



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS



Suely Moraes Alves

**Desenvolvimento de Sistemas Estabilizados por Tensoativos para a Administração  
Tópica de Lapachol no Tratamento de Leishmaniose**

Itabaiana – SE

2022

Suely Moraes Alves

**Desenvolvimento de Sistemas Estabilizados por Tensoativos para a Administração  
Tópica de Lapachol no Tratamento de Leishmaniose**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade Federal de Sergipe, como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais.

**Orientador:** Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmento

**Coorientadora:** Profa. Dra. Ana Amélia Moreira Lira

Itabaiana – SE

2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA PROFESSOR ALBERTO CARVALHO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A474d Alves, Suely Moraes

Desenvolvimento de sistemas estabilizados por tensoativos para a administração tópica de lapachol no tratamento de Leishmaniose / Suely Moraes Alves; orientação: Victor Hugo Vitoriano Sarmiento. – Itabaiana, 2022.  
50 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Ciências naturais. 2. Leishmaniose. 3. Lapachol. I. Sarmiento, Victor Hugo Vitoriano. (orient.). II. Título.

CDU 616.993.161

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Desenvolvimento de Sistemas Estabilizados por Tensoativos para a Administração  
Tópica de Lapachol no Tratamento de Leishmaniose**

Suely Moraes Alves

APROVADA pela banca examinadora composta por:

---

**Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmiento**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais  
Universidade Federal de Sergipe

---

**Profa. Dra. Renata Cristina Kiatkoski kaminski**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais  
Universidade Federal de Sergipe

---

**Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella**

Departamento de Morfologia  
Universidade Federal de Sergipe

Itabaiana – SE

2022

*“A Deus, à minha família, a todos meus professores, aos meus colegas e a todos aqueles que, de alguma forma, somaram na realização deste trabalho. Dedico a vocês.”*

## AGRADECIMENTOS

Gratidão, a Deus Pai, Filho e Espírito Santo. Que não rejeitou a minha oração nem afastou de mim o seu Amor. Pelo dom da vida, por se fazer presente em todos os momentos, por me ter dotado de saúde, sabedoria, força e disposição. Que mais direi? Faltaria páginas para descrever a minha Eterna Gratidão.

Aos meus pais, Antônio e em especial Maria Nazaré. Por ter batalhado junto comigo nessa jornada e por todo o seu esforço investido na minha educação. Meu exemplo de mulher, garra, dedicação, coragem, persistência. Meu muito obrigada, Mãe! Aos meus irmãos Samuel, Israel, Suele, Manoel e Daniel, pelo incentivo, contribuição e apoio durante essa jornada.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo, pela orientação, compreensão, atenção e incentivo durante a trajetória acadêmica, desde a iniciação científica até essa etapa da pós-graduação, por sempre estar presente indicando a direção correta e por ter acreditado em meu desempenho. A Profa. Dra. Ana Amélia, pela coorientação, acolhimento, discussão de resultados, por prontamente me ajudar sempre que a procurei.

Ao doutorando Guilherme pelos ensinamentos na síntese, análises e tratamento de dados, sua ajuda foi essencial no desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigada! A todos que fazem parte do Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico e Nanotecnologia (LADEFNT-UFS), à Quésia pelos conhecimentos compartilhados.

De forma geral, agradeço aos laboratórios parceiros, em especial ao Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM), pelo acesso ao reômetro. À doutoranda Rhayza do Laboratório de Estudos da Matéria Orgânica natural (LEMON-UFS) pelas análises de HPLC. Ao Prof. Dr. Fernando Aécio do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da UFP, juntamente com seus alunos, pelas análises de citotoxicidade das amostras enviadas. Ao pessoal da UNESP-IQ que fez as análises de SAXS.

Ao Laboratório de Pesquisa de Materiais Híbridos (LPMH-UFS), do qual faço parte desde a iniciação científica, a todos que fizeram e fazem parte dos momentos compartilhados durante o laboratório. Aos “best colegas”, pelos momentos de descontração.

A todos os professores, secretários e colegas da turma inaugural do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN), pelo comprometimento, dedicação, ensinamento, aprendizado. Meu muito obrigado!

A Profa. Dra. Renata Kaminski pelas contribuições no Exame de Qualificação e Defesa. Ao Prof. Dr. Silvio Dolabella pelas contribuições no Exame de Defesa. Obrigada por aceitarem o convite.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Sergipe, que sempre me atenderam com imenso cuidado e atenção. Também agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE).

*“Ninguém se engane a si mesmo: se alguém dentre vós se tem por  
sábio neste mundo, faça-se louco para ser sábio”  
(1Coríntios 3: 18).*

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada, ocasionada por mais de 20 espécies de *Leishmania* e que se manifesta em duas formas principais, tegumentar (cutânea ou mucocutânea) ou visceral. O tratamento desta enfermidade requer longa duração, alto custo e pode apresentar vários efeitos adversos. Uma alternativa seria o uso de compostos naturais, como o lapachol, que possui atividade leishmanicida e características interessantes para aplicação tópica. Dessa forma, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar formulações a partir de sistemas estabilizados por tensoativos contendo lapachol para avaliação da atividade leishmanicida frente à promastigotas de *Leishmania* spp. As formulações foram preparadas por meio do diagrama de fase, utilizando água destilada, óleo essencial de *Citrus sinensis* como fase oleosa, e Tween 20:Eumulgin Co 40, como tensoativo e co-tensoativo, respectivamente, que foram combinados na proporção de 1:1 e 2:1. Em seguida, duas formulações obtidas do diagrama que apresentou maior área de formação de sistemas nanoestruturados (proporção 2:1) foram selecionadas: O5TC25A70 (sistema líquido transparente) e O5TC45A50 (sistema viscoso transparente). O lapachol foi incorporado nas formulações e a caracterização estrutural dos sistemas foi realizada por meio de análises de microscopia de luz polarizada (MLP), reológicas e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Em seguida, as formulações foram submetidas a ensaios de permeação cutânea *in vitro*, avaliação da citotoxicidade em macrófagos RAW e determinação da atividade leishmanicida sobre formas promastigotas das espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*. Como resultados, as formulações apresentaram isotropia e comportamento newtoniano, característico de microemulsões. Os resultados do SAXS confirmaram a formação das microemulsões. As formulações apresentaram efeito promotor de permeação na pele, principalmente a formulação O5TC25A70, capaz de aumentar quatro vezes a quantidade permeada de lapachol na pele após 24h de experimento em comparação ao controle. Nos ensaios biológicos foi observada baixa citotoxicidade em macrófagos e atividade leishmanicida de 100 a 383  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para as formulações. Além disso, foi observado uma melhoria na atividade do lapachol com o óleo essencial de *C. sinensis* na formulação O5TC45A50L. Dessa forma, as microemulsões obtidas podem, portanto, representar veículos promissores para administração tópica e tratamento da leishmaniose cutânea.

**Palavras chaves:** Leishmaniose, lapachol, diagrama de fases, administração tópica.

## ***ABSTRACT***

Leishmaniasis is a neglected infectious disease, caused by more than 20 species of *Leishmania* and which manifests itself in two main forms, tegumentary (cutaneous or mucocutaneous) or visceral. The treatment of this disease requires long duration, high cost and can have several adverse effects. An alternative would be the use of natural compounds, such as lapachol, which has leishmanicidal activity and interesting characteristics for topical application. Thus, this study aimed to develop and characterize formulations from systems stabilized by surfactants containing lapachol to evaluate the leishmanicidal activity against *Leishmania* spp promastigotes. The formulations were prepared using the phase diagram, using distilled water, *Citrus sinensis* essential oil as the oil phase, and Tween 20:Eumulgin Co 40, as surfactant and co-surfactant, respectively, which were combined in a 1:1 ratio. and 2:1. Then, two formulations obtained from the diagram that presented the largest area of formation of nanostructured systems (ratio 2:1) were selected: O5TC25A70 (transparent liquid system) and O5TC45A50 (transparent viscous system). Lapachol was incorporated into the formulations and the structural characterization of the systems was performed by means of polarized light microscopy (MLP), rheological and low angle X-ray scattering (SAXS) analyses. Then, the formulations were submitted to in vitro skin permeation assays, evaluation of cytotoxicity in RAW macrophages and determination of leishmanicidal activity on promastigote forms of *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* species. As a result, the formulations showed isotropy and Newtonian behavior, characteristic of microemulsions. The SAXS results confirmed the formation of microemulsions. The formulations showed a permeation-promoting effect on the skin, mainly the formulation O5TC25A70, capable of increasing four times the permeated amount of lapachol in the skin after 24h of the experiment compared to the control. In the biological assays, low cytotoxicity in macrophages and leishmanicidal activity from 100 to 383  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  were observed for the formulations. In addition, an improvement in the activity of lapachol was observed with the essential oil of *C. sinensis* in the formulation O5TC45A50L. Thus, the microemulsions obtained may therefore represent promising vehicles for topical administration and treatment of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Leishmaniasis, lapachol, phase diagram, topical administration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. ....	17
<b>Figura 2:</b> Manifestações clínicas da leishmaniose. A) Leishmaniose visceral B) Leishmaniose cutânea C) Leishmaniose mucocutânea. ....	18
<b>Figura 3:</b> Estrutura do lapachol. ....	22
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura do tensoativo ....	22
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática dos tipos de microemulsão (a) óleo/água; (b) água/óleo e (c) bicontínua.....	26
<b>Figura 6:</b> Diagrama de fases pseudoternário Tween 20, Eumulgin Co 40, OECS e água destilada, utilizados como tensoativo, co-tensoativo, fase oleosa e fase aquosa, respectivamente. Diagrama A) Eumulgin Co 40: Tween 20 (1:1), B) Eumulgin Co 40: Tween 20 (2:1) e C) Eumulgin Co 40: Tween 20 (2:1) região destacada de escolha para incorporar o lapachol. SLT: Sistemas Líquido-Transparentes, SVT: Sistemas Viscoso-Transparentes e SNT: Sistemas Não Transparentes. ....	37
<b>Figura 7:</b> Aspecto visual das formulações escolhidas após 5 dias de preparação. O5TC45A50 (A), O5TC45A50L (B), O5TC25A70 (C), O5TC25A70L (D). ....	39
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografias das amostras O5TC45A50 (A), O5TC45A50L (B), O5TC25A70 (C), O5TC25A70L (D) obtidas por microscopia de luz polarizada. ....	39
<b>Figura 9:</b> Reogramas do comportamento reológico das formulações (A) O5TC45A50 e O5TC45A50L, (B) O5TC25A70 e O5TC25A70L.....	40
<b>Figura 10:</b> Análise SAXS para as formulações (A) O5TC45A50, O5TC45A50L; (B) O5TC25A70, O5TC25A70L. ....	42
<b>Figura 11:</b> Perfil de permeação do lapachol a partir das formulações (O5TC25A70L e O5TC45A50L) (A) e retenção do lapachol nas camadas da pele e na solução receptora após 24 h (B). Q24: Quantidade de permeação em 24h, SC: Stratum Corneum (estrado córneo) e EP (Epiderme)+D (Derme).....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Relação de reagentes utilizados na síntese das formulações. ....	29
<b>Tabela 2:</b> Componentes voláteis do óleo essencial de <i>C. sinensis</i> extraído. ....	35
<b>Tabela 3:</b> Composição centesimal dos sistemas obtidos a partir do diagrama de fases C. FO: Fase Oleosa, T/Co-t: Tensoativo/Co-tensoativo, FA: Fase Aquosa, LAP: Lapachol. ....	38
<b>Tabela 4:</b> Relação da viscosidade reológico das formulações, onde $\eta$ : viscosidade e $R^2$ : coeficiente de correlação. ....	41
<b>Tabela 5:</b> Concentração Inibitória Média ( $IC_{50}$ ) contra formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> e Concentração Citotóxica Média ( $CC_{50}$ ) sobre Macrófagos RAW, das formulações, Lapachol e OECS. ....	44

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 LEISHMANIOSE.....	17
2.2 LAPACHOL.....	21
2.3 ADMISTRAÇÃO TÓPICA.....	23
2.4 SISTEMAS ESTABILIZADOS POR TENSOATIVOS PARA ADMISTRAÇÃO TÓPICA.....	24
2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1 REAGENTES.....	29
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS SINENSIS</i> (OECS).....	29
4.2.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO OLÉO ESSENCIAL.....	29
4.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASE PSEUDOTERNÁRIO.....	30
4.4 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES E INCORPORAÇÃO DO LAPACHOL.....	30
4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES.....	31
4.5.1 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP).....	31
4.5.2 ANÁLISE REOLÓGICA DE FLUXO.....	31
4.5.3 ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS).....	32
4.6 ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	32
4.6.1 PREPARAÇÃO DA PELE.....	32
4.6.2 PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	32
4.6.3. ENSAIO DE RETENÇÃO DA PELE.....	33
4.6.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	33
4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS FORMULAÇÕES.....	34
4.7.1 CITOTOXICIDADE SOBRE MACRÓFAGOS.....	34
4.7.2 DETERMINAÇÃO DA CI 50 EM PROMASTIGOTAS.....	34
4.7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>CITRUS SINENSIS</i> .....	35

<b>5.2 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES POR MEIO DO DIAGRAMA DE FASES .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES .....</b>	<b>39</b>
<b>5.4 ENSAIO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA .....</b>	<b>43</b>
<b>5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....</b>	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um conjunto de doenças infecciosas que afetam milhares de pessoas ao redor do mundo, principalmente as mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde, concentradas nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Dentre as 20 DTNs listadas pela Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses apresentam uma incidência de aproximadamente dois milhões de novos casos por ano (PAHO, 2020; WHO, 2022).

As leishmanioses são ocasionadas por parasitos da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, e se manifestam em duas formas clínicas principais: tegumentar (cutânea ou mucocutânea) e visceral (PAHO, 2020; WHO, 2022). Normalmente, o tratamento das leishmanioses consiste na administração por via intramuscular e/ou endovenosa do fármaco antimoniatado de meglumina (Glucantime®) (COSTA et al., 2017), anfotericina B e da sua formulação lipossomal, porém estes apresentam efeitos adversos, custo elevado e a sua utilização requer hospitalização. Tratamentos com miltefosina oral são encorajadores; no entanto, este fármaco apresenta potencial teratogênico e não deve ser administrado em mulheres grávidas ou em idade fértil (BRIONES NIEVA et al., 2021).

Diante das limitações citadas, a procura de novos fármacos que sejam efetivos no combate ao parasito nos hospedeiros mamíferos, que sejam economicamente viáveis e que possam ser administrados por vias menos dolorosas torna-se necessária. Uma alternativa seria o uso de produtos naturais com a possibilidade de serem usados por vias de administração alternativas (PERES et al., 2017; SANTOS et al., 2020).

O lapachol, um composto natural da classe das naftoquinonas, possui diversas atividades farmacológicas (PEREIRA et al., 2020; PERTINO et al., 2020; LOPES et al., 2021; MENDES MIRANDA et al., 2021), dentre elas, atividade leishmanicida (ARAÚJO et al., 2019; BRIONES NIEVA et al., 2021). Suas características lipofílicas facilitam a sua penetração na bicamada lipídica de membranas celulares e, conseqüentemente, estes compostos podem produzir alterações importantes nas células e na estrutura da membrana mitocondrial de diferentes patógenos, modificando assim sua integridade e permeabilidade (TABOSA et al., 2018; LOPES et al., 2021). Na literatura, há estudos que demonstram a viabilidade do lapachol no tratamento tópico, inclusive no tratamento da leishmaniose (LIRA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2019; PEREIRA et al., 2020; PERTINO et al., 2020).

A administração tópica de fármacos é uma via alternativa da administração oral e oferece vantagens como diminuição dos efeitos colaterais, no entanto, pode levar à ocorrência de irritações ou alergias na pele. Desta forma, alguns sistemas de liberação de fármacos têm se destacado como efetivos promotores de permeação, gerando níveis maiores do fármaco dentro e/ou através da pele e, assim, melhorando a sua eficácia após administração cutânea (ITA, 2017).

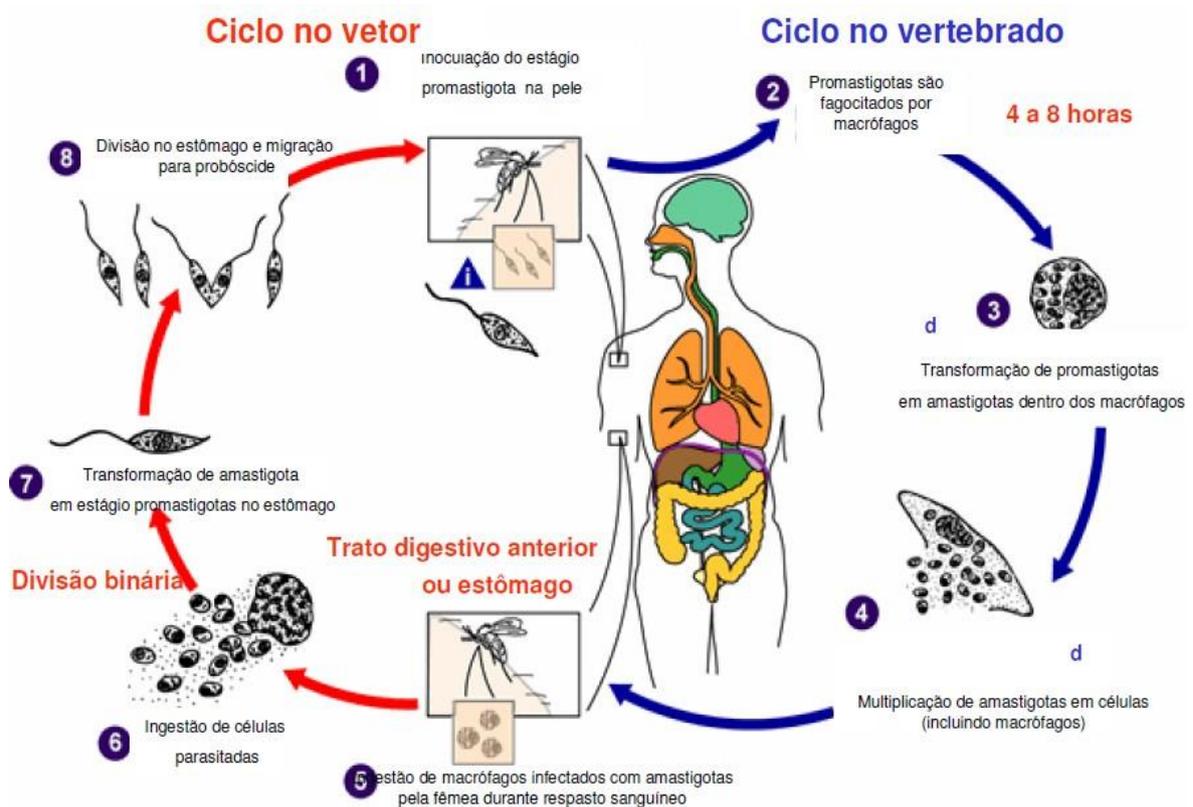
As microemulsões são um tipo de sistema nanoestruturado estabilizado por tensoativos que tem se destacado por conferir todas as vantagens mencionadas, além de potencializar o efeito biológico de fármacos e compostos bioativos (SUGUMAR et al., 2014; ITA, 2017; PAVONI et al., 2019; LAOTHAWEERUNGSAWAT et al., 2020; ARAUJO et al., 2022). Neste contexto, este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas estabilizados por tensoativos para a administração tópica do lapachol e avaliação da atividade leishmanicida frente à promastigotas de *Leishmania* spp.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários flagelados de diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia* se infectam ao realizar a hematofagia em reservatórios silvestres (raposas, marsupiais, primatas e roedores) ou domésticos (cães) contaminados. Durante o ciclo de vida (Figura 1), o parasito se apresenta em duas formas: promastigotas e amastigotas (CDC, 2020; WHO, 2022).

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



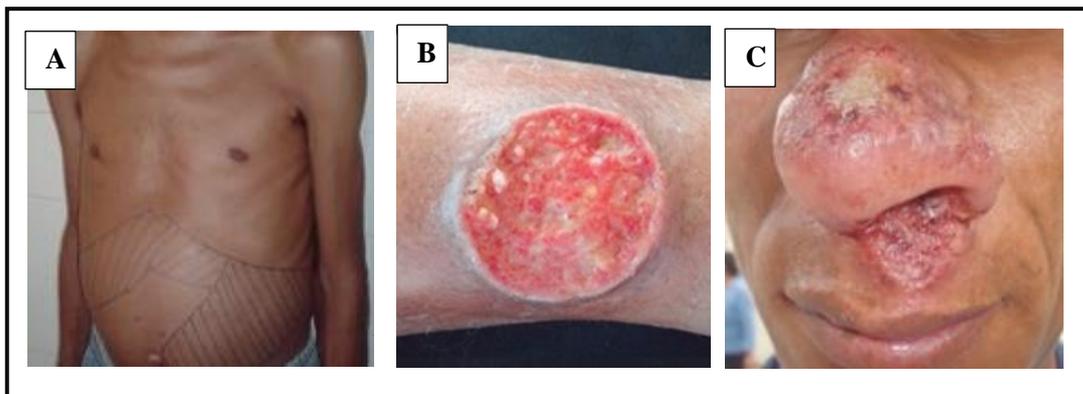
**Fonte:** Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (CDC, 2020).

No ciclo evolutivo, a transmissão da doença ocorre quando o inseto flebotomíneo (fêmea) infectado realiza a hematofagia no hospedeiro. Neste, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos, células dendríticas e/ou neutrófilos atraídos ao local da picada na pele. Os promastigotas, então, se transformam em amastigotas, que se

multiplicam por divisão simples e infectam novas células fagocíticas mononucleares. Durante o repasto sanguíneo, novos flebotomíneos são infectados pela ingestão de células parasitadas. Nesses flebotomíneos, amastigotas ingeridas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino e migram para a probóscide do inseto, onde são acumulados até serem injetados na derme do hospedeiro no próximo repasto sanguíneo (CDC, 2020).

As manifestações clínicas da doença dependem de interações complexas relacionadas ao parasito, à resposta imunológica e à genética do hospedeiro, entre outros fatores. Deste modo, os sintomas podem variar desde infecções assintomáticas ou subclínicas à lesões tardias de mucosas (CRUZ et al., 2018). As formas clínicas (Figura 2) principais que as leishmanioses podem manifestar são a leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar e forma mais grave da doença; leishmaniose cutânea (LC), a mais comum; e leishmaniose mucocutânea (LMC) (WHO, 2021).

**Figura 2:** Manifestações clínicas da leishmaniose. A) Leishmaniose visceral B) Leishmaniose cutânea C) Leishmaniose mucocutânea.



**Fonte:** Adaptado (WHO, 2021).

A LV é a forma mais severa, na qual os parasitas migram para órgãos vitais. É uma doença crônica caracterizada por febre prolongada, aumento do fígado e baço, perda de peso, fraqueza, redução da força muscular e anemia. Apresenta alta mortalidade quando não tratada, sendo os órgãos mais acometidos fígado, linfonodos e medula óssea (VASCONCELOS et al., 2018; CHEN et al., 2020; SANTIAGO et al., 2021).

A leishmaniose tegumentar (LT) apresenta-se de maneira variada, desde formas inaparentes até ulcerações de pele, que podem ser discretas ou extensas (GÓMEZ-ZAFRA et al., 2020). A LC é a apresentação clínica mais frequente, caracterizada por

lesões ulceradas, de bordos elevados e circulares com pouca secreção e indolores, localizadas na parte exposta do corpo. As lesões podem ou não se curar espontaneamente, sendo que a cura acontece em 90% dos casos de 3 a 18 meses (CRUZ et al., 2018).

A LMC, por sua vez, geralmente ocorre após meses ou anos da resolução de lesões causadas pela forma cutânea. Os sintomas iniciais são não específicos, tornando o diagnóstico difícil. As lesões podem causar danos severos às membranas mucosas do nariz, boca e garganta e os tecidos ao seu redor (GÓMEZ-ZAFRA et al., 2020).

Essas doenças são negligenciadas e sua área de abrangência coincide com o mapa econômico, social e climatológico do local. Estima-se que mais 20 espécies de *Leishmania* possam ser transmitidas aos seres humanos por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. As espécies *Leishmania major* e *Leishmania tropica* são as principais causas de LC no velho mundo, enquanto *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* são responsáveis por infecções por LC no novo mundo. A LMC é causada principalmente por *Leishmania braziliensis*, embora espécies adicionais (*Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis*) também tenham sido descritas. No subcontinente indiano, Ásia e África Oriental, a LV é causada por *Leishmania donovani*, enquanto *Leishmania infantum* é responsável por infecções na Europa, Norte da África e América Latina (CHEUKA et al., 2017).

Estima-se que mais de 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, que dois milhões de casos ocorram anualmente e que 350 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (WHO, 2022). Embora estes dados sejam repetidamente citados pela literatura (CRUZ et al., 2018; CHEN et al., 2020; DE SOUZA et al., 2020), muito provavelmente são subestimados, visto que muitas nações endêmicas não possuem um sistema de notificação compulsória. Além disso, a ocorrência de casos em regiões remotas e a dificuldade para o diagnóstico correto são obstáculos para um controle efetivo das leishmanioses (DE SOUZA et al., 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 98 países são endêmicos para leishmaniose, sendo reportados 71 países endêmicos para LV e LC, 8 países apenas para LV e 19 países para LC. Desde 2013, a OMS tem divulgado o número de novos casos, visando monitorar as tendências de incidência e prevalência da doença. Cerca de 87% dos casos globais de LV foram relatados em oito países: Brasil, Eritreia, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em 2020, sete países relataram mais de 5.000 casos de LC: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Paquistão e República

Árabe Síria, que juntos respondem por 80% da incidência global da LC relatada. Em 2020, houve 880 casos de LC para 99 casos de LV relatados globalmente (WHO, 2021).

No Brasil, a leishmaniose tegumentar apresenta ampla distribuição com registro de casos em todos os estados, ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias; entretanto, a maioria dos casos é observada em indivíduos maiores de 10 anos e do sexo masculino. Em 2020, o Brasil notificou o maior número de casos, cerca de 16.432, em relação a países como Colômbia (6.161), Peru (4.178), Nicarágua (3.443) e Bolívia (2.059), que juntos representaram 81% dos casos da Região (OPAS, 2021).

Em média, no Brasil, são registrados cerca de 21.000 casos/ano de LT com coeficiente de incidência de 8,6 casos/habitantes nos últimos cinco anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente (46,4 casos /100.000 habitantes), seguido da região Centro-Oeste (17,2 casos /100.000 habitantes) e Nordeste (8 casos /100.000 habitantes) (OPAS, 2021). No estado de Sergipe, entre 2007 a 2017, foram protocolados 746 casos das duas formas de leishmanioses, sendo 666 casos (89,3%) de LV e 80 casos (10,7%) de LT (PANTALEÃO et al., 2018).

A prevenção e tratamento das leishmanioses é um grande desafio devido ao difícil controle do inseto vetor e inexistência de vacina efetiva para humanos contra a doença. O tratamento clássico requer a administração de fármacos que induzem efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes. Os medicamentos contendo antimônio, conhecidos como antimoniais pentavalentes, são os primeiros indicados para o tratamento das leishmanioses (CHEUKA et al., 2017). O tratamento com esses fármacos possui diversas limitações que reduzem a adesão do paciente, tais como a longa duração do tratamento, as vias de aplicação dos fármacos (intramuscular ou endovenosa) e os graves efeitos colaterais provocados pelo uso diário da droga, como fadiga, artralgias, mialgias, além de toxicidade renal, hepática e cardíaca (COSTA et al., 2017).

A anfotericina B apresenta alta atividade leishmanicida e sua administração resulta em grande eficácia (BEKHIT, et al., 2018). Entretanto, este fármaco apresenta inúmeros inconvenientes incluindo toxicidade renal e maior custo, sendo que os eventos adversos devem ser constantemente monitorados e é necessária a hospitalização do paciente, uma vez que é administrado por via intravenosa (ULLAH et al., 2016; TIWARI et al., 2017).

O fármaco miltefosina (hexadecilfosfocolina ou HePC) foi desenvolvido, inicialmente, como agente antineoplásico oral para tratamento de câncer de pele. A miltefosina tanto pode ser utilizada para o tratamento da LV quanto para a LT, incluindo

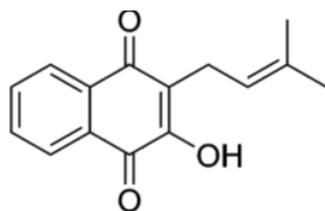
infecções resistentes aos antimoniais pentavalentes, sendo considerado fármaco de escolha quando há falha no tratamento, o que ocorre especialmente em pacientes imunodeprimidos (ULLAH et al., 2016; TIWARI et al., 2017). Tendo provado sua notável eficácia em ensaios clínicos, a miltefosina foi considerada um grande avanço na terapia antileishmanial. No entanto, sérias preocupações quanto à sua teratogenicidade, longo período de tratamento e alto potencial de resistência podem limitar seu uso (BRIONES NIEVA et al., 2021).

Devido a todas essas desvantagens e dificuldades no tratamento com os principais fármacos, surge um crescente interesse na busca de novos agentes com características leishmanicidas que apresentem menos efeitos colaterais. O estudo de plantas e produtos naturais para prevenção e tratamento dessas doenças vem crescendo nos últimos anos, uma vez que são fontes renováveis e geralmente apresentam menor toxicidade e custo (ULLAH et al., 2016; TIWARI et al., 2017).

O crescente interesse científico no estudo e avaliação de plantas utilizadas nas preparações de remédios populares forneceu à medicina moderna uma grande variedade de substâncias eficazes que podem ser utilizadas para o tratamento de doenças parasitárias (COSTA et al., 2017; LOMBREA et al., 2020; SANTOS et al., 2020). Dentre estas, podemos citar o lapachol, um composto natural que possui atividade leishmanicida já demonstrada por trabalhos anteriores (TABOSA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2019).

## **2.2 LAPACHOL**

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona) (Figura 3) pertence a classe dos compostos naftoquinonas, *Bignoniaceae*, do gênero *Handroanthus*. Estes apresentam uma série de atividades farmacológicas principalmente pela propriedade redox, induzida por meio da formação de um sistema aromático. Além de ser obtido a partir de fontes naturais, pode ser facilmente sintetizado, e essas qualidades favorecem a síntese de outras substâncias com potenciais atividades farmacológicas, incluindo o desenvolvimento de novas fármacos que atuem contra doenças negligenciadas (TABOSA et al., 2018).

**Figura 3:** Estrutura do lapachol.

**Fonte:** (Tabosa, 2018).

Em meados da década de 1950, o lapachol foi isolado da casca de *Tabebuia avellanedae* (Ipê roxo) pelo químico industrial Oswaldo Gonçalves de Lima. Apresenta-se como um pó amarelo, fracamente ácido ( $pK_a = 6,15$ ) com ponto de fusão entre 139 e 142°C. O lapachol apresenta diversas atividades biológicas, incluindo atividade antibacteriana (FIGUEREDO et al., 2020), antiparasitária (BARBOSA et al., 2014), anti-inflamatória (MOKARIZADEH et al., 2020) e anticancerígena (MENDES MIRANDA et al., 2021), na qual foi relatada a capacidade de induzir seletivamente a morte celular em várias células cancerosas humanas sem matar células não transformadas (PERES et al., 2017).

A atividade tópica deste composto foi avaliada por Lira et al. (2008), que desenvolveram uma formulação gel a base de lapachol e avaliaram a atividade anti-inflamatória após administração cutânea. Os autores observaram que a formulação proporcionou maior quantidade permeada de lapachol em comparação a uma formulação do tipo gel-creme. O gel apresentou atividades antiedematosas e antinociceptivas significativas quando usado topicamente. Portanto, esses resultados sugeriram que o uso tópico de lapachol poderia ser promissor.

Além disso, o lapachol apresenta massa molecular baixa ( $242 \text{ g.mol}^{-1}$ ), lipofilicidade moderada ( $\log P_{\text{óleo/água}} = 2,69$ ; solubilidade em água =  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  a 25°C) e baixa biodisponibilidade oral, sendo um candidato interessante para a administração cutânea (TABOSA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2019). Tabosa et al. (2018) investigaram a viabilidade do uso de microemulsões para administração transdérmica do lapachol. Os estudos indicaram que as microemulsões incorporando lapachol foram formadas com sucesso e que estas aumentam a distribuição e retenção do fármaco na pele. Os sistemas de microemulsão podem, portanto, fornecer veículos promissores para entrega percutânea de lapachol.

Araújo et al. (2019) investigaram a atividade leishmanicida do lapachol *in vitro* e *in vivo* contra *L. infantum* e *L. amazonensis*, agentes causadores da leishmaniose visceral

e cutânea, respectivamente. Neste estudo, os ensaios de atividade leishmanicida foram realizados em amastigotas intracelulares e mostraram boa atividade com o lapachol. O efeito leishmanicida *in vitro* do lapachol foi confirmado *in vivo* em leishmaniose visceral e cutânea; resultado interessante, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária em lesões de pele, fígado e baço, semelhante à anfotericina B, o medicamento de referência.

O lapachol já foi comercializado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) na forma de cápsulas para o tratamento de doenças malignas como adenocarcinoma do aparelho digestivo. Entretanto, o lapachol tem efeitos adversos graves por via oral, o que fez com que sua comercialização fosse descontinuada pelo LAFEPE (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003; YAMASHITA et al., 2009). Portanto, o lapachol pode ser adequado para administração tópica no tratamento da LT.

### **2.3 ADMISTRAÇÃO TÓPICA**

A pele tem a função de proteger o organismo da diversidade do meio externo (como agentes físicos, químicos e biológicos), atuando como uma eficiente barreira contra a penetração e permeação de substâncias exógenas. Também é por meio desta que é possível a administração de medicamentos que podem ter ação tópica ou sistêmica. A administração tópica de fármacos visando uma ação local ou sistêmica é promissora, porém, o desenvolvimento de sistemas que sejam altamente eficientes ainda é uma tarefa desafiadora (SOARES et al., 2015).

As vantagens da administração tópica seriam fácil aplicação, maior eficácia com menos dosagem, evitar flutuações plasmáticas do fármaco decorrentes da administração oral e o metabolismo pré-sistêmico (efeito de primeira passagem hepático) e promover um efeito localizado reduzindo os níveis sistêmicos e sua distribuição para outros tecidos. A desvantagem desse tipo de administração é a possibilidade de ocorrências de irritações e reações alérgicas a pele (YADAV et al., 2016). Dessa forma, a administração tópica de medicamentos tem demonstrado capacidade de aumentar a eficácia terapêutica local e evitar efeitos adversos sistêmicos (ARIAS et al., 2019).

No entanto, o principal desafio para a aplicação tópica é a barreira da pele, difícil de superar para a maioria dos fármacos. Por isso, são necessárias formulações eficazes, capazes de transpor essa barreira e promover a penetração e/ou permeação de fármacos para as camadas mais profundas da pele, atingindo, assim, seu sítio de ação (ANASTASIOU et al., 2014). Assim, os promotores de permeação surgem como uma

alternativa, uma vez que podem diminuir temporariamente a permeabilidade da pele, aumentando a quantidade retida de fármacos na pele e a profundidade da penetração (MITRAGOTRI, 2009).

Segundo Karande e Mitragotri (2009), os promotores de permeação podem agir no aumento da absorção dos fármacos por meio de alguns mecanismos, tais como aumento da sua difusibilidade na pele, por meio da fluidização lipídica ou extração de lipídios, aumento do coeficiente de partição do fármaco na pele e aumento da atividade termodinâmica do fármaco no veículo, aumentando sua liberação a partir da formulação para as camadas mais internas da pele.

Dentre os promotores de permeação estão os terpenos, constituintes químicos mais frequentes nos óleos essenciais (monoterpenos). Os óleos essenciais e os terpenos isolados, como o óleo de *C. sinensis* empregado nesse estudo, possuem uma variedade de ações farmacológicas como, por exemplo, larvicida (ANAYA-GIL et al., 2021), digestória (SILVA-ESPINOZA et al., 2021), antimicrobiana (RASPO et al., 2020) e leishmanicida (CARVALHO et al., 2021).

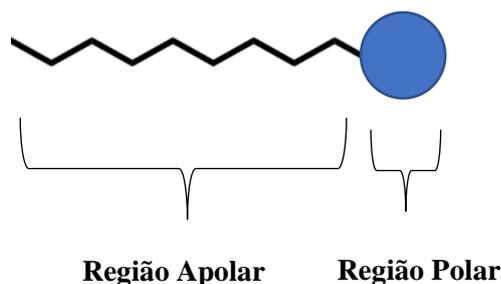
Além da utilização dos terpenos e óleos essenciais como promotores de permeação, o uso de sistemas estabilizados por tensoativos tem sido relatado como estratégia para aumentar a permeação e melhorar a administração tópica de fármacos (LUIS; CARVALHO, 2021).

## **2.4 SISTEMAS ESTABILIZADOS POR TENSOATIVOS PARA ADMISTRAÇÃO TÓPICA**

Os sistemas estabilizados por tensoativos contêm água e óleo, possui grupos hidrofílicos e lipofílicos em sua estrutura, tem afinidade tanto pelo óleo quanto pela água e se acumula na interface entre essas fases, reduzindo a tensão interfacial e possibilitando a obtenção de uma formulação homogênea (DA SILVA et al., 2015).

Tensoativos são moléculas anfifílicas que possuem em sua estrutura uma região polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica) (Figura 4). Podem ser classificados em aniônicos (a região polar possui carga negativa), catiônicos (a região polar apresenta carga positiva), anfóteros (contêm tanto carga aniônica quanto catiônica) e não iônicos (grupo hidrofílico da molécula possui carga neutra em solução) (DALTIM, 2011).

**Figura 4:** Representação esquemática da estrutura do tensoativo.

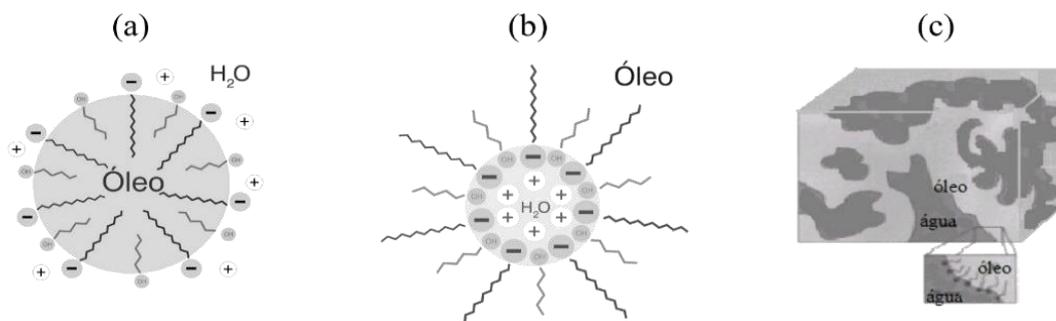


**Fonte:** Própria do autor.

Os polisorbatos são tensoativos não iônicos compostos por ésteres de ácidos graxos. O TWEEN 80 (polisorbato 80) e o TWEEN 20 (polisorbato 20) (WEISZHÁR et al., 2012) são muito utilizados em cosméticos e na indústria alimentícia, cuja natureza hidrofóbica é dada pelos polisorbatos e a hidrofílica pelas subunidades de óxido de etileno. Adotam diversas estruturas, desde microemulsões até cristais líquidos, despertando o interesse para serem usados em sistemas estabilizados por tensoativos. Suas vantagens incluem transparência, fácil preparação, estabilidade a longo prazo e capacidade de veicular ativos lipofílicos e hidrofílicos (AIZAWA, 2010; EL-GENDY et al., 2020).

As microemulsões são agregados esféricos com diâmetros menores que 140 nm e podem ser de três tipos: água em óleo (A/O), em que o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico; óleo em água (O/A), em que o componente lipofílico é disperso no hidrofílico; ou podem ainda ser formados por estruturas bicontínuas entre os componentes hidrofílicos e lipofílicos, com gotículas na faixa de 1-100 nm, como mostrado na Figura 5. Sistemas microemulsionados são homogêneos, transparentes, pouco viscosos e termodinamicamente estáveis. A presença de tensoativos localizados na interface óleo/água permite máxima solubilização dos componentes da mistura e confere estabilidade ao sistema (TABOSA et al., 2018; CRENTSIL et al., 2020).

**Figura 5:** Representação esquemática dos tipos de microemulsão (a) óleo/água; (b) água/óleo e (c) bicontínua.



**Fonte:** (DA SILVA et al., 2015).

A formação de sistemas microemulsionados depende da interação entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo, determinada pela sua estrutura química e por outros fatores como temperatura, força iônica e a presença de co-tensoativo. Estes são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das microemulsões (DA SILVA et al., 2015). Assim, a formação da microemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, sendo dependente das propriedades físico químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (DA SILVA et al., 2015).

Um fator determinante para a formação de microemulsão são as propriedades físico-químicas da fase oleosa, fase aquosa e T/Co-t. Assim, o tensoativo Tween 20 e o co-tensoativo Eumulgin Co 40 foram escolhidos por serem tensoativos não-iônicos, que possuem baixa toxicidade às membranas celulares e estabilidade química, sendo vantajoso para utilização em formulações farmacêuticas (GRAMPUROHIT; RAVIKUMAR; MALLYA, 2011). E o *C. sinensis* foi escolhido por ser capaz de aumentar a permeabilidade na pele por meio de seu componente majoritário, D-limoneno (CARVALHO et al., 2021), além de apresentar atividade leishmanicida (ARRUDA et al., 2009).

Para uma melhor formulação dos sistemas estabilizados por tensoativos, a construção do diagrama de fases é uma ferramenta importante, pois caracteriza em que condições experimentais os sistemas existem, para assim poder selecionar as regiões do diagrama que seja apropriada para a incorporação do fármaco e caracterização do sistema.

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A estrutura das microemulsões e dos cristais líquidos podem ser identificadas por meio de diferentes técnicas, sendo a microscopia de luz polarizada (MLP), análise reológica e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) as técnicas mais utilizadas.

A MLP como análise primária possibilita a identificação de estruturas isotrópicas ou anisotrópicas dos sistemas. Os sistemas anisotrópicos são aqueles que sob um plano de luz polarizada desviam a luz incidente, como as mesofases lamelar e hexagonal as quais apresentam imagens de cruces de malta e estrias, respectivamente. Os sistemas isotrópicos, são aqueles que não desviam a luz, como é o exemplo de microemulsões, sendo observado somente um campo escuro (ARIAS et al., 2019; MACHADO et al., 2020).

A reologia estuda a deformação e o fluxo da matéria, a qual é submetida a uma tensão durante determinado período de tempo. Este estudo permite compreender o nível de organização interno dos sistemas, com base na força das interações existentes, e caracterizá-los quanto às suas propriedades reológicas tais como viscosidade, comportamento de fluxo, deformação elástica, etc. As análises reológicas são muito utilizadas em sistemas estabilizados por tensoativos, pois permite avaliar a estabilidade com o tempo, espalhabilidade e consistência dos sistemas (ARIAS et al., 2019; MACHADO et al., 2020).

A técnica de SAXS possibilita a determinação do tamanho médio e distância entre os objetos espalhadores, como gotículas, transições de fases em sistemas micelares e de microemulsões, bem como estruturas cristalinas, e permite avaliar a estrutura de objetos espalhadores mesmo que eles não estejam organizados de forma ordenada. As fases dos sistemas líquido-cristalinos podem ser identificadas por meio da relação entre as distâncias dos picos ( $d$ ) e o vetor de espalhamento ( $q$ ), de acordo com a equação de Bragg:

$$d = \frac{2\pi}{q_{max}} \quad \text{Equação 1}$$

Pode-se deduzir uma distância média  $d$  entre duas gotículas ou planos vizinhos, a partir do valor da posição do vetor de espalhamento quando a intensidade é máxima ( $q_{max}$ ), empregando a relação descrita na Equação 1 (FERREIRA et al. 2015; TABOSA et al. 2018). A técnica de SAXS é uma das únicas técnicas que fornece detalhes estruturais, suas interações e transições de fases em sistemas micelares e de microemulsões, obtendo-se informações sobre o tamanho, a forma, a quantidade e o arranjo dos sistemas microemulsionados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Desenvolver e caracterizar sistemas estabilizados por tensoativos para a administração tópica do lapachol e avaliar

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a citotoxicidade em macrófagos;
- Determinar a atividade leishmanicida em promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 REAGENTES

Os reagentes (Tabela 1) foram utilizados conforme orientação dos fabricantes, com exceção do óleo essencial de *C. sinensis* obtido a partir da extração de fontes naturais. O lapachol foi obtido do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – IAUFPE/UFPE.

**Tabela 1:** Relação de reagentes utilizados na síntese das formulações.

Reagente	Fórmula química/ Sigla	Massa molar (g/mol)	Marca
PEG-40 Hydrogenated Castor Oil	Eumulgin Co 40	136,15	Embacaps®
Polissorbato 20	Tween 20	1.227,54	Dinâmico®
<i>Citrus sinensis</i>	OECS	-	-
Água Destilada	H <sub>2</sub> O	18,00	-
Lapachol	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	242,27	IAUFPE

Fonte: Própria do autor

### 4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS SINENSIS* (OECS)

O OECS foi obtido a partir de cascas de laranja secas em estufa a 40°C por um 72 horas. Após esse período, as cascas foram trituradas em liquidificador e posteriormente transportadas para um aparelho extrator do tipo Clevenger modificado por  $\pm$  3h para obtenção do óleo. O hidrolato foi removido e o óleo essencial foi armazenado a -4°C e protegido da luz (FERREIRA et al., 2015).

#### 4.2.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO OLÉO ESSENCIAL

Foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas (GC/MS, Shimadzu QP2010 plus, Tóquio, Japão) equipado com autoinjeter (split/splitless). Uma coluna 5% fenil - 95% dimetilpolisiloxano, SPB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) foi usada para separação dos compostos, utilizando hélio como gás de arraste (White Martins S.A) com fluxo de 1mL min<sup>-1</sup>. O modo de injeção foi splitless e tempo total de análise 29 min. Para o MS as condições foram: temperaturas do injeter 200 °C e do detector 250 °C, tempo de corte do solvente 6 min, modo de ionização por elétrons

(EI) 70 eV com relação m/z de 40 a 350 Dalton. Os compostos químicos foram qualitativamente identificados comparando-se os espectros dos compostos com a referência apresentada pelas bibliotecas Nist 107, 21 e Wiley 8. A análise para caracterização do óleo foi realizada no Laboratório de Análises Cromatográficas (LAC), localizado no Núcleo de Petróleo e Gás – UFS.

### **4.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASE PSEUDOTERNÁRIO**

Para construir o diagrama de fases pseudoternário, Tween 20, Eumulgin Co 40, OECS e água destilada foram usados como tensoativo, co-tensoativo, fase oleosa e fase aquosa, respectivamente. Por meio do método de titulação (ARAUJO et al., 2022; DE SÁ et al., 2020) à temperatura ambiente (25°C), o diagrama de fases pseudoternário foi construído. Para isso, tensoativo/Co-tensoativo (T/Co-t) foram combinados na proporção de 1:1 e 2:1 e homogeneizados por agitação magnética por um período de 24h. Nas misturas resultantes (T/Co-t) foram acrescentados a fase oleosa nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, mantendo sob agitação magnética, por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionada a fase aquosa lentamente enquanto se agitava. Após a adição da fase aquosa, os sistemas obtidos foram homogeneizados e as novas proporções de cada componente foram calculadas e anotadas, bem como as possíveis transições dos sistemas, sendo estes classificados como Sistemas Líquidos Transparentes (SLT), Sistemas Viscosos Transparentes (SVT) e Sistemas Não Transparentes (SNT), este último inclui os Sistemas Líquidos Opacos (SLO), Sistemas Viscosos Opacos (SVO) e Separação de Fases (SF).

### **4.4 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES E INCORPORAÇÃO DO LAPACHOL**

Após a identificação de regiões de sistemas líquidos transparentes no diagrama de fases, os sistemas selecionados foram preparados. Quantidades apropriadas de T/Co-t e OECS foram homogeneizados por agitação magnética por 20 min, seguida de titulação lenta da fase aquosa sob homogeneização constante. Para produzir sistemas contendo fármacos, o lapachol foi incorporada ao T/Co-t e OECS antes da adição da fase aquosa. A concentração final de lapachol nas formulações foi de 0,2%. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente e protegido da luz branca. Após a produção, as amostras foram mantidas em repouso por 5 dias, em temperatura ambiente, e protegidas

da luz, a fim de garantir a estabilização termodinâmica dos sistemas. Em seguida, os sistemas foram caracterizados utilizando as metodologias descritas a seguir.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES

### 4.5.1 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (MLP)

A identificação do comportamento isotrópico ou anisotrópico nos sistemas selecionados foram realizadas por MLP utilizando um polarizador de marca Olympus modelo BX51, equipado com uma câmera digital (Evolution LC Color) e software analisador de imagem (Pixel Link). Para analisar o material sob a luz polarizada, uma gota da amostra é pressionada entre lâmina de vidro e lamínula e, em seguida, a amostra é analisada através de microscópio de luz polarizada em temperatura ambiente (25°C) com aumento de 10x (FERREIRA et al., 2015). As análises foram realizadas no Laboratório de Corrosão e Nanotecnologia (LCN) do Núcleo de Petróleo e Gás, localizado na Universidade Federal de Sergipe-*Campus* Prof. José Aloísio de Campos em São Cristóvão.

### 4.5.2 ANÁLISE REOLÓGICA DE FLUXO

O comportamento reológico dos sistemas foi determinado em Reômetro Modular Compacto (MCR 302, Anton Paar) com geometria do tipo cone (ângulo de 1°, 49,97 mm de diâmetro e distância de 96 µm entre as placas). A tensão de cisalhamento foi avaliada aplicando-se uma taxa de cisalhamento entre 0,1 e 200 s<sup>-1</sup>. Todas as análises ocorreram a temperatura de 25°C e em triplicata. A viscosidade ( $\eta$ ) é a medida da resistência de um fluido quando submetida a uma tensão. Quanto mais viscoso um determinado material, mais difícil é o escoamento e maior o seu coeficiente de viscosidade. O comportamento reológico de um fluido é definido pela correlação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento. Os fluidos newtonianos seguem a lei de Newton, expressa na Equação 1. Esses fluidos apresentam uma relação de proporcionalidade entre a taxa e tensão de cisalhamento e assim apresentam viscosidade constante (BLANK et al., 2021).

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo  $\eta$  a viscosidade em Pa.s,  $\sigma$  a tensão de cisalhamento (Pa) e  $\dot{\gamma}$  a taxa de cisalhamento (s<sup>-1</sup>).

As medidas foram realizadas no Centro de Laboratórios de Química Multiusuários (CLQM), localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe - Campus Prof. José Aloísio de Campos em São Cristóvão.

#### **4.5.3 ESPALHAMENTO DE RAIO-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)**

A metodologia foi semelhante à descrita por Carvalho et al. (2016). O feixe de raios X (comprimento de onda  $\lambda = 1,499 \text{ \AA}$ ) foi monocromizado usando um espelho toroidal multicamada de silício-W/B4C, colimado e detectado em um detector Pilatus 300 k. A distância amostra-detector foi de 1500 mm, cobrindo um vetor de espalhamento  $q$  ( $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$ ) variando de 0,09 a 2,2  $\text{nm}^{-1}$ , onde  $2\theta =$  ângulo de espalhamento. O pó de behenato de prata foi usado como padrão para calibrar a distância amostra-detector. A transmissão, a corrente escura e a folha de mica foram corrigidas e o espalhamento parasitário foi subtraído da intensidade total de espalhamento. As medições foram realizadas à temperatura ambiente.

### **4.6 ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO DAS FORMULAÇÕES**

#### **4.6.1 PREPARAÇÃO DA PELE**

A pele da parte externa das orelhas de um suíno, obtida de um abatedouro local, foi utilizada para estudos de permeação. A pele foi preparada conforme descrito por Carvalho et al. (2016). Após a limpeza da pele e com o auxílio de material cirúrgico, o excesso do tecido adiposo da pele foi removido, assim como o excesso de pelos, obtendo um nivelamento da pele e facilitando o processo de dermatomização. Durante o processo, as áreas onde foram observadas lesões, manchas ou arranhões foram descartadas. Em seguida, a pele foi dermatomizada com uma espessura de cerca de 550  $\mu\text{m}$  usando um dermatômetro (TCM 3000, Nouvag) e preservada congelada ( $-4^\circ\text{C}$ ) em sacos de polietileno envoltos com papel alumínio por até duas semanas antes do uso no ensaio (ARAÚJO et al., 2022).

#### **4.6.2 PERMEAÇÃO *IN VITRO***

A pele dermatomizada foi utilizada na permeação das células de Franz (área de difusão = 1,77  $\text{cm}^2$ ). A pele ( $n = 3-4$ ) foi colocada entre os compartimentos doador e receptor, que continha 14 mL de tampão fosfato pH 7,4 com 10% etanol. Em seguida, o compartimento doador recebeu 300 $\mu\text{L}$  de formulação (600 $\mu\text{g}$  de lapachol) e as células

foram seladas. As células foram acopladas a um banho termostaticado para manter a temperatura em 37°C e o meio receptor foi agitado magneticamente (600 rpm). Em tempos pré-determinados, amostras de 1 mL do meio receptor foram coletadas, filtradas e armazenadas em um frasco para quantificação. Imediatamente após cada coleta, o mesmo volume de solução receptora foi cuidadosamente reposto para não formar bolhas de ar entre a pele e o meio (TABOSA et al., 2018; ARAUJO et al., 2022).

#### **4.6.3. ENSAIO DE RETENÇÃO DA PELE**

A pele da orelha do porco foi removida das células de Franz após 24h de permeação para determinar a quantidade de lapachol retida na pele. Para determinar a quantidade de fármaco retida no estrato córneo, cada pedaço de pele (1,77 cm<sup>2</sup>) foi submetido à técnica de *stripping*, que consiste na aplicação de fitas adesivas sucessivas na superfície do estrato córneo sob pressão constante. As tiras (n =14) foram colocadas juntas em um tubo tipo falcon e, em seguida, foram adicionados 4mL de metanol para promover a extração do fármaco. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e então sonificados em um banho de ultrassom por 30 min., sendo que 1 mL deste solvente foi coletado, filtrado e quantificado. Após a remoção do estrato córneo, a pele remanescente (epiderme + derme) foi cortada em pequenos pedaços e adicionada a tubos tipo falcon contendo 4 mL de metanol, que foram homogeneizados em ultraturrax a 10.000 rpm por 1 min, seguido de 30 min de sonicação. Esta solução foi centrifugada a 5000 rpm e 1 mL da solução foi coletado, filtrado e quantificado (TABOSA et al., 2018; ARAUJO et al., 2022).

#### **4.6.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS**

A quantificação das análises foi realizada em cromatógrafo líquido modelo Prominence da marca Shimadzu constituído pelos seguintes módulos: desgaseificador (modelo DGU-20A3), sistema binário de bombeamento (modelo LC-20AT), injetor automático (modelo SIL-20A), forno para coluna (modelo CTO-20A), detector de arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), módulo de comunicação (CBM-20A) utilizando uma coluna Shim-Pack VP-ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm) Shimadzu e software de gerenciamento LCSolution. Mistura desgaseificada 80:20 de metanol-ácido acético aquoso (5%) foi usada para eluir as amostras à temperatura ambiente a uma taxa de fluxo de 1mL min<sup>-1</sup>; 20µL de cada amostra foi injetado. As amostras e a fase móvel foram filtradas por meio de um filtro de acetato de celulose de 0,45µm (Millipore, Bedford, MA), antes da análise

por HPLC. A detecção UV foi empregada em um comprimento de onda de 278 nm (TABOSA et al., 2018; ARAUJO et al., 2022).

## **4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS DAS FORMULAÇÕES**

### **4.7.1 CITOTOXICIDADE SOBRE MACRÓFAGOS**

A citotoxicidade das substâncias e compostos foi determinada por meio da redução enzimática de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7. Em uma placa de 96 poços adicionou-se cerca de  $1 \times 10^5$  macrófagos por poço, sendo em seguida a placa incubada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora para adesão celular. Após lavagens para retirada das células que não aderiram, adicionou-se a substância a ser avaliada diluída para um volume final de 100 µL para cada poço em 8 concentrações diferentes [6,25 – 800 µg/mL]. Decorridas 48 h de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 50 µL/poço de RPMI contendo 10% de MTT (5 mg/mL em PBS), sendo a placa novamente incubada por 4 horas em estufa (37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>). Por fim, o sobrenadante foi descartado e, então, foi adicionado 100 µL de DMSO. A placa foi agitada por cerca de 10 minutos no agitador de Kline (modelo AK 0506) à temperatura ambiente para dissolução completa do formazan, sendo posteriormente realizada a leitura à 550 nm em um espectrofotômetro (FAHEINA-MARTINS et al., 2017).

### **4.7.2 DETERMINAÇÃO DA CI 50 EM PROMASTIGOTAS**

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. braziliensis* (SISGEN AC7D5A4), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. major* (MHOM/IL/80/Friendlin) em fase logarítmica de crescimento. Os parasitos foram semeados na quantidade de  $1 \times 10^6$  leishmania/100 µL de meio em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider suplementado e as substâncias em oito faixas de concentrações [6,25 – 800 mg/mL]. A placa foi incubada em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26 °C por 48 h e, restando 6 h para o término deste período, foram adicionados 20 µL de resazurina (1 mM), sendo incubada novamente a placa. A leitura foi realizada em leitor de placas de absorvância - Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, sendo os resultados expressos em termos de inibição do crescimento (%). Utilizou-se como controle positivo a anfotericina B (Anf B) na concentração de 2 µg/mL. Já para o controle negativo utilizou-se apenas o meio Schneider

e, neste caso, a viabilidade foi considerada como 100% para o parasito. A leitura do branco para cada concentração e para os controles foi necessária para desprezar a absorvância resultante do próprio meio com interferência ou não das substâncias estudadas (COSTA et al., 2021).

#### 4.7. 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram comparados por one-way ANOVA, e em caso de diferença significativa, os dados foram analisados com pós-teste Tukey, utilizando Graphpad prisma 7.0. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $P < 0,05$ .

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *CITRUS SINENSIS*

O rendimento do OECS foi determinado por meio da relação da massa de óleo extraído (em gramas) pela massa de casca de laranja triturada (em gramas). O método de extração foi eficiente, com rendimento de 9,85 %, quantidade similar àquelas descritas na literatura, em torno de 10 % (FERREIRA *et al.*, 2015; GALVÃO *et al.*, 2015).

Por meio da análise cromatográfica, o limoneno, composto majoritário, foi identificado no óleo essencial, conforme Tabela 2. Outros componentes foram encontrados em menor porcentagem, na amostra de óleo essencial de *C. sinensis* analisada foi encontrado 96,6% de limoneno.

**Tabela 2:** Componentes voláteis do óleo essencial de *C. sinensis* extraído.

Tempo de retenção (min)	Componente	Área (%)
8,059	R-Limoneno	96,61
6,450	Alpha-pinene	0,34
7,368	Beta-Myrcene	1,76
9,175	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl	0,95

**Fonte:** Própria do autor

## 5.2 OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES POR MEIO DO DIAGRAMA DE FASES

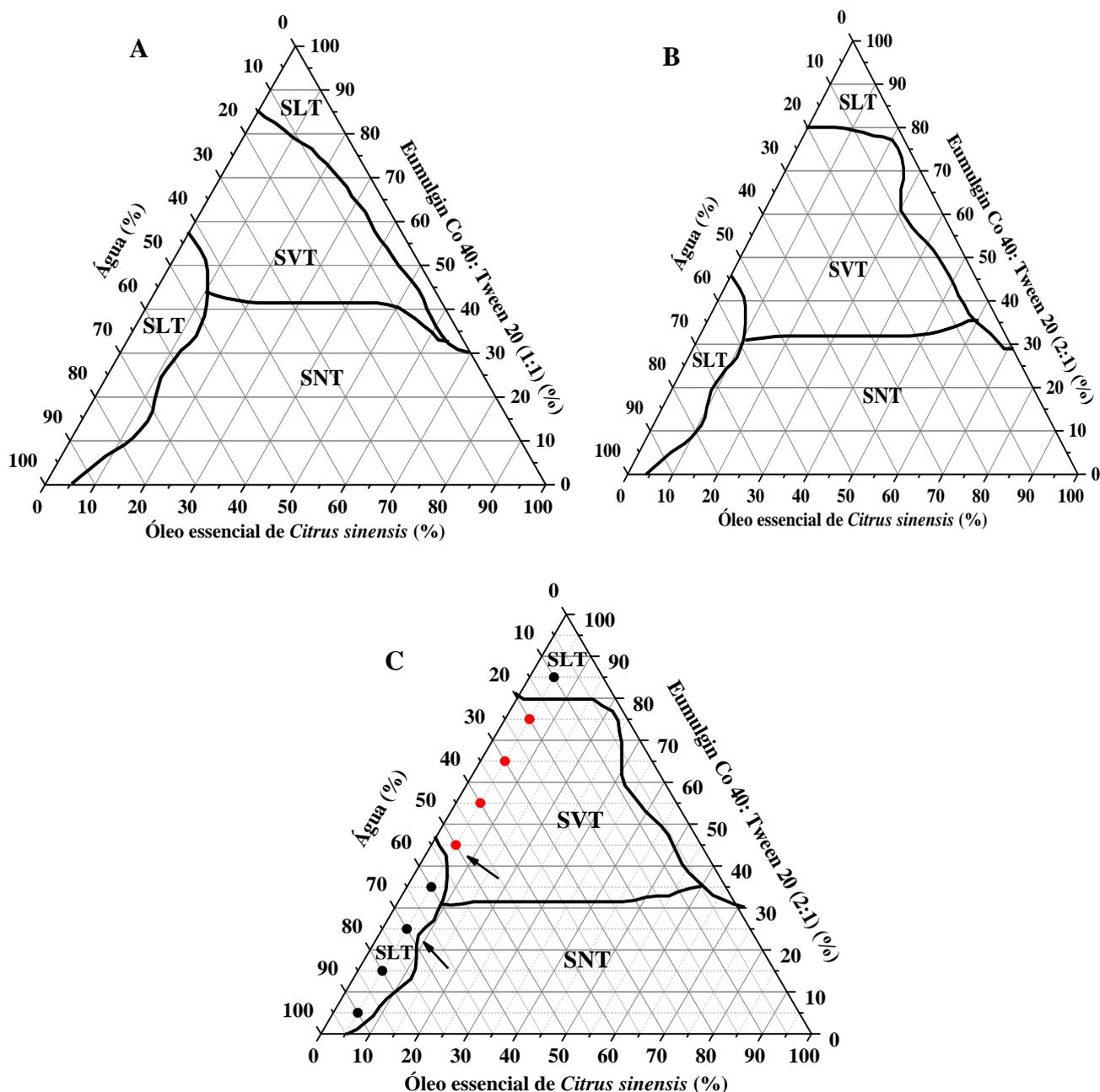
O diagrama de fases pseudoternário foi utilizado para a obtenção das formulações. Foram obtidos dois diagramas de fases, um na proporção de Eumulgin Co 40:Tween 20 (1:1) e outro na proporção Eumulgin Co 40:Tween 20 (2:1), conforme representado na Figura 6.

Na Figura 6, o diagrama de fases A e B apresentam regiões de Sistemas Líquido-Transparentes (SLT), Sistemas Viscoso-Transparentes (SVT) e Sistemas Não Transparentes (SNT). A comparação destes dois diagramas de fases mostrou que a maior região de sistemas líquidos/viscosos transparentes estava predominante no diagrama de Eumulgin Co 40:Tween 20 (2:1) (Figura 6B). Os resultados mostraram que tanto o T/Co-t quanto a fase oleosa influenciaram o comportamento das regiões dos sistemas, permitindo a organização em diferentes tipos de estruturas.

O diagrama B (Figura 6) foi o escolhido para incorporação do lapachol, uma vez que apresentou uma maior região de sistemas termodinamicamente estáveis devido à eficiente proporção Eumulgin Co 40:Tween 20 (2:1).

A região SLT apresentou em até 95% da fase aquosa, 30% T/Co-t e fase oleosa 10%, apresentando características fluida e líquida transparente. Na região entre 20 a 65% de T/Co-t, observou-se a presença de sistemas transparentes com altas viscosidades aparentemente. Estas características podem ser encontradas em diagramas pseudoternário de acordo com a literatura (Tabosa et al. 2018; Macchado et al. 2020).

**Figura 6:** Diagrama de fases pseudoternário Tween 20, Eumulgin Co 40, OECS e água destilada, utilizados como tensoativo, co-tensoativo, fase oleosa e fase aquosa, respectivamente. Diagrama A) Eumulgin Co 40: Tween 20 (1:1), B) Eumulgin Co 40: Tween 20 (2:1) e C) Eumulgin Co 40: Tween 20 (2:1) região destacada de escolha para incorporar o lapachol. SLT: Sistemas Líquido-Transparentes, SVT: Sistemas Viscoso-Transparentes e SNT: Sistemas Não Transparentes.



Fonte: Própria do autor

Os pontos destacados no diagrama da Figura 6C indicam os sistemas selecionados para a incorporação de lapachol, sendo que a fase oleosa permaneceu constante na faixa de 5%. Esses sistemas selecionados foram produzidos conforme descrito no item 4.4. As formulações foram nomeadas como OxTCyAz, sendo x, y e z, a composição (%) de fase oleosa, tensoativo/cotensoativo e fase aquosa, respectivamente. Os sistemas com L indicaram presença de lapachol. Com isto, foram estudados: O5TC45A50 (inerte), O5TC45A50L (com lapachol), O5TC25A70 (inerte), O5TC25A70L (com lapachol). Após 5 dias de armazenamento os sistemas foram caracterizados. A composição de cada sistema é mostrada na Tabela 3.

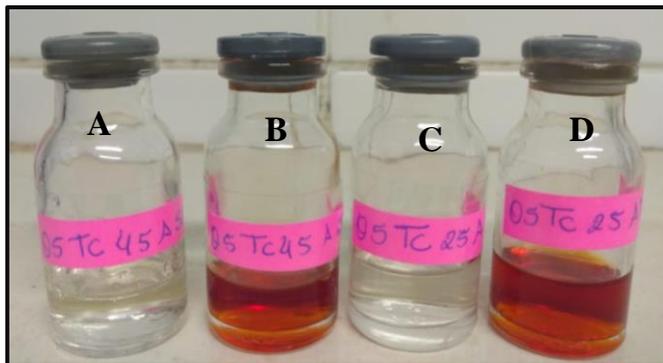
**Tabela 3:** Composição centesimal dos sistemas obtidos a partir do diagrama de fases C. FO: Fase Oleosa, T/Co-t: Tensoativo/Co-tensoativo, FA: Fase Aquosa, LAP: Lapachol.

Formulação	Composição (%)			
	FO	T/Co-t	FA	LAP
<b>O5TC45A50</b>	5	45	50	-
<b>O5TC45A50L</b>	5	45	50	0,2
<b>O5TC25A70</b>	5	25	70	-
<b>O5TC25A70L</b>	5	25	70	0,2

**Fonte:** Própria do autor.

As formulações O5TC45A50 (inerte), O5TC45A50L (com lapachol) apresentaram-se como SVT e com aspecto visual característico de microemulsão, apresentando um aspecto fluído, límpido e translúcido de coloração vermelha (quando adicionado o lapachol). Após cinco dias da preparação das amostras, as formulações mantiveram o mesmo aspecto e permaneceram estáveis durante todo o período de estudo conforme apresentado na Figura 7.

**Figura 7:** Aspecto visual das formulações escolhidas após 5 dias de preparação. O5TC45A50 (A), O5TC45A50L (B), O5TC25A70 (C), O5TC25A70L (D).



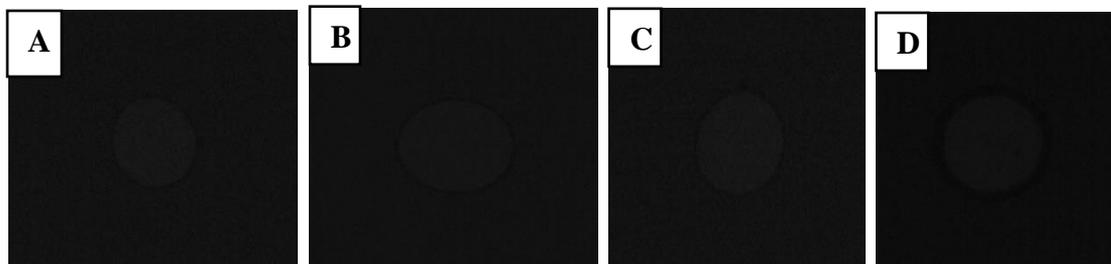
**Fonte:** Própria do autor

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FORMULAÇÕES

As características estruturais das formulações selecionadas foram avaliadas por Microscopia de Luz Polarizada (MLP), análise reológica e SAXS.

Na Figura 8, todas as formulações apresentaram um campo escuro, característico de um comportamento isotrópico, ou seja, as amostras sob o plano da luz polarizada não desviaram a luz, as quais se apresentaram com as mesmas propriedades ópticas em todas as direções. Tal comportamento é esperado em sistemas microemulsionados, uma vez que seu tamanho nanométrico é incapaz de desviar o feixe de luz e gerar imagens (MACHADO et al., 2020).

**Figura 8:** Fotomicrografias das amostras O5TC45A50 (A), O5TC45A50L (B), O5TC25A70 (C), O5TC25A70L (D) obtidas por microscopia de luz polarizada.

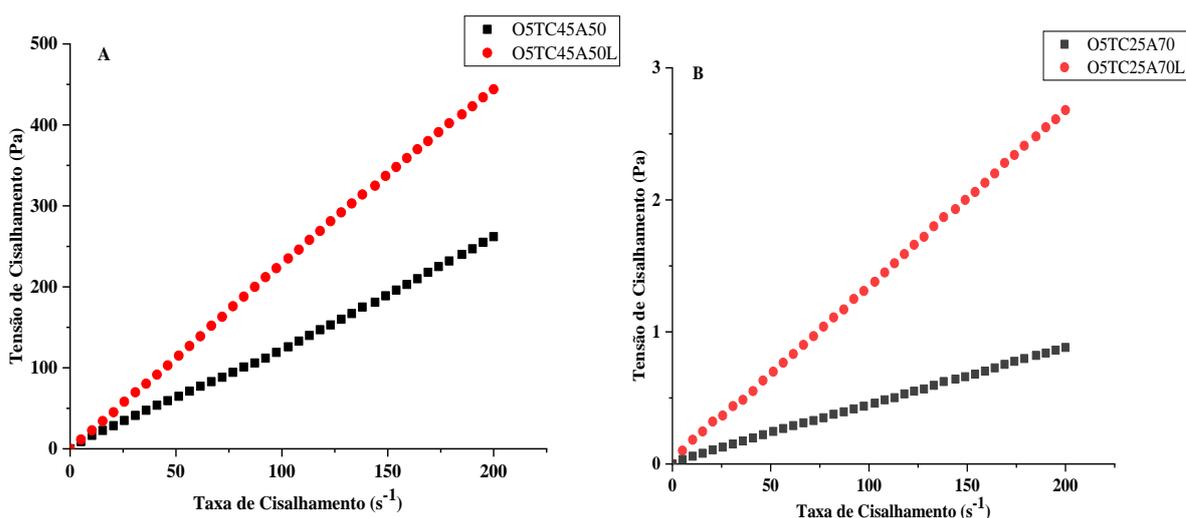


**Fonte:** Própria do autor.

Os reogramas presentes na Figura 9 representam a relação entre tensão e taxa de cisalhamento das formulações O5TC45A50 (inerte), O5TC45A50L (com lapachol), O5TC25A70 (inerte), O5TC25A70L (com lapachol). A partir do perfil dos reogramas, é possível observar que os sistemas apresentaram comportamento newtoniano, uma vez que

a relação entre a tensão e taxa de cisalhamento é linear e obedece a lei de Newton para os fluidos (Equação 2). Com isto, foi possível obter os valores de viscosidade ( $\eta$ ) e do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) (Tabela 4). Os valores de  $R^2$  próximo a 0,9999 indicaram uma boa correlação entre os dados experimentais e o ajuste no modelo teórico. Sistemas de microemulsão exibem comportamento newtoniano como resultado do pequeno tamanho das gotículas e baixa interação entre elas ( MACHADO et al. 2020; Araujo et al. 2022)

**Figura 9:** Reogramas do comportamento reológico das formulações (A) O5TC45A50 e O5TC45A50L, (B) O5TC25A70 e O5TC25A70L.



**Fonte:** Própria do autor

A partir da Tabela 4, observou-se que nas formulações com maior porcentagem da fase aquosa a viscosidade diminuiu. Isso pode ser devido as interações entre as gotículas no sistema, sendo que as cadeias hidrofilicas dos tensoativos não iônicos devem ser fortemente atraídas por ligação de hidrogênio, permitindo essas interações (PODLOGAR et al. 2005). A incorporação do lapachol nas formulações causou um aumento da viscosidade, isso pode ter ocorrido devido à natureza lipofílica do lapachol (TABOSA et al. 2018).

Pode-se observar também que a viscosidade na formulação O5TC45A50 com menor fase aquosa, aumentou. Para Kogan et al. (2009), isso pode estar relacionado ao processo de inchamento das estruturas reversas até que estruturas bicontínuas sejam formadas. Para eles, os resultados estão em correlação com estudos SAXS exibindo um pico de espalhamento nesta região, que é deslocado para valores de  $q$  mais baixos nesta

região, indicando um aumento no tamanho do domínio. E para maiores quantidades de fase aquosa há uma diminuição da viscosidade do sistema, uma vez que as estruturas se transformam em nanogotículas O/A diretas.

**Tabela 4:** Relação da viscosidade reológico das formulações, onde  $\eta$ : viscosidade e  $R^2$ : coeficiente de correlação.

Formulação	$\eta$ (Pa.s)	$R^2$
O5TC45A50	1,2837	0,9998
O5TC45A50L	2,2427	0,9996
O5TC25A70	0,0043	0,9997
O5TC25A70L	0,0133	0,9999

Fonte: Própria do autor

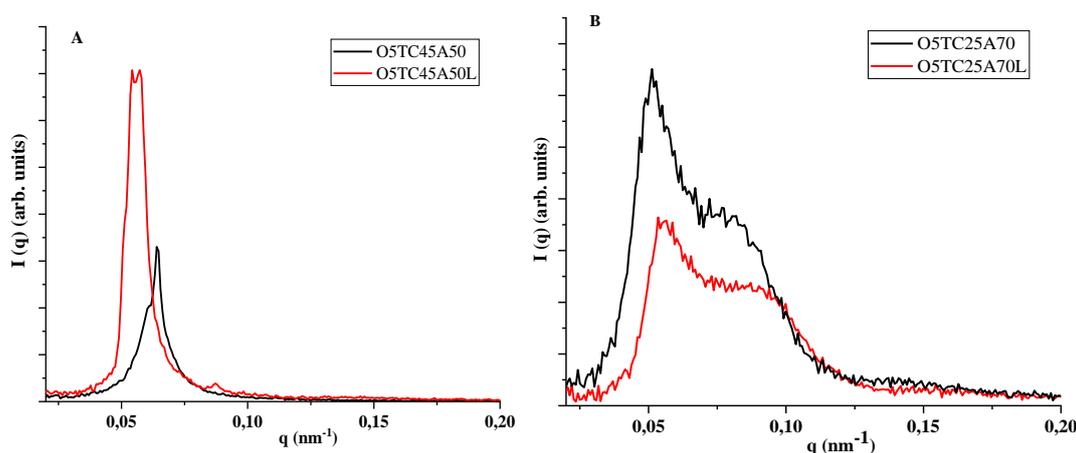
O SAXS tem como característica analisar as fases dos sistemas, sendo capaz de obter informações da sua estrutura interna, formato, tamanho e através da relação entre as distâncias dos picos é possível identificar as fases formadas (FERREIRA et al. 2015; TABOSA et al. 2018).

A Figura 10 mostra as curvas de intensidade de espalhamento  $I(q)$  em função do vetor  $q$  das formulações estudadas. Na formulação O5TC45A50 sem presença do lapachol, o padrão SAXS (Figura 10A) apresenta um primeiro pico de espalhamento não nítido seguido por um pico mais largo. Ao incorporar o lapachol (O5TC45A50L) pode-se observar um aumento na intensidade de espalhamento e dois pequenos picos no topo da curva. Esses comportamentos não acontecem geralmente para uma microemulsão e sistemas líquido cristalinos típicos, já que sistemas microemulsionados geralmente apresentam um único pico alargado, enquanto que sistemas líquido cristalinos apresentam vários picos estreitos, indicando maior organização do sistema (FERREIRA et al. 2015; TABOSA et al. 2018).

Segundo Araujo et al. (2022), esses sistemas são chamados de microemulsão bicontínuas, uma vez que apresentam domínios de fases aquosa e oleosa entrelaçadas na forma de canais estabilizados por regiões de surfactante. O estudo desenvolveu microemulsões e avaliou a influência do comportamento da fase microemulsionada na permeação cutânea da nifedipina, fármaco que possui característica lipofílica, como o lapachol.

Além disso, a microemulsão bicontínua tem uma viscosidade maior do que a microemulsão (MACHADO et al., 2020), isso pode ser comprovado com as análises reológicas que é um complemento do estudo de SAXS, sendo que os dados obtidos apresentam um valor maior de viscosidade comparado com as outras formulações (O5TC45A50 e O5TC45A50L). Também no diagrama de fases, podemos visualizar que a formulação está próxima ao SLT, portanto, a organização apresentada pelo SAXS pode ser devido a uma leve transição de fase, que não pode ser visualizada pela MLP.

**Figura 10:** Análise SAXS para as formulações (A) O5TC45A50, O5TC45A50L; (B) O5TC25A70, O5TC25A70L.



Fonte: Própria do autor

Na Figura 10B o perfil da curva de SAXS para formulações O5TC25A70 e O5TC25A70L, apresenta um pico largo, seguido de outro não tão nítido, demonstrando que com a presença do lapachol há uma diminuição da intensidade de espalhamento. Essas formulações contêm maior quantidade de fase aquosa no sistema, o que faz o pico da curva deslocar para valores de  $q$  mais baixos. O deslocamento do primeiro pico indicou a formação de maiores dimensões (KOGAN et al., 2009). Essas amostras foram examinadas por um microscópio de luz polarizada e não revelaram imagens birrefringentes, o que indica que nenhuma fase líquida cristalina está presente à temperatura ambiente. Mauri et al. (2014) encontraram resultados semelhantes e definiram esses sistemas como microemulsão bicontínuas.

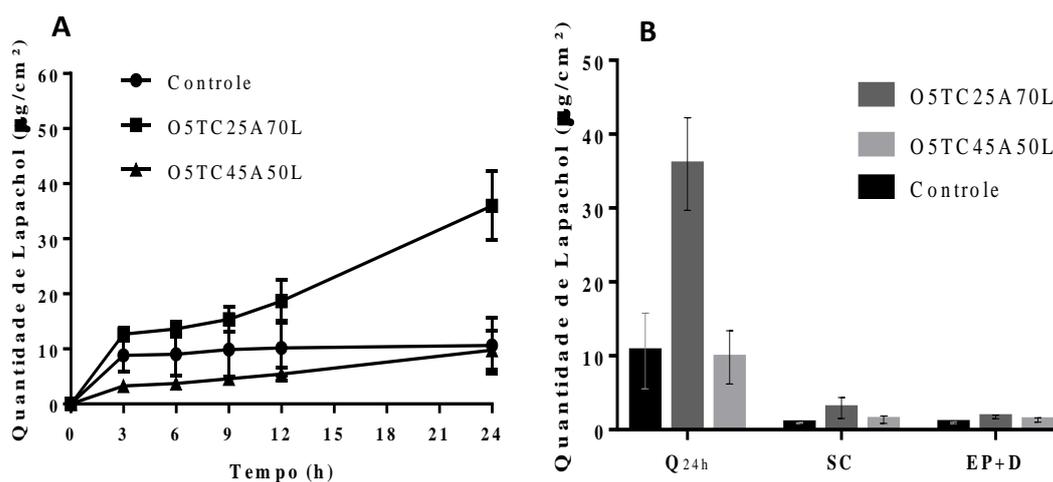
Os resultados da análise SAXS são validados com os encontrados por MLP e análises reológicas, mostrando que os sistemas desenvolvidos possuem características

físico-químicas da microemulsão e a incorporação do lapachol não afeta significativamente essas propriedades.

#### 5.4 ENSAIO DE PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA

A permeação cutânea do lapachol administrado a partir das formulações desenvolvidas foi avaliada usando um modelo de biomembrana de orelha suína e aparelho de células de Franz. A Figura 11A apresenta os perfis de permeação das formulações contendo lapachol e a solução controle. Na formulação O5TC25A70L, lapachol foi entregue de forma mais eficaz que a formulação O5TC45A50L e o controle, com um efeito promotor de permeação de quatro vezes em relação ao controle. Formulação O5TC45A50L também apresentou efeito promotor de permeação durante as 12h iniciais do estudo. E houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparada com o grupo controle.

**Figura 11:** Perfil de permeação do lapachol a partir das formulações (O5TC25A70L e O5TC45A50L) (A) e retenção do lapachol nas camadas da pele e na solução receptora após 24 h (B). Q24: Quantidade de permeação em 24h, SC: Stratum Corneum (estrado córneo) e EP (Epiderme)+D (Derme).



Fonte: Própria do autor

Os resultados da retenção cutânea (Figura 11B) indicaram que a quantidade de lapachol após 24h retido na no estrato córneo foi também maior para O5TC25A70L quando comparado à solução controle. Contudo, não foram observadas diferenças na quantidade de fármaco retido na pele viável entre as formulações O5TC25A70L e O5TC45A50L e a solução controle (epiderme + derme).

De forma geral, os estudos apontam que microemulsões tem maior capacidade em potencializar a permeação de fármacos pela pele, sejam elas hidrofílicas (CARVALHO et al., 2018) ou lipofílicas (DE SÁ et al., 2020), e esses sistemas apresentaram resultados promissores nesse estudo.

## 5.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Um dos critérios importantes a serem considerados na busca de novos fármacos com atividade leishmanicida é a sua eficácia, menor toxicidade e efeitos colaterais adversos. Os ensaios biológicos foram realizados, com o intuito de avaliar a citotoxicidade em macrófagos e a eficácia do lapachol e OECS nas formulações.

Na tabela 5, o lapachol apresentou valor elevado de  $CC_{50}$  nos ensaios *in vitro* com macrófagos RAW quando comparados ao fármaco de referência Anfotericina B, sugerindo baixa citotoxicidade deste composto. A citotoxicidade baixa do lapachol para macrófagos RAW e outras linhagens de células, como macrófagos murinos e células HeG2, foi relatada anteriormente na literatura (ARAÚJO et al., 2019; PERTINO et al., 2020). Todavia, a  $CC_{50}$  do lapachol foi próxima da sua  $IC_{50}$  nas formas promastigotas. Isso resulta em baixo índice de seletividade (IS). Nesse caso, o OECS e o efeito potencializador das microemulsões pode viabilizar um tratamento mais seguro e eficaz.

**Tabela 5:** Concentração Inibitória Média ( $IC_{50}$ ) contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. major* e Concentração Citotóxica Média ( $CC_{50}$ ) sobre Macrófagos RAW, das formulações, Lapachol e OECS.

Substâncias	<i>L. braziliensis</i> $IC_{50}$ $\mu\text{g. mL}^{-1}$	<i>L. amazonensis</i> $IC_{50}$ $\mu\text{g. mL}^{-1}$	<i>L. major</i> $IC_{50}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Macrófagos RAW $CC_{50}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<b>O5TC45A50</b>	152,45 $\pm$ 0,16	286,89 $\pm$ 14,68	197,41 $\pm$ 0,12	>800
<b>O5TC45A50L</b>	113,22 $\pm$ 0,19	228,75 $\pm$ 11,14	149,16 $\pm$ 0,13	306,56 $\pm$ 26,39
<b>O5TC25A70</b>	230,68 $\pm$ 0,16	383,69 $\pm$ 21,16	100,45 $\pm$ 0,08	>800
<b>O5TC25A70L</b>	320,39 $\pm$ 0,14	348,03 $\pm$ 18,08	196,14 $\pm$ 0,08	>800
<b>Lapachol</b>	72,46 $\pm$ 0,17	70,73 $\pm$ 2,26	155,59 $\pm$ 0,15	75,25 $\pm$ 2,92
<b>OECS</b>	116,89 $\pm$ 0,16	52,1 $\pm$ 2,82	5,82 $\pm$ 0,05	>800
<b>Anfotericina B</b>	1,74 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,06	6,15 $\pm$ 0,43

**Fonte:** Própria do autor

Lima et al. (2004) testaram lapachol e seus análogos contra *L. amazonensis* e encontraram uma IC<sub>50</sub> na faixa de 1,6–7,8 µg/mL. Já Araujo et al. (2019) encontraram IC<sub>50</sub> de 135,79µM (32,9 µg/mL) e 79,84µM (19,34 µg/mL) para promastigotas *L. infantum* e *L. amazonensis*, respectivamente, com IS acima de 20 usando células HepG2. A IC<sub>50</sub> para as formas amastigotas foi de 171,26 µM (41,5 µg/mL) e 191,95 µM (46,5 µg/mL) para *L. infantum* e *L. amazonensis*, respectivamente.

Nesse estudo, a IC<sub>50</sub> do lapachol para *L. amazonenses* foi de 70,7 µg/mL e valores maiores foram encontrados para *L. braziliensis* e *L. major*. Variações nas respostas e divergências com dados apresentados na literatura podem ser decorrentes, principalmente, do uso de diferentes cepas de *Leishmania* e diferentes linhagens de células.

O OECS e as formulações também apresentaram CC<sub>50</sub> elevada, promovendo menor toxicidade aos macrófagos e maior segurança no tratamento proposto. Em relação a atividade leishmanicida, todas as formulações apresentaram atividade contra formas promastigotas, principalmente a formulação O5TC45A50L, onde o lapachol melhorou a atividade, com redução significativa da IC<sub>50</sub>. É importante considerar que todas essas formulações apresentam uma concentração de apenas 0,2% de lapachol, dose que pode ser ajustada para melhor eficácia da formulação, e que os dados são expressos em quantidade da formulação em contato com as promastigotas, e não em quantidade do composto ativo dentro dos poços.

Os melhores resultados para as formulações O5TC25A70 e O5TC25A70L foram encontrados para a espécie *L. major* (100,45 e 196,14 µg.mL<sup>-1</sup>), já que o OECS foi mais ativo para essa espécie de leishmania. Se considerarmos a IC<sub>50</sub> do óleo essencial dentro da formulação, esses valores serão bem menores, já que a concentração de óleo é de apenas 5% nas formulações. Ou seja, teríamos um IC<sub>50</sub> 20 vezes menor, alcançando valores de 5,02 µg.mL<sup>-1</sup> para a formulação O5TC25A70.

Estudo de Carvalho et al. (2021), mostrou a potencial atividade antileishmania do limoneno frente à espécie *L. major*, componente majoritário do OECS, com concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) variando de 5,8 a 19,0 µg.mL<sup>-1</sup> e concentração (CC<sub>50</sub>) variando de 94,1 a 176,0 µg.mL<sup>-1</sup>. Nesse estudo, o OECS apresentou uma IC<sub>50</sub> de 5,82 µg.mL<sup>-1</sup>, sendo 20 vezes mais bioativo que para as outras espécies testadas e muito promissor para essa espécie de Leishmania.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que, em condições adequadas, é possível incorporar lapachol em óleo essencial de *C. sinensis*, água destilada, Tween 20 e o Eumulgin Co 40 como tensoativo e co-tensoativo, respectivamente. Os sistemas obtidos foram microemulsões, com isotropia, baixa viscosidade e comportamento newtoniano. Esses sistemas apresentaram efeito promotor de permeação, principalmente a formulação O5TC25A70L que apresentou um efeito promotor de permeação de quatro vezes em relação ao controle. Nos ensaios biológicos, os sistemas desenvolvidos apresentaram baixa citotoxicidade e atividade leishmanicida de 100 a 383  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O óleo essencial de *C. sinensis* apresentou maior atividade frente à espécie *L. major*. Além disso, foi observado um efeito sinérgico do lapachol com o óleo essencial de *C. sinensis* na formulação O5TC45A50L. Dessa forma, os sistemas desenvolvidos mostraram resultados interessantes e podem, portanto, representar formulações promissoras para administração tópica e tratamento de leishmaniose cutânea.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZAWA, H. Morphology of polysorbate 80 (Tween 80) micelles in aqueous dimethyl sulfoxide solutions. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 3, p. 630–631, 2010.
- ANAYA-GIL, J. et al. Artificial modification of the chemical composition of orange oil (*Citrus sinensis* L.) and its effect on larvicidal activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1913–1918, 2021.
- ARAÚJO, G. R. et al. Microemulsions formed by PPG-5-CETETH-20 at low concentrations for transdermal delivery of nifedipine: Structural and in vitro study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 214, n. March, 2022.
- ARAÚJO, I. A. C. et al. Efficacy of lapachol on treatment of cutaneous and visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 199, n. January, p. 67–73, 2019.
- ARIAS, E. M. et al. Cubic liquid crystalline structures in diluted, concentrated and highly concentrated emulsions for topical application: Influence on drug release and human skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. July, 2019.
- ARRUDA, D. C. et al. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 63, n. 9, p. 643–649, 2009.
- BARBOSA, M. I. F. et al. Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 136, p. 33–39, 2014.
- BLANK, B. et al. Effect of Lateral and Stress-Dependent Viscosity Variations on GIA Induced Uplift Rates in the Amundsen Sea Embayment. **Geochemistry, Geophysics, Geosystems**, v. 22, n. 9, p. 1–28, 2021.
- BRIONES NIEVA, C. A. et al. An appraisal of the scientific current situation and new perspectives in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 221, n. May, 2021.
- CARVALHO, A. L. M. et al. Evaluation of Microemulsion and Lamellar Liquid Crystalline Systems for Transdermal Zidovudine Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 7, p. 2188–2193, 2016.
- CARVALHO, A. L. M. et al. Third-Generation Transdermal Delivery Systems Containing Zidovudine: Effect of the Combination of Different Chemical Enhancers and a Microemulsion System. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 7, p. 3219–3227, 2018.
- CARVALHO, R. DE C. V. DE et al. Limonene-carvacrol: A combination of

- monoterpenes with enhanced antileishmanial activity. **Toxicology in Vitro**, v. 74, n. March, 2021.
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. Parasites - Leishmaniasis Biology. p. 1–2, 2020.
- CHEUKA, P. M. et al. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.
- COSTA, E. V. S. et al. Antileishmanial Activity of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. Grose (Bignoniaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 2–4, 2017.
- COSTA, L. M. et al. In vitro antileishmanial and immunomodulatory activities of the synthetic analogue riparin E. **Chemico-Biological Interactions**, v. 336, n. December 2020, 2021.
- CRENTSIL, J. A. et al. Leishmanicidal Potential of Hardwickiic Acid Isolated From *Croton sylvaticus*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. May, p. 1–15, 2020.
- CRUZ, G. K. P. et al. Epidemiological situation of patients on the waiting list for corneal transplantation: A sectional study. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 6, p. 1751–1757, 2018.
- DA SILVA, J. D. F. et al. Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196–1206, 2015.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. , 2011.
- DE SÁ, A. Á. M. et al. Evaluation of the incorporation of essential oils in microemulsions as a promising formulation in the inhibition of tyrosinase. **Industrial Crops and Products**, v. 154, n. May, p. 112654, 2020.
- DE SOUZA, M. L. et al. Recent strategies for the development of oral medicines for the treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Development Research**, v. 81, n. 7, p. 803–814, 2020.
- EL-GENDY, M. A. et al. Delineating penetration enhancer-enriched liquid crystalline nanostructures as novel platforms for improved ophthalmic delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 582, n. December 2019, p. 119313, 2020.
- FAHEINA-MARTINS, G. V et al. Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory RAW264 . 7 Cells. v. 2017, 2017.
- FERREIRA, S. G. et al. An environmentally safe larvicide against *Aedes aegypti* based on in situ gelling nanostructured surfactant systems containing an essential oil. **Journal**

of **Colloid and Interface Science**, v. 456, p. 190–196, 2015.

FIGUEREDO, F. G. et al. In silico evaluation of the antibacterial and modulatory activity of lapachol and nor-lapachol derivates. **Microbial Pathogenesis**, v. 144, n. November 2019, p. 104181, 2020.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 301–313, 2005.

GALVÃO, J. G. et al.  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14–19, 2015.

GÓMEZ-ZAFRA, M. J. et al. Immune profile of the nasal mucosa in patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 88, n. 5, p. 1–29, 2020.

GRAMPUROHIT, N.; RAVIKUMAR, P.; MALLYA, R. Microemulsions for topical use- A review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 45, n. 1, p. 100–107, 2011.

ITA, K. Progress in the use of microemulsions for transdermal and dermal drug delivery. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 22, n. 4, p. 467–475, 2017.

KOGAN, A. et al. Formation and characterization of ordered bicontinuous microemulsions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 31, p. 10669–10678, 2009.

LAOTHAWEERUNGSAWAT, N. et al. Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 579, n. October 2019, p. 119052, 2020.

LIRA, A. A. M. et al. Development of lapachol topical formulation: Anti-inflammatory study of a selected formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163–168, 2008.

LOPES, K. P. S. et al. Lapachol-loaded triblock copoly(oxyalkylene)s micelles: Potential use for anticancer treatment. **Journal of Molecular Liquids**, v. 338, p. 116657, set. 2021.

LUIS, A.; CARVALHO, M. Óleos vegetais como promotores de permeação cutânea em formulações tópicas e transdérmicas de anti-inflamatórios : uma revisão integrativa Vegetable oils as skin penetration enhancer in topical and transdermal anti-inflammatory formulations : an integrative review Aceites vegetales como promotores de la permeación cutánea en formulaciones anti-inflamatorias tópicas y transdérmicas :

una revisión integrativa. v. 2021, p. 1–15, 2021.

MACHADO, M. et al. Microemulsion systems to enhance the transdermal permeation of ivermectin in dogs: A preliminary in vitro study. **Research in Veterinary Science**, v. 133, n. August, p. 31–38, 2020.

MENDES MIRANDA, S. E. et al. Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, n. July 2020, 2021.

MOKARIZADEH, N. et al. An evaluation on potential anti-inflammatory effects of  $\beta$ -lapachone. **International Immunopharmacology**, v. 87, n. July, 2020.

MOURI, A. et al. Phase behavior of reverse microemulsions based on Peceol®. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 416, p. 139–146, 2014.

OPAS, O. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. p. 10, 2021.

PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. **PAHO/WHO Institutional Repository. Leishmaniasis: Epidemial Report in the Americas**, n. 9, p. 1–7, 2020.

PANTALEÃO, S. M. DA S. et al. Análise dos indicadores de leishmaniose em Sergipe: um estudo no período de 2007 a 2017. v. 15, p. 1–15, 2018.

PAVONI, L. et al. Microemulsions: An effective encapsulation tool to enhance the antimicrobial activity of selected EOs. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, n. May, p. 101101, 2019.

PEREIRA, S. A. et al. Hydroxyethyl starch nanocapsules by multiple nanoemulsions for carrying and controlled release of lapachol. **Materials Letters**, v. 274, p. 1–3, 2020.

PERES, R. S. et al. Lapachol, a compound targeting pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2017.

PERTINO, M. W. et al. Synthesis, trypanocidal and anti-leishmania activity of new triazole-lapachol and nor-lapachol hybrids. **Bioorganic Chemistry**, v. 103, n. July, p. 104122, 2020.

PODLOGAR, F.; BEŠTER ROGAČ, M.; GAŠPERLIN, M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40®-Imwitor 308®-IPM microemulsions on ketoprofene release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 302, n. 1–2, p. 68–77, 2005.

RASPO, M. A. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of citrus essential oils from Argentina and the United States. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100651, 2020.

- SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.
- SANTOS, R. S. DOS et al. Emulgels Containing Carbopol 934P and Different Vegetable Oils for Topical Propolis Delivery: Bioadhesion, Drug Release Profile, and Ex Vivo Skin Permeation Studies. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 6, p. 1–10, 2020.
- SILVA-ESPINOZA, M. A. et al. Protective capacity of gum Arabic, maltodextrin, different starches, and fibers on the bioactive compounds and antioxidant activity of an orange puree (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) against freeze-drying and in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 357, n. March, p. 129724, 2021.
- SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.
- SOARES, K. C. C. et al. Bioequivalência de medicamentos tópicos dermatológicos: O cenário brasileiro e os desafios para a vigilância sanitária. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 20, n. 11, p. 3599–3608, 2015.
- SUGUMAR, S. et al. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1044–1049, 2014.
- TABOSA, M. A. M. et al. Microemulsion Formulations for the Transdermal Delivery of Lapachol. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 4, p. 1837–1846, 2018.
- ULLAH, N. et al. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 12, p. 1905–1925, 2016.
- VASCONCELOS, J. M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.
- WEISZHÁR, Z. et al. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, tween-80 and tween-20. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 492–498, 2012.
- WHO. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. [s.l: s.n.].
- YADAV, S. K. et al. Emulgel: a New Approach for Enhanced Topical Drug Delivery. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 15, 2016.

YAMASHITA, M. et al. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 6286–6291, 2009.