucosas têm sido frequentemente estudadas como via de administração de fármacos, pois representam uma via atrativa e acessível para administração de substâncias em comparação às vias oral e parenteral, por apresentar mínimo efeito sistêmico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; GUTERRES et al., 2007).

Dados da literatura mostram que nanoemulsões de uso tópico possuem potencial uso como carreadores e liberadores de compostos bioativos de reduzida hidrossolubilidade, visando tanto uma atividade sistêmica quanto uma atividade local (DUNCAN et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1995; PIEMI et al., 1999; YILMAZ; BORCHERT, 2006; KELMANN et al., 2007).

A incorporação de compostos lipofílicos nas nanoemulsões pode conduzir a um aumento na taxa de penetração dos mesmos através da pele intensificando, assim, o efeito tópico, ou o núcleo pode exercer a função de reservatório de liberação nas camadas mais superficiais da pele (CALDERILLA-FAJARDO et al., 2006; BENITA, 1998; BARRY, 1987). Isso ocorre devido ao prolongamento do tempo de permanência nas camadas superiores da pele, à maior área de superfície de contato e pela baixa tensão superficial das gotículas de óleo (BENITA, 1999; KLANG; BENITA, 1998). Estas características proporcionam assim, a modulação da barreira do estrato córneo, controlando a penetração cutânea; o aumento da interação do ativo com a pele e o

aumento da estabilidade química do ativo (ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; JUNYAPRASERT et al., 2009).

Essas formulações apresentam vantagens para aqueles fármacos pouco solúveis em água, visto que o reduzido diâmetro de gotícula permite um depósito uniforme na pele, e pela possibilidade de promover um aumento da permeação transdérmica. Além disso, as nanoemulsões proporcionam aspecto sensorial agradável, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação, além de poder facilitar a penetração de ativos (SONNEVILLE–AUBRUN et al., 2004; TADROS et al., 2004; RUKTANONCHAI et al., 2009; SILVA et al., 2009).

Os óleos de origem vegetal e semi-sintéticos são amplamente empregados no desenvolvimento de nanoemulsões (KLANG; BENITA, 1998). Óleos constituídos principalmente de triglicerídeos têm sido correntemente utilizados para compor a fase interna da nanoemulsão (PRIMO et al., 2008; ALVES et al., 2007; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; HATZIANTONIOU et al., 2007; FRIEDMAN et al., 1995; BENITA, 1999; PIEMI, et al., 1999; CUNHA JUNIOR et al., 2003; ALVES et al., 2005; PRIMO et al., 2006).

O núcleo oleoso das nanoemulsões corresponde de 5 a 20% da composição final da formulação e o óleo a ser utilizado e a sua concentração depende da solubilidade do fármaco nestes componentes, propriedades físico-químicas desejadas e estabilidade das formulações. Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são ésteres constituídos de três ácidos graxos, com 8 a 12 átomos de carbono, unidos ao glicerol, e dissolvem quantidades elevadas de compostos lipossolúveis. São aproximadamente 100 vezes mais solúveis em água do que os triglicerídeos de cadeia longa (TCL), sendo esses menos utilizados (MUCHTAR; BENITA, 1994). Esses óleos são considerados seguros para a via cutânea (TRAUL et al., 2000).

A interfase óleo/água das nanoemulsões deve ser estabilizada por tensoativos, sendo preferíveis os hidrossolúveis, já que necessitam menor energia para formar as nanoemulsões e dessa forma melhorar a estabilidade desses sistemas (KOMMURU et al., 2001). As lecitinas são tensoativos de origem natural formadas por misturas de fosfolipídeos extraídos da soja ou da gema de ovo, possuem a fosfatidilcolina como componente majoritário, e são empregadas para estabilização de nanoemulsões por serem atóxicos e biocompatíveis (BENITA, 1998; KIBBE, 2000; HENNERÉ et al., 2009). Os componentes da lecitina possuem grande afinidade pelas membranas celulares, proporcionando um aumento da absorção de fármacos, geralmente não são irritantes nem sensibilizantes para pele animal e humana (PAOLINO et al., 2002).

Os métodos mais utilizados para produção de nanoemulsões consistem na homogeneização à alta pressão e microfluidização. Estes são métodos físicos que produzem emulsões monodispersas com reduzido diâmetro de partícula em grande escala, mas podem causar o aquecimento da amostra e requerem o emprego de equipamentos específicos. A ultra-sonicação pode ser realizada em escala laboratorial, mas acarreta na elevação da temperatura da amostra durante o processo, pode contaminar o produto com componentes da sonda e possui dificuldade na obtenção de emulsões monodispersas e na execução em escala industrial. A emulsificação espontânea, que utiliza solventes orgânicos para a formação das nanogotículas, com posterior evaporação dos mesmos, produz volumes reduzidos de produto final, além de conduzir a formação de sistemas monodispersos. O método de preparo de nanoemulsões possui grande influência sobre as propriedades físico-químicas e, em especial, o diâmetro das gotículas das nanoemulsões produzidas (ROBIN et al., 1992; TADROS et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004; YILMAZ; BORCHERT, 2005; SADURNÍ et al., 2005; ALMEIDA et al., 2008).

Dentre as técnicas empregadas, a emulsificação espontânea tornou-se interessante para estudos de desenvolvimento de formulações, visto ser de fácil realização em escala laboratorial, não requer equipamentos sofisticados, não utiliza altas

temperaturas, e geralmente leva à formação de pequeno tamanho de gotícula na formulação, possibilitando preparar nanoemulsões com propriedades similares às aquelas obtidas por métodos físicos. Esse método resulta na emulsificação das nanogotículas da fase oleosa, devido à adição de uma solução solvente-óleo na fase aquosa, gerando, dessa forma, uma instabilidade interfacial, como consequência da rápida difusão do solvente através da interface, diminuindo a tensão da mesma (ALMEIDA et al., 2008).

O tamanho de partícula é um dos parâmetros mais importantes para a caracterização das nanoemulsões, pois pode fornecer informações importantes a respeito da influência dos componentes da formulação sobre as características físico-químicas da mesma (BENITA e LEVY, 1993; KLANG; BENITA, 1998). Nanoemulsões possuem tamanho de gotícula geralmente entre 100 a 300nm, garantindo um contato próximo com o estrato córneo (SAKULKU et al., 2009; ALVES et al., 2007). Além disso, a avaliação do diâmetro de partícula é fundamental nos estudos de estabilidade, pois quanto mais rápido as gotículas do sistema aumentam de tamanho, durante o período de armazenamento, menor a estabilidade do sistema (ROLAND et al., 2003; CAMARGO, 2008).

A técnica mais empregada para analisar o diâmetro médio de partícula é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também conhecida como espalhamento de luz dinâmico. Técnicas complementares têm sido empregadas para avaliar a morfologia e o tamanho das gotículas, como a microscopia eletrônica de transmissão - MET (FRIEDMAN et al., 1995; HATZIANTONIOU et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009; ALVES et al., 2007). O índice de polidispersão (IP) indica a distribuição das partículas e é analisado juntamente com o diâmetro médio de gotícula. Valores de IP entre 0,2 a 0,3 indicam uma boa homogeneidade das gotículas na amostra, e geralmente em nanoemulsões de uso tópico o ideal é a distribuição apresentar-se de forma monodispersa, ou seja, com uma dispersão uniforme do diâmetro das nanopartículas (ALVES et al., 2007; VARGAS, 2010).

O potencial zeta está diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas das nanoemulsões, demonstrando a carga elétrica de superfície das mesmas, além de fornecer informações sobre a estabilidade do sistema (ROLAND et al., 2003). Esse parâmetro é consequência da natureza química das moléculas localizadas na interface das nanoemulsões, originado pela dissociação de grupamentos químicos dos agentes tensoativos que estabilizam a interface da emulsão com a formação de uma barreira mecânica (BENITA; LEVY, 1993; FLOYD, 1999; NETZ; ORTEGA, 2002, DIAS, 2009). A lecitina é um dos tensoativos mais empregados e devido aos fosfolipídeos carregados negativamente, como os ácidos fosfatídicos e fosfatidilserina, as formulações apresentam elevado potencial zeta negativo em pH próximo da neutralidade (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; PRIMO et al., 2008).

Um elevado valor de potencial zeta em módulo ( $>30\text{mV}$ ) é importante para a estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar uma possível floculação e coalescência (KLANG; BENITA, 1998; ROLAND et al., 2003 YILMAZ et al., 2005; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009). A sua determinação é realizada através de técnicas eletroforéticas específicas e reflete a composição da interface, assim como a concentração de fármaco na interface óleo/água (TAGNE et al., 2008).

O pH pode afetar consideravelmente a carga de superfície de nanoemulsões e a estabilidade destes sistemas, podendo afetar também o tamanho das gotículas (YILMAZ et al., 2005). Alterações dos valores de pH indicam a ocorrência de reações químicas, levando a modificações nos grupamentos polares dos tensoativos, reduzindo sua eficiência. No caso de nanoemulsões contendo óleos vegetais, pode ser observada uma diminuição no valor de pH, decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, gerando, conseqüentemente, ácidos graxos livres. Estes reduzem o valor de pH, e o seu monitoramento serve como indicador de estabilidade das nanoemulsões durante o armazenamento. Em emulsões formuladas com lecitina, o pH pode diminuir devido

aos fosfolipídeos ácidos presentes na mesma (KLANG et al, 1999, MARTINI 2005). Para a aplicação cutânea, o pH das formulações geralmente encontra-se da neutralidade a levemente ácido (ALVES et al., 2007).

A avaliação da viscosidade de nanoemulsões tem sido pouco descrita na literatura, mas apresenta grande importância para o desenvolvimento de formulações de uso tópico. A viscosidade é influenciada pelos componentes das nanoemulsões, óleos e tensoativos, e por parâmetros como a concentração da fase interna (JUMMA et al., 1998), o diâmetro de gotícula (SILVENDER et al., 2003; SILVA et al., 2006) e a viscosidade do óleo constituinte do núcleo oleoso (JUMMA et al. 1998; CHUNG et al., 2001). A viscosidade do óleo e sua concentração podem levar ao aumento da viscosidade, assim como a natureza e concentração do tensoativo (LEVY; BENITA, 1989; JUMA; MULLER, 1998). Esses dois componentes das nanoemulsões estão fortemente ligados ao tamanho de gotícula que, geralmente, se relaciona aos valores de viscosidade, isto é, quanto maior o tamanho de gotícula, maior a viscosidade (JUMA; MULLER, 1998).

As nanoemulsões líquidas geralmente apresentam um comportamento reológico do tipo newtoniano (ROLAND et al., 2003; SILVANDER et al., 2003). A medida da viscosidade pode ser realizada por viscosímetro capilar. Devido à consistência leitosa das nanoemulsões, a administração tópica é facilitada por meio de sua incorporação em veículos carreadores, como hidrogéis. (SCHWARZ et al., 1996; ALVES et al., 2005; FASOLO et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2009; SAKULKU et al., 2009).

As nanoemulsões espessadas com polímeros apresentam-se como fluido não-newtoniano (ALVES et al., 2005) e com comportamento plástico ou pseudo-plástico, tornando-se ideais para aplicação tópica (SCHWARZ et al., 1995). O Carbopol 940<sup>®</sup> é um dos polímeros hidrossolúveis mais utilizados para aumentar a viscosidade de emulsões (SCHWARZ et al., 1996; ALVES et al., 2005; YILMAZ et al., 2005;

YILMAZ et al., 2006), visto que, uma formulação de uso tópico deve permitir que o sistema contendo o fármaco, apresente maior afinidade à pele e não ao veículo, o que pode ser solucionado com a incorporação em uma base hidrofílica (ALVES et al., 2007; BABOOTA et al., 2007; MOU et al., 2008).



## Referências

ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; LÓPEZ-MÁRQUEZ, D. M.; CRESPO-FERRER, I.; GALLO, B.; VICENTE, F. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 87-96, 2007.

ABDA, I.B.; MONBRISON, F.; BOUSSLIMI, N.; AOUN, K.; BOURATBINE, A.; PICOT, S. Advantages and limits of real-time PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species Tunisia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 17-22, 2011.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, v.112, p. 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, M.E.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Preparação de Emulsões Submicrométricas: Aspectos Teóricos sobre os Métodos Empregados na Atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 780-788, 2008.

ALVES, M.P.; SCARRONE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

ALVES, M. P., POHLMANN, A. R. e GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900–904, 2005.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; OLIVEIRA, K. N.; SILVA, D. G.; PACHECO, L. K.; JOUSSEF, A. C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C. M. O.; SOUZA, A. M. T.; MAGALHAES, U. O.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; NUNES, R. J.; CASTRO, H. C. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p. 755-763, 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) (acesso em junho de 2009).

APONTE, J.C.; CASTILLO, D.; ESTEVEZ, Y.; GONZALEZ, G.; AREVALO, J.; HAMMOND, G.B.; SAUVAIN, M. In vitro and in vivo anti-Leishmania activity of polysubstituted synthetic chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20, 100-103, 2010.

AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T. C.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E. *et al.* Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clin. Infect. Dis.**, v. 33, p. 1847-1851, 2001.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DERAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniosis. **Parasitol Today**, v. 8, p. 104-105, 1992.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

AULTON, MICHAEL E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BABOOTA, S; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design development and evaluation of novel nanoemulsions formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharm.**, v.8, p. 315-332, 2007.

BALÃANA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. **Gen. Pharmacol.**, v.30, 435, 1998.

BANGS, J. D.; RANSOM. D. A.; NIMICK, M.; CHRISTIE, G. H. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 114, p. 111, 2001.

BARRY, B.W. Mode as action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n.3, p. 328-337, 2004.

BEN SALAH, A.; BUFFET, P.; MORIZOT, G.; BEN, MASSOUD, N.; ZAATOUR, A.; BEN ALAYA, N.; HAMIDA, H.; EL AHMADI, Z.; DOWNS, M.; SMITH, P.; *et al.* WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.3, p. 432, 2009.

BENITA, S. **Submicron emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. **Biomed & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 193-206, 1999.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, p.1069-1079, 1993.

BERMAN, J. Development of miltefosine for the leishmaniasis. **Minirev Med Chem**, v.6, p.145-151, 2006.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last ten years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B. R. Synthesis of chalcone

analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538-1545, 2006.

BOUCHEMAL, K., BRIANCON, S., PERRIER, E., FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280 (1-2), p. 241-251, 2004.

BRANDÃO, G.C.; KROON, E.R.; DUARTE, M.G.R. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v.17, p.926-929, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n.º 01, de 29 de julho de 2005. **Autoriza, ad referendum, a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BURCHMORE, R. J. S. e BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, v.31, p. 1311-1320, 2001.

CALDERILLA-FAJARDO, S. B.; CAZARES-DELGADILLO, J.; VILLALOBOS-GARCIA, R.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion and emulsion. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 32, p. 107-113, 2006.

CAMARGO, M. F. P. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, 2008.

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

CAMPOS, S.N.; SOUZA-LEMOS, C.; TEVA, A.; PORROZZI, R.; GRIMALDI JR, G. Systemic and compartmentalised immune responses in a *Leishmania braziliensis*-macaque model of self-healing cutaneous leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.137, p.149-154, 2010.

CARVALHO, L. H.; ARRIBAS, M. A. G.; FERREIRA, E. I. Leishmaniosis. What do we know about its chemotherapy? **Rev. Bras. Ci. Farm (Supl)**, v. 36, n.1, p. 69-96, 2000.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHEN, Z.A.; ZHENG, C.J.; SUN, L.P.; PIAO, H.R. Synthesis of new chalcone derivatives containing a rhodanine-3-acetic acid moiety with potential anti-bacterial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.5739-5743, 2010.

CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2023-2029, 2001.

CHUNG, H.; KIM, T. W.; KWON, M.; KWON, I. C.; JEONG, S.Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsion as drug or gene delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 339-350, 2001.

COELHO, L.I.C.; PAES, M.; GUERRA, J.A.; BARBOSA, M.G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M.E.; FILHO, S.P.B. Characterization of *Leishmania* spp. Causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitol. Res.**, 2010.

COIMBRA, E.S.; CARVALHAES, R.; GRAZUL, R.M.; MACHADO, P.A.; SOUZA, M.V.N., SILVA, A.D. Synthesis, cytotoxicity and Antileishmanial activity of some N-(2-(indol-3-yl)ethyl)-7-chloroquinolin-4-amines. **Chem Biol. Drug Des.**, v.75, p.628-631, 2010.

CORWARE, K.D.; ROGERS, M.; TEO, I.; MULLER, I.; SHAUNAK, S. An amphotericin B-based drug for treating experimental *Leishmania major* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**, v.104, p.749-750, 2010.

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

CROFT, S. L.; DAVIDSON, R. N.; THORNTON, E. A. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 28, p. 111-118, 1991.

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

CUNHA JUNIOR, A.S.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; *et al.* Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, n.3, p.385-391, 2003.

DAVIES, C. R.; KAYE, P.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S. Leishmaniosis: a new approach to disease control. **BMJ**, v. 326, p. 377-382, 2003.

DIAS, D.O. Desenvolvimento de hidrogéis contendo nanoemulsões de óleo de copaíba.  
**Trabalho de Conclusão de Curso I e II**, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

DOMÍNGUEZ, J. N.; CHARRIS, J. E.; LOBO, G.; DOMÍNGUEZ, N. G.; MORENO, M. M.; RIGGIONE, F.; SANCHEZ, E.; OLSON, J.; ROSENTHAL, P. J. Synthesis of quinolinyl chalcones and evaluation of their antimalarial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 555-560, 2001.

DUNCAN, J.I., PAYNE, S.N., WINFIELD, A.J., ORMEROD, A. D. THOMSON, A.W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.123, p.631-640, 1990.

FASOLO, D.; LIEGE, S.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 44, p. 1174-1177, 2007.

FASOLO, D., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie**, v. 64, p. 726-730, 2009.

FARI, R.M.; JARALLAH, J.S.; KHOJA, T.A.; AL-YAMANI, M.J. Intralesional treatment of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. **Int. J. Dermatol.**, v. 32, p. 610-612, 1993.

FARMACOPEIA PORTUGUESA VII. 1. Volume. Lisboa: Infarmed, 2002.

FLOHE, S.; LANG, T.; MOLL, H. Synthesis, stability, and subcellular distribution of major histocompatibility complex class II molecules in Langerhans cells infected with *Leishmania major*. **Infection & Immunity**, v.65, p.3444-3450, 1997.

FLOYD, A.G.; Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science Technology**, v.2, p.134-143, 1999.

FRANCO, M. A. Determinação de antimoniais (SbIII e Sb V) em fármacos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de Brasília, DF, 1992.

FRIEDMAN, D.I.; SCHWARZ, J.S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.84, p.324-329, 1995.

FRONZA, T., CAMPOS, A., TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 4, p. 558-556, 2004.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. Produtos naturais ativos em Leishmaniose. **Revista Fitos.**, v.1, n.1, p. 43-51, 2005.

GO, M. L.; LIU, M.; WILAIRAT, P.; ROSENTHAL, P. J.; SALIBA, K. J.; KIRK, K. Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium*

*falciparum*- infected erythrocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.9, p. 3241-3245, 2004.

GÓMEZ, L. E.; ANDRIAL, M.; HOSOKAWA, A.; NONADE, S.; HASHIGUCHI, Y. Oral treatment of new world cutaneous leishmaniasis with mefloquine and artesunate in Ecuador: a preliminary clinical trial. **Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 23, p. 151-157, 1995.

GUANTAI, E.M.; NCOKAZI, K.; EGAN, T.J.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J.; SMITH, P.J.; CHIBALE, K. Design, synthesis and *in vitro* antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.8243-8256, 2010.

GUEDES, A. C. M.; CARVALHO, M. L. R.; MELO, M. N. Leishmaniose tegumentar americana: apresentação pouco comum. **An. Bras. Dermatol.**, v. 83, n. 5, p. 445-449, 2008.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTTERIDGE, C.E.; NICHOLS, D.A.; CURTIS, S.M.; THOTA, D.S.; VO, J.V.; GERENA, L. MONTIP, G.; ASHER, C.O.; DIAZ, D.S.; DITUSA, C.A.; SMITH, K.; BHATTACHARJEE, A.K. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.16, p.5682, 2006.

HANSAN, T.; ORTEL, B.; SOLBAN, N.; POGUE, B.. in: KUFE, D.W.; BAST, R.C.J.; HAIT, W.N.; HONG, W.K.; POLLOCK, R.; WEICHSELBAUM, R.R.; GANSLER, H.J.; FREI III E. (Eds.). **Cancer Medicine**, BC Decker Inc., Hamilton, Ontario, Canada, p. 537-548, 2006.

HATZIANTONIOU, S., DELI, G., NIKAS, Y., DEMETZOS, C. e PAPAIOANNOU G. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides. **Microscopy in Nanobiotechnology**, v. 38, p. 819-823, 2007.

HENNERÉ, G.; PROGNON, P.; BRION, F.; ROSILIO, V.; NICOLIS, I. Molecular dynamics simulation of a mixed lipid emulsion model: influence of the triglycerides on interfacial phospholipid organization. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 901, p. 174-185, 2009.

HERMOSO, A.; JIMENEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PINERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, p. 3975-3980, 2003.

JAAFARI, M.; BAVARSAD, N.; FAZLY BAZZAZ, B.; SAMIEI, A.; SOROUSH, D.; GHORBANI, S.; LOTFI, H.; KHAMESIPOUR, A. Effect of topical liposomes

containing paromomycin sulfate in the course of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 2259-2265, 2009.

JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C. *et al.* **N. Engl. J. Med.**, v. 341, p. 1795-1800, 1999.

JIN, Y.; XIAO, Y.; ZHANG, F.; XUE, X. ; XU, Q.; LIANG, X. Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius L.* by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 418-430, 2008.

JUMMA, M.; KLEINEBUDDE, P.; MÜLLER, B.W. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.46, p.161-176, 1998.

JUMMA, M.; MULLER, B.W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, p.81-89, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap.18, p. 303-314, 1999.

JUNYAPRASERT, V. B., TEERANACHAIDEEKUL, V., SOUTO, E. B., BOONME, P. e MÜLLER, R. H. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207-214, 2009.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F. In vitro Leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 148-152, 2001.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Int. J. Pharm.**, v. 342, p. 231-239, 2007.

KIBBE, A. M. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

KIM, Y. H.; KIM, J.; PARK, H.; KIM, H. P. Anti-inflammatory activity of the synthetic chalcone derivates: inhibition of inducible nitric oxide synthase-catalyzed nitric oxide production from lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, n.8, p. 1450-1455, 2007.

KLANG, S. H.; PARMAS, M.; BENITA, S. **Emulsions as drug carriers: possibilities, limitations and future perspectives.** [s.1], 1999.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

KOMMURU, T.R.; GURLEY, B.; KHAN, M.A. and REDDY, I. K. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 233–246, 2001.

LAGUNA-TORRES, V. A.; SILVA, C. A. C.; CORREIA, D.; CARVALHO, E. M.; MAGALHÃES, A. V.; MACÊDO, V. O. Mefloquina no tratamento da leishmaniose cutânea em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.5, p. 529-532, 1999.

LE BAIL, J. C.; POUGET, C.; FAGNERE, C.; BASLY, J. P.; CHULIA, A. J.; HABRIOUX, G. Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities. **Life Sciences**, v.68, p. 751-761, 2001.

LEE, I.S.; LIM, J.; GAL, J.; KANG, J.C.; KIM, H.J.; KANG, B.Y.; CHOI, H.J.C. Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. **Neurochemistry International**, v.58, p.153-160, 2011.

LEE, Y. S.; LIM, S. S.; SHIN, K. H.; KIM, Y. S.; OHUCHI, K.; JUNG, S. H. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone. **Biol. Pharm. Bull.**, v.29, n.5, p. 1028-1031, 2006.

LIARTE, D.B.; MURTA, S.M.F. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. **Parasitol Res**, v.107, p. 205-212, 2010.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana. **An. Bras. Dermatol.**, v.82, n.2, p. 111-124, 2007.

LIMONGI, J. P. **Farmacodinâmica**. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas, 1973. Cap. 61.

LIU, R.; SUN, J.; BI, K.; GUO, D. Identification and determination of major flavonoids in rat serum by HPLC-UV and HPLC-MS methods following oral administration of *Dalbergia odorifera* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 829, p. 35-44, 2005.

LÓPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; ZACCHINO, S. A.; DOMÍNGUEZ, J. N.; LOBO, G.; CHARRIS-CHARRIS, J.; CORTÉS, J. C. G.; RIBAS, J. C.; DEVIA, C.; RODRÍGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. In vitro antifungal evaluation and structure-



activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.9, p. 1999-2013, 2001.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A. T.; CORRÊA, R.; EGERMANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C.; ASSREURY, J.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.4, 2003.

MARSDEN, P. D. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.18, p. 187, 1985.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: formulação e caracterização físico-química. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, UFRGS, 2005, 106 p.

MARTINEZ, S. MARR, J. J. Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p. 741-744, 1992.

MARTINEZ, S.; GONZALEZ, M.; VERNAZA, M. E. Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate. **Clinical Infectious Diseases**, v.24, n. 2, p. 165-169, 1997.

MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 372, p. 495, 2002.

MICHALOWSKI, C.B.; GUTERRES, S.S.; DALLA COSTA, T. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 1093–1100, 2004.

MILLINGTON, O.R.; MYBURGH, E.; MOTTRAM, J.C.; ALEXANDER, J. Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.126, p. 310-317, 2010.

MIZUNO, C.S.; PAUL, S.; SUH, N.; RIMANDO, A.M. Synthesis and biological evaluation of retinoid-chalcones as inhibitors of colon cancer cell growth. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p.7385-7387, 2010.

MS - Ministério da Saúde.

[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1560](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560). (acesso em janeiro, 2011).

MOHAMAD, A.S.; AKHTAR, M.N.; ZAKARIA, Z.A.; PERIMAL, E.K.; KHALID, S.; MOHD, P.A.; KHALID, M.H.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.H.; SULAIMAN, M.R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and

thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.647, p.103-109, 2010.

MOJZIS, J.; VARINSKA, L.; MOJZISOVA, G.; KOSTOVA, I.; MIROSSAY, L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. **Pharmacological Research**, v. 57, p. 259-265, 2008. **Journal of Controlled Release**, v.147, p.368-376, 2010.

MONTANARI, J.; MAIDANA, C.; ESTEVA, M.I.; SALOMON, C.; MORILLA, M.J.; ROMERO, E.L. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark.

MOTTA, J. O. C. Estudo comparativo da resposta imunológica e clínica entre a anfotericina B lipossomal e o N-metil Glucamina em pacientes com a forma localizada de leishmaniose tegumentar americana (LTA) [dissertação]. Brasília (DF): Universidade de Brasília, 2006.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XY, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 270–276, 2008

MUCHTAR, S.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers for ophtalmic use. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 91, p. 181-190. 1994.

NACHER, M. Influence of clinical presentation on the efficacy of short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95, p. 331-336, 2001.

NETZ, P.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 6.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. Cap. 7. p. 35-46.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. Rio de Janeiro: Ateneu, 2005. Cap. 8. p.47-64.

NI, L.; MENG, C. Q.; SIKORSKI, J. A. Recent advances in therapeutic chalcones. **Expert Opin. Ther. Patents**, v. 14, n.12, p. 1669-1691, 2004.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; MOGENS, L.; SHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones – bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3047-3054, 2004.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 125-137, 2007.

OLLIARO, P.; SUNDAR, S. Anthropometrically derived dosing and drug costing calculations for treating visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Trop Med. Int. Health**, v.14, p.88-92, 2009.

PAOLINO, D., VENTURA, C.A., NISTICO, S., PUGLISI, G., FRESTA, M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. **International Journal of Pharmaceutics**. 244, 21–31, 2002.

PATZ, J. A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A. Y. Effects of environmental change on emerging parasitic disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 1395-1405, 2000.

PAULA, C. D.R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo de eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20 mg SbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento de forma cutânea da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 365-371, 2003.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis, na emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, p. 1032-1039, 2010.

PENG, J.; JACKSON, E.M.; BABINSKI, D.J.; RISINGER, A.L.; HELMS, G.; FRANTZ, D.E.; MOOBERRY, S.L. Evelynin, a cytotoxic benzoquinone-type retro-dihydrochalcone from *Tacca chantrieri*. **J. Nat. Prod.**, v.73, 1590-1592, 2010.

PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J-P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p.177-187, 1999.

PINERO, J.; TEMPORAL, R. M.; SILVA-GONÇALVES, A. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; OLIVA, A.; PERERA, A.; LEON, L. L.; VALLADARES, B. New administration model of trans-chalcone biodegradable polymers for the treatment of experimental leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 98, p. 59-65, 2006.

PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p.354-357, 2006.

PRIMO, F. L., RODRIGUES, M. M. A., SIMIONI, A. R., BENTLEY, M. V. L. B., MORAIS, P. C. e TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. e211–e214, 2008.

PRISTA, L.N.; BAHIA, M.F.G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. 1. ed. Porto: Associação Nacional de Farmácias, 1992.

RAM, V. J.; SAXENA, A. S.; SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, S. Oxygenated chalcones and bischalcones as potential antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 2159-2161, 2000.

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

RECHWALD, C.; SHIMONY, O.; DUNKEL, U.; SACERDOTI-SIERRA, N.; JAFE, C.; KUNICK, C. 2-(3-aryl-3-oxopropen-1-yl)-9-tert-butyl-paullones: a new antileishmanial chemotype. **J. Med Chem.**, v.51, p.659-665, 2008.

REY, L. Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 349,1992.

RICHARD, J.V.; WERBOVETZ, K.A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.14, p. 447-455, 2010.

ROBERTS, W. L. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexam and trypanosomatid parasitic protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 126, p. 129-142, 2003.

ROBIN, O., BLANCHOT, V., VUILLEMARD, J.C., PAQUIN, P. Microfluidization of dairy model emulsions. I. Preparation of emulsions and influence of processing and formulation on the size distribution of milk fat globules. **Lait**, v. 72, n. 6, p. 511-531, 1992.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v.12, p. 514-535, 2005.

RODRIGUES, A. T. *et al.* Síntese e ação antinociceptivo de chalconas substituídas. Livro de Resumos da 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, AS – 016, 1998.

ROLAND, I.; PIEL G., DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation designInternational. **Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85–94, 2003.

RUKTANONCHAI, U., BEJRAPHA, P., SAKULKHU, U., OPANASOPIT, P., BUNYAPRAPHATSARA, N., JUNYAPRASERT, V. e PUTTIPIPATKHACHORN, S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, p. 227-234, 2009.

SADURNÍ, N., SOLANS, C., AZEMAR, N., GARCÍA-CELMA, M.J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 5, p. 438-445, 2005.

SAE – Sistematização da Assistência de Enfermagem.

[http://enfermagem-sae.blogspot.com/2009\\_04\\_01\\_archive.html](http://enfermagem-sae.blogspot.com/2009_04_01_archive.html) (acesso, janeiro de 2011)

SAKULKU, U., NUCHUCHUA, O., UAWONGYART, N., PUTTIPIPATKHACHORN, S., SOOTTITANTAWAT, A. e RUKTANONCHAIU. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p.105-111, 2009.

SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D. Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucamine, with liposomal amphotericin. **B. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 125-128, 1997a.

SAMPAIO, R. N.; MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis unresponsive to pentavalent antimonial therapy successfully treated with ambisome. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, p. 77-87, 1997b.

SAMPAIO DE SOUSA, A. R.; SILVA, R.; TAY, F. H.; SIMPLICIO, A. N.; KAZARIAN, S. G.; DUARTE, C. M. M. Solubility enhancement of trans-chalcone using lipid carriers and supercritical CO<sub>2</sub> processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 48, p. 120-125, 2009.

SASHIDHARA, K.V.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; SARKAR, J.; SINHA, S. Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, p. 7205-7211, 2010.

SCHMID, M. H; KORTING, H. C. Liposomes for atopic dry skin: the rationale for a promising approach. **Clinical Investigation**, v. 71, p. 649-653, 1993.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; FRIEDMAN, D. I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p.687-692, 1995.

SCOTT, D.; CLEYMER, J. Estimation of Distribution Coefficients From the Partition Coefficient and pKa. **Pharmaceutical Technology**, p. 30-40, 2000.

SERENO, D.; LEMESRE, J. L. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 41, p. 972, 1997.

SERRANO-MARTÍN, X.; PAYARES, G.; DE LUCCA, M.; MARTINEZ, J.; MENDONZA-LÉON, A.; BENAÏM, G. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a

murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 53, p. 5108-5113, 2009.

SILVA, C.A.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, H.F. Caracterização físico-química de nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, p.17-21, 2006.

SILVA, A. P. C, KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V. L., TEIXEIRA, H. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. **Pharmazie**, v. 62, p. 732-734, 2007.

SILVA, A.P.C.; NUNES, B.R.; OLIVEIRA, M.C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v. 64, p. 32-35, 2009.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAESSE, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions-effects of electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 252, p. 123-132, 2003.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro, cap. 3, p.67-135, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. rev. ampl. – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SING, S. e SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J.Postgrad. Med.**, v. 49, p. 55-60, 2003.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. J. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, p. 307-315, 2004.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, p. 145-149, 2004.

SOUZA, A.M.T.; CASTRO, H.C.; BRITO, M.A.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; MAGALHÃES, U.; OLIVEIRA, K.N.; SILVA, D.G.; PACHECO, L.K.; JOUSSEF, A.C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O.; SANTOS, D.O.; ALBUQUERQUE, M.G.; RODRIGUES, C.R.; NUNES, R.J. Leishmania amazonensis Growth Inhibitors: Biological and Theoretical Features of Sulfonamide 4-Methoxychalcone Derivatives. **Curr Microbiol**, v.59, p. 374-379, 2009.

SURYAWANSHI, S.; CHANDRA, N.; KUMAR, P.; PORWAL, J.; GUPTA, S. Chemoterapy of leishmaniasis part VIII: synthesis and bioevaluation of novel chalcones. **Eur J Med Chem.**, v.43, p.2473-2478, 2008.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

TAGNE, J.B.; KAKUMANU, S.; NICOLOSI, R.J. A Nano-emulsion Formulation of Tamoxifen Increases Its Efficacy in a Breast Cell Line. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, p.1055-1063, 2008.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). **Journal of Microencapsulation**. v. 25, n.2, p. 111-120, 2008.

TEIXEIRA, H.; MARTINI, E., SILVEIRA, A.M. da; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos antisense através da técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 89-93, 2002.

TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, FERNANDES, J. B.; FO, E. R.; OLIVA, G.; PIRANI, J.R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnífica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 55, p. 643-651, 2000.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, A. M. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1234-1241, 1999a.

TORRES-SANTOS, E. C.; RODRIGUES, J. M.; JR.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, A. M. C.; ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly (D,L-lactide) nanoparticles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43(7), p. 1776-1778, 1999b.

TRAU, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p.79-98, 2000.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2002.

USP31/NF26. United States Pharmacopeia & National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

USP31/NF26. United States Pharmacopeia & National Formulary. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VAN DER SNOEK, E.M.; ROBINSON, D.J.; VAN HELLEMOND, J.J.; NEUMANN, H.A. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Journal Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v.22, p. 918-922, 2008.

VARGAS, B.A. Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína: Estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

VEGA-LOPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 97-101, 2003.

VIANNA, G. O. Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, 4, 426, 1912.

VIEGAS, J.C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Curr. Med. Chem.**, p.1829, 2007.

WALSH, J.J.; BELL, A. **Curr. Pharm. Des.**, v.15, p.2970, 2009.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 20, p. 131-145, 1996.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J. Ethno-pharmacol.**, v. 78, p. 193-200, 2001.

WERKEMA, M. C. C. **Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, p.143-184, 1996.

WHO - World Health Organization Statistical Information System Website - <http://www.who.int/whosis/en/index>. (acesso em maio, 2009).



WU, J. H.; WANG, X. H.; YI, Y. H.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 1813-1815, 2003.

YILMAZ, E., BORCHERT, H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.60, n.1, p. 91-98, 2005.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 232-238, 2006.

ZENG, Y., HAN, X. E GROSS, R. Phospholipid-Subclass-Specific Partitioning of Lipophilic Ions in Membrane–Water Systems, **Biochemical Journal**, v. 338, p. 651-658, 1999.

ZHAI, L.; CHEN, M.; BLOMM, J.; THEANDER, T. G.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p. 793-803, 1999.