



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO PENTAMIDINA PARA TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

HOANY MACHADO DA SILVA

SÃO CRISTÓVÃO – SE

OUTUBRO, 2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO PENTAMIDINA PARA TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO*

HOANY MACHADO DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como  
exigência para obtenção do título de Bacharel em  
Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Amélia Moreira Lira.

SÃO CRISTÓVÃO – SE

OUTUBRO, 2016

1     **NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS CONTENDO PENTAMIDINA PARA TRATAMENTO**  
2     **DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO IN**  
3                                     **VITRO**

4  
5  
6             Hoany Machado da Silva<sup>1</sup>, Rogéria de Souza Nunes<sup>1</sup> & Ana Amélia Moreira Lira<sup>1\*</sup>

7  
8     <sup>1</sup> Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, Departamento de Farmácia, Universidade  
9     Federal de Sergipe, São Cristóvão – SE, Brasil.

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23     \* **Autor correspondente:** Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe. Av.  
24     Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão-SE, Brasil. CEP: 49100-000.

25     Tel.: +55 79 21056600

26     E-mail: ana\_lira2@hotmail.com

## 27 RESUMO

28

29 A pentamidina (PTD) é um fármaco utilizado no tratamento da leishmaniose tegumentar ou  
30 cutânea. Apresenta alta toxicidade e é administrada apenas por via parenteral, em injeções  
31 intramusculares profundas. Para contornar essas limitações, uma opção é incorporar a PTD em  
32 sistemas de liberação, como os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Assim, o objetivo  
33 desse trabalho foi incorporar a PTD em CLN, caracterizar os sistemas obtidos e avaliar a liberação  
34 *in vitro* do fármaco a partir dos CLN. As nanopartículas foram obtidas pelo método de emulsão  
35 múltipla (a/o/a) associada à ultrassonicação. O tamanho das partículas, índice de polidispersividade  
36 (IPD), potencial zeta e eficiência de encapsulação foram determinados. E os estudos de liberação  
37 foram realizados em células de difusão do tipo Franz utilizando como barreira hidrofílica membrana  
38 de acetato de celulose. Como resultados, as partículas obtidas apresentaram uma variação de  
39 tamanho entre 133 e 266 nm, IPD entre 0,5 a 0,7, potencial zeta com variação entre -10 a -26 mV e  
40 eficiência de encapsulação da PTD foi de 76 %. Os estudos de liberação apresentam um perfil de  
41 liberação sustentado, liberando 36 % do fármaco em 24 horas de experimento. De acordo com os  
42 resultados apresentados, CLN contendo a pentamidina foram obtidos com êxito sugerindo estudos  
43 posteriores para avaliar o efeito leishmanicida do fármaco com diminuição da toxicidade.

44

45 Palavras-chave: Pentamidina, Leishmaniose tegumentar, Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.

46

47

48

49

50

51

52

53 **ABSTRACT**

54

55 Pentamidine (PTD) is a drug used in the treatment of cutaneous leishmaniasis. It has high  
56 toxicity and is administered only by parenteral route, for intramuscular injection. In order to  
57 overcome these limitations, one option is to incorporate PTD in delivery systems, such as  
58 nanostructured lipid carriers (CLN). The objective of this work was to incorporate PTD in CLN,  
59 characterize the obtained systems and evaluate its *in vitro* release. Nanoparticles were obtained by  
60 the method of multiple emulsion (w / o / w) associated with ultrasonication. The particle sizes,  
61 polydispersity index (IPD), zeta potential and encapsulation efficiency were determined. And the  
62 release studies were performed in Franz type diffusion cells using as the hydrophilic barrier  
63 membrane of cellulose acetate. As a result, the obtained particles had a size range between 133 and  
64 266 nm, IPD between 0.5 to 0.7, the zeta potential ranging between -10 to -26 mV and the  
65 encapsulation efficiency of PTD was 76%. The release studies presented a sustained release profile,  
66 releasing 36% of drug in 24 hour experiment. According to the results presented, CLN containing  
67 PTD were obtained successfully suggesting further studies to evaluate the leishmanicide drug effect  
68 with reduced toxicity.

69

70 **Keywords:** Pentamidine, Cutaneous Leishmaniasis, Nanostructured Lipid Carriers.

71

72

73

74

75

76

77

78

## 79 1. Introdução

80

81 A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e  
82 quando não tratada, pode ser fatal. Sua transmissão ocorre através da picada de mosquitos vetores  
83 conhecidos como flebotomíneos (Alvar *et al.*, 2012). Atualmente a leishmaniose está distribuída em  
84 áreas endêmicas de 88 países em todos os continentes. Segundo a Organização Mundial de Saúde,  
85 cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença (Who, 2014).

86 Quanto às características clínicas, esta doença pode ser classificada principalmente em  
87 Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) ou cutânea. A LT é caracterizada  
88 pela presença de uma ou mais pápulas, nódulos ou úlceras na pele e/ou mucosas. A severidade da  
89 infecção depende de uma série de fatores como por exemplo, a espécie de *Leishmania* envolvida, o  
90 número de parasitas inoculados, o sítio de inoculação e o estado nutricional e imunológico do  
91 hospedeiro (Mitropoulos, Konidas & Durkin-Konidas, 2010).

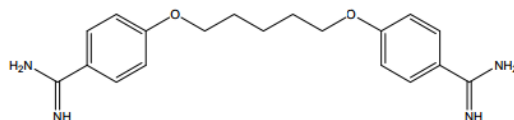
92 Entre as terapias disponíveis atualmente, o antimoniato de meglumina representa a primeira  
93 linha de tratamento para LT. Contudo, a alta taxa de efeitos adversos, a duração do tratamento e  
94 falhas na terapia de até 25%, limitam a sua utilização (Mitropoulos, Konidas & Durkin-Konidas,  
95 2010). Como opções terapêuticas de segunda escolha, são utilizados para o tratamento, o isotionato  
96 de pentamidina e a anfotericina B (Brasil, 2007). A anfotericina B é eficaz no tratamento da LT,  
97 porém, seu uso é limitado, devido a necessidade de internação hospitalar para aplicação, tratamento  
98 prolongado e graves efeitos adversos (Neves *et al.*, 2011).

99 Nesse contexto, insere-se a pentamidina (PTD) (Figura 1) (página 5), que é um composto  
100 aromático diamidinas, que apresenta atividade antiprotozoária (Diken *et al.*, 2016). A PTD é  
101 comercializada sob duas formas: o dimetanosulfonato (mesilato) e o isotionato. O isotionato de  
102 pentamidina é mais utilizado por ser menos pancreatóxico. Sua administração é realizada pela via  
103 parenteral, em injeções intramusculares profundas.

104 Figura 1: Estrutura química da PTD.

105

106



107

108

109 O tratamento com a PTD requer menor tempo e apresenta menores efeitos adversos em  
110 relação a anfotericina B (Neves *et al.*, 2011). Apesar das vantagens do uso da PTD para o  
111 tratamento da LT, é necessário o aperfeiçoamento das técnicas terapêuticas para a utilização desse  
112 fármaco, como por exemplo, a administração por uma via menos invasiva e a disponibilização do  
113 fármaco a partir de um sistema de liberação que possibilite a redução dos seus efeitos adversos. As  
114 principais reações adversas relacionadas à PTD são dor músculo-esquelética, anorexia, dor  
115 abdominal, náuseas, vômitos, tontura, mialgia, cefaleia, hipotensão, síncope e hipoglicemia  
116 (Oliveira *et al.*, 2011).

117 Sistemas de liberação controlada de fármacos, como as Nanopartículas Lipídicas (NL), tem  
118 atraído grande interesse de pesquisadores acadêmicos e industriais, visando melhorar a eficácia e a  
119 segurança das terapias parasitárias existentes (Pharm, Loiseau & Barrat, 2013). Os dois principais  
120 tipos de NL são as Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e os Carreadores Lipídicos  
121 Nanoestruturados (CLN) (Hu *et al.*, 2008).

122 As NLS são produzidas a partir da utilização de lipídios no estado sólido, como fase apolar  
123 em uma emulsão óleo/água (O/A), o processo ocorre sob aquecimento e após resfriamento é obtido  
124 um sistema matricial rígido. Essa matriz sólida protege o fármaco incorporado contra degradação  
125 química e oferece uma maior flexibilidade na modulação dos perfis de liberação do fármaco. Além  
126 disso, NLS podem ser usadas com êxito em várias vias de administração, podem carrear fármacos

127 hidrofílicos e lipofílicos, além de, aumentar a absorção de fármacos através das mucosas e da pele  
128 (Schafer-Korting, Mehnert & Korting, 2007).

129 Entretanto, as NLS apresentam algumas limitações como por exemplo, menor capacidade de  
130 carregamento e expulsão do fármaco durante estudos de estabilidade a longo prazo, o que resultou no  
131 desenvolvimento dos CLN. Os CLN são obtidos a partir de misturas entre lipídeos sólidos e  
132 lipídeos plásticos (semi sólidos) ou lipídeos líquidos, o que gera imperfeições na estrutura cristalina  
133 das nanopartículas, ocasionando uma melhor incorporação do fármaco e redução da sua expulsão  
134 durante o armazenamento, além de, apresentarem uma maior capacidade de veiculação de fármacos  
135 (Souto *et al.*, 2004).

136 Dessa forma, a encapsulação da PTD em NL é uma alternativa viável para o tratamento da  
137 LT, pois poderá resultar em diminuição da toxicidade, aumento da biodisponibilidade, além da  
138 possibilidade de administração por vias alternativas.

139 Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar uma formulação  
140 contendo PTD incorporada em um sistema nanoestruturado do tipo CLN e avaliar o perfil de  
141 liberação *in vitro* do fármaco para o tratamento da LT.

142

## 143 **2. Material e Métodos**

144

### 145 2.1. Material

#### 146 2.1.1. Solventes

147 Acetonitrila (grau – HPLC; PANREAC<sup>®</sup>); água ultrapura (milli-q); álcool etílico absoluto  
148 (ALPHATEC<sup>®</sup>).

149

150



151 2.1.2. Reagentes

152 Cera de Abelha (GM CERAS); dextrano (Iacribell, Bayer), *Phospholipon 80H* (LIPOID®);  
153 pentamidina (SIGMA-ALDRICH®); *Tween 80* (VETEC®); esqualeno (SIGMA-ALDRICH).

154

155 2.2. Preparação da formulação

156 Os CLN foram obtidos pelo método da emulsão múltipla (A/O/A), seguido pela técnica de  
157 evaporação do solvente e ultrassonicação. Inicialmente, foram preparadas uma fase aquosa interna  
158 contendo solução aquosa (com e sem dextrano 1%) e PTD; uma fase orgânica (etanol,  
159 *Phospholipon 80H*, esqualeno e cera de abelha) e uma fase aquosa externa (*Tween 80* e água). O  
160 fármaco foi solubilizado na fase interna aquosa. O lipídio sólido e o lipídio líquido foram levados a  
161 aquecimento juntamente com o *Phospholipon 80H* a uma temperatura de aproximadamente 5 °C  
162 acima do ponto de fusão do lipídio sólido (65 °C). Em seguida, a essa mistura foi adicionado 3 mL  
163 etanol e, após esse procedimento, foi adicionada a fase aquosa interna, formando uma emulsão  
164 primária. Essa emulsão foi levada ao sonicador (35 Hz) (VIBRACELL® CV18) por 2 minutos e  
165 posteriormente vertida na fase aquosa externa contendo *Tween 80* e imediatamente submetida à  
166 homogeneização em Ultra-turrax (IKA® T25, 13000 rpm) por 1 minuto. A amostra foi submetida  
167 novamente ao sonicador (35 Hz) por 5 minutos e foi resfriada em banho de gelo até atingir a  
168 temperatura de 5 °C. Em seguida, a formulação preparada foi levada à agitação magnética por 24  
169 horas em temperatura ambiente para a evaporação do solvente. A tabela 1 (página 8) mostra a  
170 concentração dos componentes utilizados para o preparo dos CLN.

171

172

173

174

175 **Tabela 1:** Composição e porcentagem dos componentes utilizados na obtenção dos CLN.

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

Composição	CLN (%)		
	CLN 1	CLN 2	CLN 3
Fármaco (PTD)	-	0,2	0,2
Cera de abelha	0,28	0,28	0,28
Esqualeno	0,12	0,12	0,12
Tween 80	1	1	1
Phospolipon	0,25	0,25	0,25
Etanol	30	30	30
Solução aquosa dextrano 1%	-	-	5
Água	5	5	-

186 2.3. Tamanho de partícula, Índice de Polidispersividade e Potencial Zeta

187 O tamanho das partículas, índice de polidispersividade (IPD) e o potencial zeta (PZ) das  
188 amostras foram determinados pelo método de espectroscopia de correlação de fóton, utilizando um  
189 Zetasizer Nano ZS (MALVERN INSTRUMENTS®, UK). As análises foram realizadas no  
190 Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia (LCNT) com a orientação do professor Dr. Frederico  
191 Guilherme de Carvalho Cunha. O laboratório está localizado no Núcleo Regional de Competência  
192 em Petróleo, Gás e Biocombustíveis de Sergipe (NUPEG) da Universidade Federal de Sergipe,  
193 Campus Professor José Aloísio de Campos (São Cristóvão, SE). As análises foram realizadas em  
194 triplicata e as amostras foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1:20.

195

## 196 2.4. Eficiência de Encapsulação

197 A determinação da eficiência de encapsulação (EE) foi realizada pelo método indireto. As  
198 dispersões de nanopartículas foram centrifugadas (4°C, 12000 rpm, 30 min) usando tubos de  
199 ultrafiltração (Ultrafree, VIVASPIN® 500, MWCO 10,000 Da) e o sobrenadante de cada amostra  
200 foi coletado, diluído adequadamente e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
201 (CLAE). As análises foram realizadas em triplicata e a EE foi calculada de acordo com a equação  
202 abaixo (Almeida *et al.*, 2012):

203

$$204 \quad EE = \frac{m1 - m2}{m1} * 100 \quad (1)$$

205

206

207 Onde: EE: Eficiência de encapsulação; m1 = quantidade inicial de PTD utilizada no preparo da  
208 formulação; m2 = quantidade de PTD presente na formulação (sobrenadante).

209

## 210 2.5. Estudo de liberação *in vitro*

211 2.5.1. Preparação das formulações de CLN e controle: CLN foram incorporados em gel de  
212 hidroxietilcelulose para facilitar a adesão da formulação sob as células de difusão. Para isso, as  
213 dispersões de CLN foram misturadas a um gel de hidroxietilcelulose 0,8% (m/m) na proporção 1:1  
214 (m/m) de gel: dispersão de CLN. A formulação controle foi obtida através da dissolução de PTD em  
215 tampão fosfato pH 7,4 (na mesma concentração das formulações de CLN), e incorporados em gel  
216 de hidroxietilcelulose.

217 2.5.2. Cinética de liberação *in vitro*: Os estudos de liberação *in vitro* da PTD foram realizados  
218 utilizando células de difusão tipo *Franz* com área de difusão de 1,77 cm<sup>2</sup> e volume do  
219 compartimento do meio receptor de 14 mL. Membranas hidrofílicas de acetato de celulose foram

220 fixadas na extremidade de cada célula (n = 3) e sobre elas foram colocadas 400 µL de formulação  
221 de CNL ou controle, e o compartimento receptor foi preenchido com uma solução de tampão  
222 fosfato pH 7,4, a qual foi mantida em temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C sob agitação magnética constante  
223 por 24 horas. Para avaliar o perfil de liberação, alíquotas (2 mL) do meio receptor foram coletadas  
224 nos intervalos de tempo de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12 e 24 horas, sendo realizada a reposição do meio  
225 receptor após cada coleta. As amostras coletadas foram filtradas em filtros de membrana PTFE de  
226 0,45 µm e analisadas por CLAE para a quantificação da PTD liberada em cada tempo.

227

## 228 2.6. Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

229 As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido (YOUNG LIN  
230 INSTRUMENT® modelo YL9100), utilizando-se detector de fluorescência. A separação  
231 cromatográfica foi realizada em modo isocrático de eluição utilizando uma metodologia validada  
232 previamente. A coluna empregada foi a Zorbax SB C18 de 100 x 4,6 mm de diâmetro (tamanho de  
233 partícula 3,5 µm) na temperatura de 35 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de  
234 acetonitrila e tampão fosfato de sódio (0,025 M; pH 3,2) na proporção de 17:83 (v / v),  
235 respectivamente. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e a absorção foi realizada em  
236 modo fluorescência com excitação em 270 nm e emissão em 345 nm. Sob essas condições, o  
237 método foi exato e preciso (CV < 5%). A linearidade foi alcançada na faixa de 0,4 - 10 µg/mL, com  
238 coeficiente de correlação  $r \geq 0,99$ , valores mínimos exigidos pela legislação vigente (Anvisa, 2003).  
239 O tempo de retenção do fármaco foi de 5,7 min.

## 240 3. Resultados e Discussão

241

### 242 3.1. Análise macroscópica, tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta

243 As formulações apresentaram uma aparência leitosa, homogênea e sem sedimentação, como  
244 pode ser visualizado na Figura 2 (página 11).

245

246 Figura 2: Aspecto visual dos CLN.

247

248

249

250

251

252

253

254



255 O tamanho das partículas, IPD e potencial zeta das dispersões obtidas estão listados na  
256 tabela 2 (página 12). Como pode ser observado, CLN de tamanho nanométrico foram obtidos. O  
257 tamanho das partículas dos CLN obtidos foram de 133 a 266 nm, com IPD de 0,5 a 0,7. Foi  
258 observado que a incorporação do fármaco promoveu um aumento do tamanho das nanopartículas.  
259 Hu *et al.*, (2008) e Prombutara *et al.*, (2012) encontraram resultados semelhantes. Nestes estudos, a  
260 incorporação do fármaco também resultou em aumento significativo do tamanho de nanopartículas  
261 estudadas.

262 O potencial zeta variou de  $|10|$  a  $|26|$  mV, considerado adequado devido a utilização de  
263 um surfactante não iônico, o Tween 80 (Venturini *et al.*, 2015) o máximo valor de potencial zeta  
264 considerado é de 30mV. Com máximo valor é possível manter a estabilidade do sistema. A  
265 incorporação do fármaco também modificou este parâmetro causando redução do valor. Vale  
266 ressaltar que a medida deste parâmetro é considerada em módulo.

267

268 **Tabela 2:** Caracterização por tamanho, IPD, PZ e EE dos CLN obtidos.

Amostra	Tamanho de partícula (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)	EE %
CLN 1	133,2	0,73	-26,6	-
CLN 2	266,2	0,49	-10,85	14,0
CLN 3	233,4	0,65	-12,5	76,2

269

270

### 271 3.2. Eficiência de encapsulação

272 A EE é um parâmetro quantitativo utilizado para calcular a quantidade de fármaco  
 273 incorporado na formulação. A EE foi calculada usando a equação 1 (Ítem 2.4). Ao analisar a  
 274 quantidade de fármaco presente no sobrenadante de CLN 2, nota-se que apenas 14% da PTD  
 275 conseguiu ser encapsulada na formulação CLN 2, indicando que os outros 86% não estariam  
 276 encapsulados.

277 Kashi *et al.*, (2012), obtiveram os mesmos problemas durante o encapsulamento de  
 278 minociclina, uma substância hidrofílica, assim como a PTD. Como alternativa para aumentar a  
 279 encapsulação do ativo, eles utilizaram dextrano 70, para diminuir a solubilidade do fármaco na fase  
 280 aquosa interna durante o processo de obtenção das nanopartículas. Os autores observaram que  
 281 houve um aumento na EE. Assim, também foi proposto o uso de dextrano 70 a fim de melhorar a  
 282 eficiência de encapsulação da PTD. Assim, foi adicionado dextrano 70 a 1% na fase interna da  
 283 formulação e foi preparada a formulação CLN 3.

284 O processo de obtenção do CLN 3 foi o mesmo utilizado anteriormente, com a adição de 1%  
 285 de dextrano 70 na fase aquosa interna. Todos os testes foram repetidos seguindo as mesmas  
 286 condições já citadas. Notou-se que a incorporação de dextrano 70 a 1% na formulação CLN 3

287 aumentou a eficiência de encapsulação. Nesse caso, houve um aumento de 14% de PTD  
288 encapsulada no CLN 2 para 76 % de PTD encapsulada no CLN3.

289

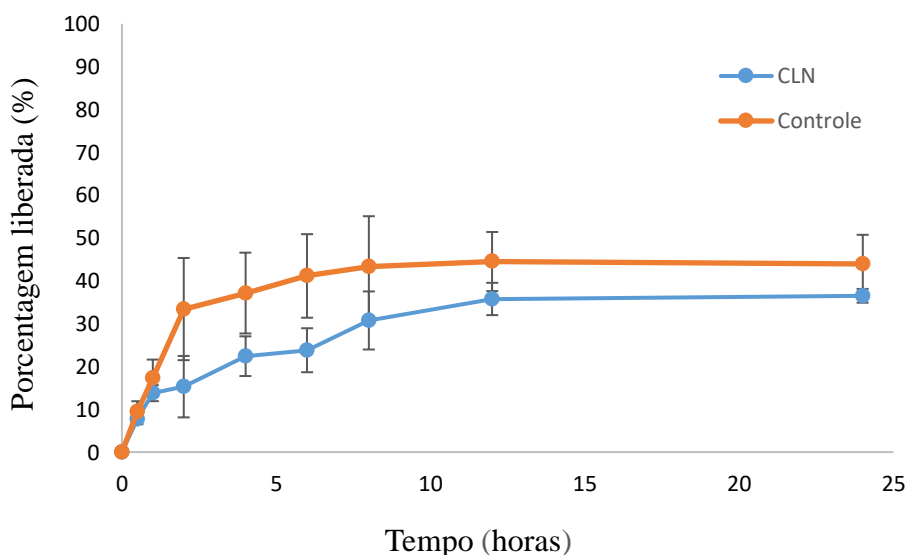
### 290 3.3. Estudos de liberação *in vitro* da PTD

291 A liberação *in vitro* da PTD incorporada nos CLN foi realizada em células de difusão do  
292 tipo Franz utilizando membranas de acetato de celulose como barreira. O perfil de liberação da PTD  
293 foi obtido com base na quantidade de fármaco liberado em função do tempo (Figura 3). O perfil da  
294 PTD apresentou uma fase *burst* de liberação, nas primeiras 2 horas de experimento, liberando 15 %  
295 da PTD. Essa fase é caracterizada pela rápida liberação do fármaco na formulação (Zhai *et al.*,  
296 2014). No entanto, até alcançar às 24 horas de experimento, a formulação apresentou uma liberação  
297 sustentada da PTD, liberando 36 %, que corresponde a 146 µg do fármaco.

298 Por outro lado, a formulação controle, não mostrou um perfil de liberação sustentado, uma  
299 vez que, permitiu a rápida liberação da PTD. O perfil de liberação da formulação controle mostrou  
300 que em apenas 2 horas de experimento, 33 % da PTD foi liberada.

301 **Figura 3:** Perfil de liberação *in vitro* da PTD. Os resultados foram expressos de acordo com a  
302 média ± desvio padrão (n= 3) das análises.

303



304

#### 305 4. Conclusão

306

307 De acordo com os resultados apresentados, os CLN obtidos pelo método de emulsão  
308 múltipla foram capazes de incorporar eficientemente a PTD quando o dextrano 70 foi utilizado na  
309 fase interna das formulações, aumentando a eficiência de encapsulação. A dispersão dos CLN  
310 exibiu tamanho nanométrico com aspecto homogêneo, sem a presença de sedimentos. Os CLN  
311 apresentaram um perfil de liberação sustentado da PTD em relação a formulação controle. Além  
312 dos experimentos realizados no nosso estudo, torna-se necessário realizar outros experimentos, tais  
313 como, Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Calorimetria Exploratória Diferencial,  
314 estudo de permeação *in vitro*, citotoxicidade e atividade leishmanicida com CLN, para garantir o  
315 potencial da formulação para o tratamento da LT.

316

#### 317 5. REFERÊNCIAS

318 Almeida EDP, Costa AA, Serafini MR, Rossett FC, Marchetti JM, Sarmiento VHV, Nunes RS,  
319 Valerio MEG, Araújo AAS, Lira AAM. Preparation and characterization of chloroaluminum  
320 phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles by thermal analysis and powder X-ray diffraction  
321 techniques. *J. Therm. Anal. Calorim.* 108: 191 – 196, 2012.

322

323 Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer, M. Leishmaniasis  
324 Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5): 356 - 371, 2012.

325

326 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria  
327 Colegiada (RDC) nº 299, de 23 de maio de 2003.

328



329 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da  
330 Leishmaniose Tegumentar Americana. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. 2 ed. atual. Editora do  
331 Ministério da Saúde, Brasília, p. 180,2007.

332

333 Diken AI, Diken OE, Hanedan O, Yilmaz S, Ecevit AN, Erol E, Yalçinkaya A. Pentamidine in  
334 *Pneumocystis jirovecii* prophylaxis in heart transplant recipients. *World. J. Transplant.* 6(1): 193-  
335 198, 2016.

336

337 Hu FQ, Zhang Y, Du YZ, Yuan H. Nimodipine loaded lipid nanospheres prepared by solvent  
338 diffusion method in a drug saturated aqueous system. *Int. J. Pharm.* 348: 146-152, 2008.

339

340 Kashi TS, Eskandarion S, Esfandyari-Manesh M, Marashi SM, Samadi N, Fatemi SM, Atyabi F,  
341 Eshraghi S, Dinarvand R. Improved drug loading and antibacterial activity of minocycline-loaded  
342 PLGA nanoparticles prepared by solid/oil/water ion pairing method. *Int. J. Nanomedicine.* 7: 221-  
343 234, 2012.

344

345 Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New world cutaneous leishmaniasis: updated review  
346 of current and future diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 63: 309-322, 2010.

347

348 Neves LO, Talhari AC, Gadelha EPN, Júnior RMS, Guerra JAO, Ferreira LCL, Talhari S. Estudo  
349 clínico randomizado comparando antimonialato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o  
350 tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *An. Bras. Dermatol.*  
351 86(6): 1092-1101, 2011.

352

353 Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi M Z, Andrade CA.  
354 Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World.  
355 *Acta Tropica*. 118: 87-96, 2011.

356

357 Pharm TTH, Loiseau PM, Barrat G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial  
358 treatment. *Int. J. Pharm.* 454: 539-552, 2013.

359

360 Prombutara P, Kulwatthanasal Y, Supaka N, Sramala I, Chareonpornwattana S. Production of nisin-  
361 loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*. 24: 184–190,  
362 2012.

363

364 Schafer – Korting M, Mehnert , Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application  
365 of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 427-443, 2007.

366

367 Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. Development of a controlled release formulation  
368 based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278: 71-77, 2004.

369

370 Venturini CG, Bruinsmann FA, Contri RV, Fonseca FN, Frank LA, D’Amore C M, Raffin RP,  
371 Buffon A, Pohlmann AR, Guterres SS. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel  
372 nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. *Eur. J. Pharm. Sci.* 79: 36-  
373 43, 2015.

374

375 WORLD HEALTH ORGANITATION (WHO). Disponível em:  
376 <<http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: Outubro 2016.

377

378 Zhai Y, Yang X, Zhao L, Wang Z, Zhai G. Lipid nanocapsules for transdermal delivery of  
379 ropivacaine: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Int. J. Pharm.* 471: 103–111, 2014.