



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Leishmania infantum* DE  
NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus* spp.

MARIANA MUNIZ DA PAZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE

2018



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-*Leishmania infantum* DE  
NANOEMULSÕES CONTENDO ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Citrus* spp.

MARIANA MUNIZ DA PAZ

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.  
Orientador (a): Igor de Almeida Rodrigues

ORIENTADOR: IGOR DE ALMEIDA RODRIGUES

COORIENTADORA: ANDREZA RAPOSO GARCIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE

2018

Paz, Mariana Muniz

Avaliação do efeito anti-*Leishmania infantum* de nanoemulsões contendo óleos essenciais de *Citrus* spp. Pólo Campo Grande, 2018. 42 f. il: 29,7 cm

Orientador: Igor de Almeida Rodrigues

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2018.

Referencias bibliográfica: f.35-42

1. Leishmaniose visceral, óleos essenciais, gênero *Citrus*, nanoemulsão.

I. RODRIGUES, Igor de Almeida

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Avaliação do efeito anti-*Leishmania infantum* de nanoemulsões contendo óleos essenciais de *Citrus* spp.



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ



instituto de **biologia**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL**

<b>NOME DO GRADUANDO (A)</b>		<b>MATRÍCULA</b>
Mariana Muniz da Paz		14114020157
<b>LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO CAMPO GRANDE</b>		
<b>TITULO DA MONOGRAFIA</b>		
Avaliação do efeito anti- <i>Leishmania infantum</i> de nanoemulsões contendo óleos essenciais de <i>Citrus</i> spp.		
<b>NOME DOS MEMBROS DA BANCA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Orientador Igor de Almeida Rodrigues	Doutor	<i>Igor A. Rodrigues</i>
Verônica Cardoso	Doutora	<i>Verônica de S. Cardoso</i>
Tamiris Lameira	Mestre	<i>Tamiris L. Pittencourt</i>
		Data: 10/12/2018
<input checked="" type="checkbox"/> <b>APROVADO (A)</b>		<input type="checkbox"/> <b>REPROVADO (A)</b>
<b>HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA</b>		
Sr.(a) Coordenador (a): encaminho, em anexo, a versão <b>revisada</b> do Trabalho Final de Curso nos formatos <b>impresso</b> e <b>digital</b> . Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.		
<b>ASSINATURA DO ORIENTADOR</b>		
<i>Igor de Almeida Rodrigues</i>		
<b>LOCAL E DATA</b> Rio de Janeiro, 28 de Janeiro de 2019		
<b>ASSINATURA DO COORDENADOR DO CURSO</b>		
<b>LOCAL E DATA</b>		

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tudo.

A toda minha família, principalmente, minha mãe Rosana Santos pela educação, carinho e suporte em todos os momentos.

A todos do Laboratório de Bioprospecção de Antimicrobianos Naturais, especialmente, meu orientador Dr. Igor de Almeida Rodrigues e coorientadora M<sup>a</sup> Andreza Raposo Garcia por toda paciência, acompanhamento e dedicação em todos esses anos.

À Dr<sup>a</sup> Valéria Gonçalves Costa pela sua generosidade, ensinamentos e compreensão.

A todos os colaboradores Dr<sup>a</sup> Alane Beatriz Vermelho e Dr<sup>a</sup> Mariana Maria Barros de Azevedo (Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ); ao Dr. Eduardo Ricci Jr (Faculdade de Farmácia/UFRJ); e a Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Fernandes Amaral (Farmanguinhos/FIOCRUZ).

Aos professores da faculdade pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos, em especial, Brenda Maciel e Victoria Marques por todo o apoio e companheirismo.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1. Leishmaniose: uma doença negligenciada	
1.2. O ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	
1.3. Principais quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose	
1.4. Gênero <i>Citrus</i>	
1.5. Nanoemulsões como estratégia terapêutica	
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>18</b>
2.1. Objetivo geral	
2.2. Objetivos específicos	
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1. Reagentes	
3.2. Óleos essenciais	
3.3. Análise química dos óleos essenciais de <i>Citrus</i>	
3.4. Preparação das nanoemulsões	
3.5. Caracterização das nanoemulsões	
3.6. Cultura de células	
3.7. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e do CI <sub>50</sub>	
3.8. Ensaio da concentração mínima citotóxica (CMC) em macrófagos RAW 264.7	
3.9. Ensaio de hemólise	
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
4.1. Cromatografia gasosa dos óleos essenciais	
4.2. Caracterização das nanoemulsões	
4.3. Atividade anti- <i>Leishmania</i>	
4.4. Atividade citotóxica e IS	
4.5. Atividade hemolítica	
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Lesões causadas pela leishmaniose.....	11
<b>Figura 2.</b> Áreas endêmicas de leishmaniose visceral e tegumentar no mundo.....	12
<b>Figura 3.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	14
<b>Figura 4.</b> Micela polimérica.....	16
<b>Figura 5.</b> Efeito inibitório dos óleos essenciais e das nanoemulsões de <i>Citrus</i> spp. sobre <i>Leishmania infantum</i> .....	26
<b>Figura 6.</b> Efeito citotóxico dos óleos essenciais e das nanoemulsões de <i>Citrus</i> spp. sobre macrófagos RAW 264.7.....	29
<b>Figura 7.</b> Atividade hemolítica dos óleos essenciais e das nanoemulsões.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs Absorbância

CA *Citrus aurantium*

CC<sub>50</sub> Concentração citotóxica de 50%

CG-EM cromatografia gasosa - espectrômetro de massa

CH<sub>100</sub> Concentração hemolítica de 100%

CH<sub>50</sub> Concentração hemolítica de 50%

CI<sub>50</sub> Concentração inibitória de 50%

CL *Citrus limonum*

CMC Concentração mínima citotóxica

CMI Concentração mínima inibitória

CR *Citrus reticulata*

DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO Dimetil Sulfóxido

IS Índice de seletividade

LC Leishmaniose cutânea

LCD Leishmaniose cutânea difusa

LCL Leishmaniose cutânea localizada

LM Leishmaniose mucocutânea

LT Leishmaniose tegumentar

LV Leishmaniose visceral

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NE Nanoemulsões

NECA Nanoemulsão de *Citrus aurantium*

NECL Nanoemulsão de *Citrus limonum*

NECR Nanoemulsão de *Citrus reticulata*

OEs Óleos essenciais

PDI Índice de polidispersão

PL Pluronic<sup>®</sup> F127

SFB Soro fetal bovino



## RESUMO

*Leishmania infantum* é o agente etiológico da leishmaniose visceral, caracterizada pelo acometimento de órgãos internos e, sem o tratamento adequado, pode levar a óbito. Sua transmissão ocorre durante a hemotofagia pelo flebotomíneo. Devido os efeitos colaterais dos medicamentos empregados, aumentou a busca de novas substâncias. Os óleos essenciais das espécies do gênero *Citrus* apresentam diversas propriedades farmacológicas promissoras, tais como atividade antifúngica, anti-inflamatória e antibacteriana. Nanoemulsões (NE) são sistemas com dispersões bifásicas de dois líquidos imiscíveis (água e óleo), estabilizadas por agentes emulsionantes e apresentam múltiplas funcionalidades, incluindo a de carrear drogas. O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar o efeito anti-*L. infantum* de óleos essenciais e nanoemulsões compostas por *C. aurantium*, *C. limonum* e *C. reticulata*. Para isso, as nanoemulsões dos óleos (O/A) foram preparadas utilizando Pluronic® F-127 como tensoativo. Formas promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações, incubadas por 48 h a 28°C e avaliadas com resazurina. O efeito citotóxico das nanoemulsões sobre macrófagos RAW 264.7 foi obtido por espectrofotometria (570 nm) após adição de MTT. A capacidade hemolítica foi avaliada utilizando espectrofotômetro a 540 nm. As nanoemulsões contendo 5% de *C. reticulata* (CR), *C. limonum* (CL) e *C. aurantium* (CA) apresentaram tamanho de gota (índice de polidispersão) iguais a 281,6 (0,341); 275,4 (0,382) e 322,3 (0,393) nm, respectivamente. A CI<sub>50</sub> das OEs de CR, CL e CA (NE) foram de 156,7 (11,7); 163,6 (19,5) e 158,7 (16,9) µg/mL, respectivamente. Contudo, quando macrófagos foram tratados com as nanoformulções, a citotoxicidade reduziu aproximadamente 3,3 vezes em relação à atividade dos OEs. Não foi possível observar atividade hemolítica das nanoemulsões significativa na maior concentração testada (1,8 mg/mL), enquanto os OEs puros mostram mais de 40% de hemólise em 800 µg/mL. Diante dos resultados apresentados, é possível observar que a formulação de nanoemulsões dos óleos essenciais propicia um aumento na eficácia do seu perfil de atividade em comparação aos óleos essenciais puros.

**Palavras-chave:** *Leishmania infantum*, óleos essenciais, gênero *Citrus*, nanoemulsão.

## ABSTRACT

*Leishmania infantum* is the etiological agent of visceral leishmaniasis, characterized by involvement of internal organs and, without proper treatment, can lead to death. Its transmission occurs during hemophagia by sand flies. Due to the side effects of the drugs used, the search for new substances increased. Essential oils of species of the genus *Citrus* have several promising pharmacological properties, such as antifungal, anti-inflammatory and antibacterial activity. Nanoemulsions (NE) are systems with biphasic dispersions of two immiscible liquids (water and oil), stabilized by emulsifying agents and have multiple functionalities, including drug loading. The objective of this study was to evaluate and compare the anti-*L. infantum* effect of essential oils and nanoemulsions composed of *C. aurantium*, *C. limonum* and *C. reticulata*. For this, the essential oils nanoemulsions (O/W) were prepared using Pluronic® F-127 as a surfactant. Promastigote forms were treated with different concentrations, incubated for 48 h at 28 °C and evaluated with resazurin. The cytotoxic effect of nanoemulsions on macrophages RAW 264.7 was obtained by spectrophotometry (570 nm) after addition of MTT. The hemolytic capacity was evaluated using a spectrophotometer at 540 nm. Nanoemulsions containing 5% *C. reticulata* (CR), *C. limonum* (CL) and, *C. aurantium* (CA) presented droplet size (polydispersity index) of 281.6 (0.341); 275.4 (0.382) and, 322.3 (0.393) nm, respectively. The IC<sub>50</sub> of CR, CL and CA (NE) EOs were 156, 7 (11,7); 163,6 (19,5), and 158,7 (16,9) µg/mL, respectively. However, when macrophages were treated with the nanoformulations, the cytotoxicity reduced approximately 3.3-fold with respect to OE activity. It was not possible to observe significant hemolytic activity of nanoemulsions at the highest concentration tested (1.8 mg/ mL), while pure EOs showed more than 40% hemolysis at 800 µg/ mL. Considering the results presented here, it is possible to observe that formulation of nanoemulsions of the essential oils propitiates an increase in the effectiveness of its profile of activity in comparison to the pure essential oils.

**Key words:** *Leishmania infantum*, essential oils, *Citrus* genus, nanoemulsion.

## 1. INTRODUÇÃO

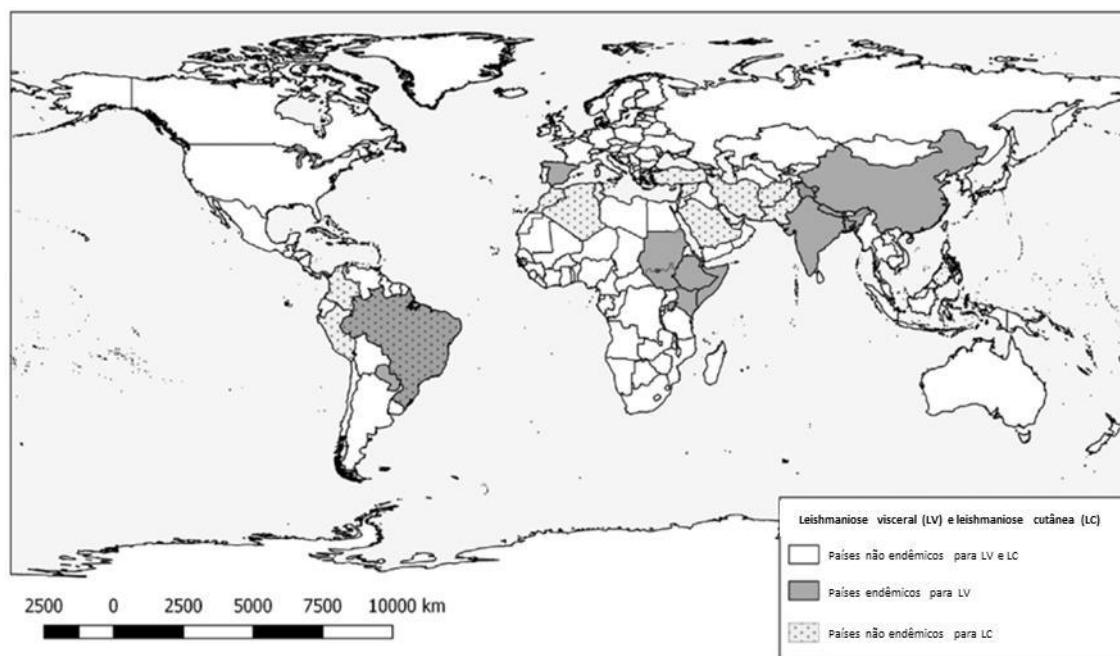
### 1.1 Leishmaniose: uma doença negligenciada

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae. Dependendo da espécie do parasita envolvida na infecção e das condições imunológicas do hospedeiro, a doença pode se manifestar como lesões cutâneas ou acometer órgãos internos. A leishmaniose tegumentar (LT) apresenta duas formas: cutânea (LC), dividida entre localizada (LCL) e difusa (LCD); e mucocutânea (LM). A LCL é caracterizada pela presença de úlceras com bordas elevadas na pele (Fig. 1a), enquanto a LCD ocasiona lesões crônicas e espalhadas por diversas partes expostas do corpo (Fig. 1b). A LM consiste em lesões nas mucosas do paciente (garganta, boca e nariz). A LCD é comumente ocasionada pela espécie *Leishmania amazonenses*, enquanto o agente etiológico mais frequente da LM é a *Leishmania braziliensis*. A forma visceral da doença, denominada leishmaniose visceral (LV), é caracterizada por sintomas como febre, anemia e diminuição no peso, além de provocar hepatoesplenomegalia (Fig. 1c). As espécies causadoras da LV são a *Leishmania infantum* e a *Leishmania donovani*, sendo esta última encontrada apenas no Velho Mundo (BEKHIT *et al.*, 2018). A LV pode ser letal na falta de tratamento adequado (WHO, 2018).



**Figura 1:** Lesões causadas pela leishmaniose. (a) Úlcera causada pela LC localizada; (b) Paciente apresentando lesões crônicas devido a LC difusa; (c) Hepatoesplenomegalia causado pela LV (BRASIL, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é classificada como uma doença negligenciada, uma vez que ocorre em regiões com populações que apresentam baixa renda. Tal condição acaba por não estimular o interesse da indústria farmacêutica, pois não haveria o retorno financeiro esperado (BRASIL, 2010). A OMS apresenta uma estimativa que, no mundo, cerca de 350 milhões de pessoas habitam em áreas com alto índice de infecção (Figura 2). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS), 18 países do continente Americano apresentam um alto risco de infecção por LC e LM. Apenas no Brasil, em 2016, o maior número de casos (12.690) foi registrado. Entre os anos 2001 e 2016 houve uma média de 3.457 casos de LV em humanos nas Américas, ocorrendo no Brasil 3200 casos só em 2016.



**Figura 2:** Áreas endêmicas de leishmaniose visceral e tegumentar no mundo. Essa doença negligenciada, causada pelo parasita *Leishmania*, acomete em países tropicais. (WHO, 2016).

## 1.2 O ciclo biológico da *Leishmania*

O parasita *Leishmania* possui duas formas evolutivas bem definidas. A forma promastigota (procíclicas e metacíclica) apresenta corpo celular alongado e flagelo proeminente. Trata-se da forma evolutiva encontrada no hospedeiro invertebrado, fêmeas do mosquito flebotomíneo pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Já a forma amastigota é encontrada nos

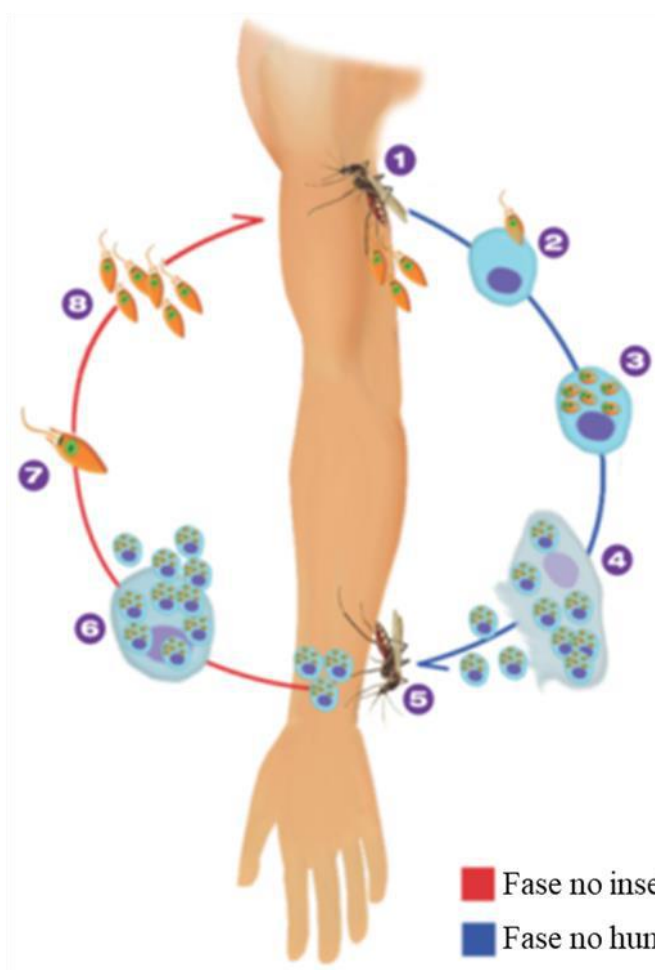
hospedeiros vertebrados (marsupiais, primatas, cães e humanos), sendo caracterizada por apresentar corpo celular esférico e flagelo interiorizado (CASTELLANO, 2005).

O ciclo evolutivo do protozoário em hospedeiros vertebrados inicia-se com a transmissão de formas promastigotas metacíclicas durante a hematofagia dos flebotomíneos. No mesmo local, células do sistema imunológico (neutrófilos, células dendríticas e, principalmente, macrófagos) realizam a fagocitose dos parasitas e, após sua internalização, ocorre a diferenciação dos mesmos para formas amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo. Após sucessivos processos de divisão binária, o número de parasitas internalizados aumenta excessivamente resultando no rompimento da célula hospedeira e liberação das amastigotas. Outros fagócitos internalizam essas parasitas livres, estabelecendo a infecção (VERMELHO *et al.*, 2014).

Durante a alimentação do inseto vetor não infectado no hospedeiro vertebrado infectado, as células contendo o protozoário são ingeridas. No intestino do inseto, as células se rompem e liberam as amastigotas que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas. A forma responsável pela doença no hospedeiro vertebrado surge durante o processo de metaciclogênese, quando ocorre a transformação de promastigotas procíclicas (não infectivas) em promastigotas metacíclicas (infectivas), que então migram para a porção anterior do intestino médio e região da probóscide. Desta maneira, ciclo se repete durante um novo repasto sanguíneo como é possível visualizar na figura 2 (VERMELHO *et al.*, 2014).

### **1.3. Principais quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose**

O tratamento para as duas formas da doença consiste no uso de antimoniais pentavalentes como os medicamentos de primeira escolha. Os antimoniais pentavalentes empregados são o estibogluconato de sódio e o antimoniato de metilglucamina, conhecidos comercialmente como Pentostam® e Glucantime®, respectivamente (HENAIO *et al.*, 2004). O mecanismo de ação destas drogas frente aos parasitas inclui alteração no equilíbrio redox, através da sua forma reduzida (antimoniais trivalentes), bem como resultando no estresse oxidativo dos macrófagos infectados (DECUYPERE *et al.*, 2012). Todavia, os efeitos colaterais são diversos incluindo febre, dor abdominal, náuseas, vômitos, pirose, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, entre outros (BRASIL, 2016).



**Figura 3:** Ciclo biológico da *Leishmania*: 1- contaminação pelo flebotomíneo infectado durante a hematofagia; 2- fagócitos internalizam promastigotas metacíclicas; 3- diferenciação em formas amastigotas intracelulares; 4- cissiparidade e rompimento do fagócito pelos parasitas; 5- o inseto vetor ingere os fagócitos infectados durante o repasto sanguíneo; 6- amastigotas são liberadas no intestino do inseto; 7- transformação de amastigotas em promastigotas; 8- migração para a região anterior do intestino médio e probóscide (adaptado de VERMELHO *et al.*, 2014).

A anfotericina B (desoxicolato de anfotericina B) é a segunda escolha como recurso terapêutico. Hipotensão, febre, calafrios, vômitos, cefaleias e náuseas são alguns dos inúmeros eventos adversos que ele promove (BRASIL, 2016). A anfotericina B atua no parasita por meio de interação com o ergosterol presente na membrana plasmática. Tal interação leva a modificações do equilíbrio osmótico e a permeabilidade da membrana. Todavia, a droga também é capaz de interagir com o colesterol presente nas membranas das células do hospedeiro vertebrado. Esta interação responsável pela toxicidade do medicamento. Com o propósito de reduzir alguns sintomas acarretados pela toxicidade, especialmente para o tecido renal onde há maior eficácia na absorção, a anfotericina B na forma lipossomal é recomendada (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004).

Entretanto, o elevado custo gera a redução da acessibilidade a este medicamento (DUPONT *et al.*, 2002).

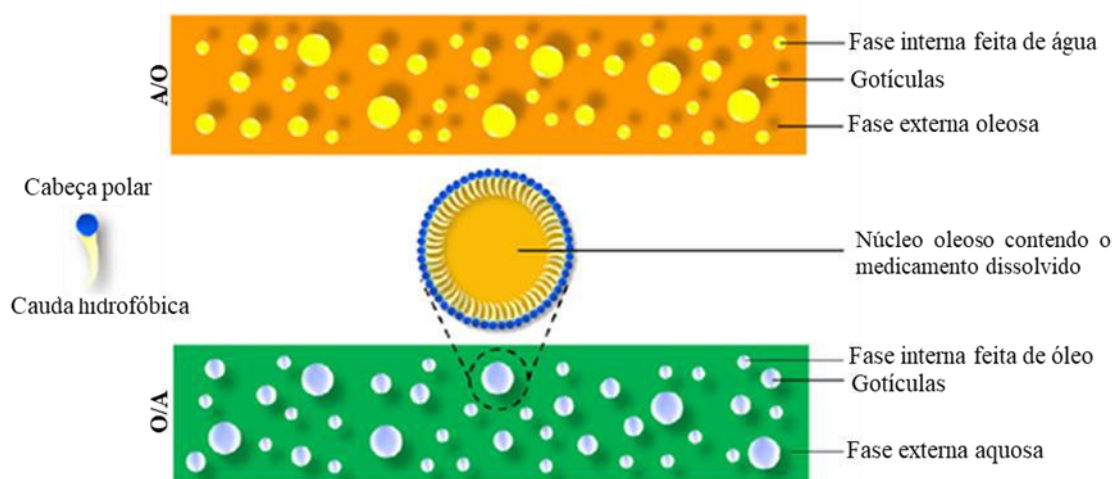
#### 1.4. Gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* é constituído por diferentes espécies, incluindo *Citrus reticulata* (CR), *Citrus limonum* (CL) e *Citrus aurantium* (CA) popularmente conhecidas como tangerina, limão e laranja-azeda, respectivamente. A produção dos frutos cítricos, em escala mundial, é em torno de 102 milhões por ano (JUNIOR *et al.*, 2005). No Brasil, a maior parte das plantações está presente na região sudeste, especialmente no Estado de São Paulo, sendo 62% de tangerina, 79% de limão e 80% de laranja (IBGE, 2016). Estas frutas estão presentes na dieta da população e os benefícios do seu consumo já é descrito. As frutas do gênero *Citrus* são ricas em vitaminas, fibras e metabólitos secundários representados pelos flavonóides, terpenos, dentre outros (COUTO *et al.*, 2010). Extratos de *Citrus* são reconhecidos por terem diversas atividades biológicas, incluindo anti-*Leishmania*. Fokialakis *et al.* (2007) avaliou a atividade anti-*Leishmania* do extrato das folhas de *C. aurantium*. A concentração necessária para inibir 50% do protozoário foi de 13 µg/mL. Conseqüentemente, ressaltando a atividade da planta contra o parasita.

Na literatura apresenta diversos estudos descrevendo diferentes atividades biológicas relacionadas aos óleos essenciais. Na natureza, eles apresentam a função protetora para as plantas, além de auxiliar na atratividade de seres vivos responsáveis pela polinização (BAKKALI *et al.*, 2008). Já em humanos, eles possuem diversas propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, antibacteriana e antiprotozoários (FERRARINI *et al.*, 2008). Essas atividades são atribuídas a diversas classes químicas encontradas em OEs, tais como substâncias fenólicas e terpenos. Dentro da classe química dos terpenos, o limoneno (monoterpeno) tem grande destaque. Este terpeno é majoritariamente encontrado em frutos cítricos, sendo responsável pelo aroma característico. Ao limoneno diversas atividades biológicas têm sido atribuídas, incluindo contra *Leishmania* (BACANLI *et al.* 2018). Segundo a pesquisa de Arruda *et al.* (2009), o tratamento de camundongos fêmeas C57BL/ 6 infectados com *L. amazonensis*, utilizando o limoneno levou à cicatrização das lesões em 67-86% dos animais e reduziu de forma dose-dependente a viabilidade do parasita.

### 1.5 Nanoemulsões como estratégia terapêutica

Nos últimos anos, a nanociência vem apresentando grande avanço. Em consequência da sua multidisciplinaridade, a mesma pode ser empregada em vários âmbitos, desde a formulação de próteses e implantes estudados na engenharia de tecido até a criação de diagnósticos com o auxílio de nanosensores que aceleram o processo e torna-o mais sensível as alterações reduzindo o erro (BERGMANN *et al.*, 2008). As nanoemulsões (NE) são sistemas nanométricos apresentando diâmetro médio das gotículas em torno de 500 nm. Elas podem ser designadas como bifásicas (figura 3), onde sua formulação ocorre com gotículas de óleo dispersas em uma fase aquosa (O/A) e o contrário também ocorre (A/O), ou múltiplas nanoemulsões (A/ O/ A ou O/ A/ O). A estabilidade entre os dois líquidos imiscíveis é mantida com a utilização de um surfactante apropriado (SINGH *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Micela polimérica (Adaptado de SINGH *et al.*, 2017)

Esse sistema possui diversas funcionalidades, além de melhorar a solubilidade, propicia o carregamento de bioativos. No trabalho de Santos *et al.* (2017) foi realizado uma nanoemulsão composta por anfotericina B e avaliado sua atividade contra a infecção de *L. infantum* em camundongos BALB/c. Com a administração de 2 mg/kg da nanoformulação, houve a atenuação da carga parasitária no baço e no fígado de maneira significativa. Em contrapartida, o tratamento com a mesma concentração do medicamento anfotericina B empregado nos hospitais provocou toxicidade aguda nos camundongos e, em vários deles, resultou em óbito.



Os poloxamer ou Pluronic (PL) são copolímeros compostos por óxido de etileno (PEO) e óxido de propileno (PPO) em sua cadeia [(PEO)<sub>100</sub>(PPO)<sub>65</sub>(PEO)<sub>100</sub>]. É um dos surfactantes mais utilizados no desenvolvimento de sistemas carreadores devido as suas características em formar micelas, fácil manuseio e solubilizar compostos que apresentam hidrofobicidade (BOHORQUEZ *et al.*, 1999). O PL foi utilizado para a formulação de uma nanoemulsão contendo docetaxel, quimioterápico utilizado para tratamento contra diversos tipos de câncer, com o propósito de desenvolver uma formulação mais estável e aumentar sua eficácia. Os resultados mostraram melhores atividades citotóxicas ( $13.55 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ ) contra a linhagem celular de carcinoma mamário (MCF-7) e nenhum tipo de toxicidade hepática e renal com a administração oral de 20 mg/kg em camundongos Suíços (VERMA *et al.*, 2014).

A leishmaniose é uma doença bastante incidente e predominante em diversos locais no mundo, especificamente, onde não apresentam recursos econômicos e sociais adequados para atender toda a população. Outro fator primordial é o tratamento desta doença negligenciada. Todos os medicamentos escolhidos para serem utilizados nos hospitais apresentam uma alta toxicidade para parasita e para célula hospedeira, resultando em diversos efeitos colaterais nos seres humanos. Desta forma, em alguns casos, sucedendo a descontinuidade pelos pacientes. Em vista disso, a busca de novos alvos terapêuticos vem sendo cada vez mais estudado. O gênero *Citrus*, além de ser facilmente encontrado e com baixo custo, apresenta atividades contra diversos microrganismos, incluindo *Leishmania* spp. Com a finalidade de melhorar seu perfil citotóxico, os óleos essenciais de *Citrus reticulata*, *C. aurantium* e *C. limonum* foram adicionados em nanoformulações. A nanociência já vem sendo aplicada em numerosos campos da ciência devido a sua vasta aplicabilidade. As nanoemulsões são ótimos sistemas carreadores de fármacos e apresentam fácil escalonamento comparado aos outros nanosistemas. O poloxamer (Pluronic<sup>®</sup> F127) apresenta uma facilidade no manuseio e uma excelente biocompatibilidade, por isso foi escolhido para a formulação das micelas poliméricas. Neste estudo, propomos desenvolver nanoemulsões contendo os OEs de *Citrus* e avaliar a atividade contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar e comparar o efeito anti-*L. infantum* de óleos essenciais de *C. aurantium*, *C. limonum* e *C. reticulata* e suas nanoemulsões.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a. Analisar o perfil fitoquímico dos OEs de *Citrus*;
- b. Desenvolver nanoemulsões (micelas poliméricas) carregadas com os OEs;
- c. Avaliar a atividade dos OEs e suas nanoemulsões contra formas promastigotas de *L. infantum*;
- d. Avaliar a citotoxicidade dos OEs e suas nanoemulsões em macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- e. Analisar o efeito hemolítico dos OEs e suas nanoemulsões.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.3 Reagentes

Dimetil Sulfóxido (DMSO) foi adquirido na empresa ISO FAR (Rio de Janeiro, Brasil). Soro fetal bovino inativado (SFB) foi obtido na LGC Biotecnologia (São Paulo, Brasil). *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), resazurina, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e anfotericina B foram obtidos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

#### 2.4 Óleos essenciais

Os OEs de *C. aurantium*, *C. limonum* e *C. reticulata* foram adquiridos comercialmente (Entrefolhas, Nova Friburgo/RJ). Uma solução estoque (10 mg/mL) foi preparada com DMSO e mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração (4°C) até a utilização nos ensaios analíticos e biológicos.

#### 2.5 Análise química dos OEs de *Citrus*

A análise do conteúdo dos OEs de *Citrus* foi realizada empregando um sistema para cromatografia gasosa Shimadzu QP5050A equipado com um espectrômetro de massa, aplicando as seguintes condições: coluna: DB-5MS (30 m de comprimento X 0,25 mm de diâmetro interno X 0,25 µm de espessura do filme composto de 5% fenilmetilpolisiloxano), conectado a um detector de íon operando em modo de impacto eletrônico à 70 eV; o gás de arraste foi hélio (fluxo 1 mL/min), modo split com proporção de 1:5 e volume de injeção de 0,5 µL (em hexano); as temperaturas do injetor e da fonte de íon foram de 250°C e 280°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada em 60°C, com um aumento de 3°C/min, até 240°C. Para o cálculo dos índices de retenção foi injetada uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C7-C26) na mesma coluna e condições acima descritas para a cromatografia em fase gasosa. A identificação dos constituintes dos óleos foi feita baseada nos índices de retenção (ADAMS, 2007) e por comparação dos espectros de massa com pesquisa em computador usando as bibliotecas NIST21 e NIST107. As concentrações das

substâncias foram calculadas a partir das áreas dos picos da cromatografia gasosa e organizadas por ordem de eluição (AZEVEDO *et al.*, 2013).

## 2.6 Preparação das nanoemulsões

As nanoemulsões foram preparadas segundo os procedimentos descritos por Siqueira *et al.* (2017) com algumas adaptações. Inicialmente, foi preparada uma solução com poloxamer (Pluronic<sup>®</sup> F-127) 10% em água ultrapura. A solução de poloxamer foi deixada em repouso *overnight* em refrigeração (4°C). Posteriormente, a solução foi submetida à ultrasonicação (UP QR500, Eco-sonics) em modo pulsador 1, potência 60 por 5 min e, em seguida, filtrada (MILLEX<sup>®</sup> GV, 0,22 µm). Os OEs (5 mg/mL) foram adicionados à solução de poloxamer, e a incorporação às micelas foi realizada após 15 min em banho de ultrassom 50 W, 60 Hz (modelo NI1202, Nova Instruments).

## 2.7 Caracterização das nanoemulsões

Os parâmetros índice de polidispersão (PDI) e o tamanho de gota das nanoemulsões foram medidos através do espalhamento da luz dinâmica, utilizando o equipamento Zetasizer Nano<sup>®</sup> (modelo S90, Malvern Instruments). Cada nanoemulsão foi diluída em água ultrapura (1:100) antes da realização das análises (SIQUEIRA *et al.*, 2017). As características sensoriais, coloração e separação de fases, foram observadas durante toda a utilização das formulações.

## 2.8 Cultura de células

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) foram cedidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC/FIOCRUZ). Os parasitas foram cultivados por meio de transferências semanais a 26°C em meio PBHIL suplementado com 10% de SFB (RODRIGUES *et al.*, 2010). Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram mantidos em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (GARCIA *et al.*, 2017).

## 2.9 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e do CI<sub>50</sub>

A determinação da concentração mínima inibitória foi realizada pelo método de diluição em microplaca. Formas promastigotas de *Leishmania* (10<sup>6</sup> parasitas/mL) foram incubadas em diferentes concentrações dos OEs (15,6 a 500 µg/mL) e suas nanoemulsões (9,7 a 1250 µg/mL). Controles positivos de crescimento foram realizados utilizando parasitas não tratados. Após o período de incubação (48 h a 26°C), foram adicionados 25 µL de resazurina (500 µM) a cada poço. A viabilidade dos parasitas foi determinada por espectrofotometria (SpectraMax M5, Molecular Devices) a 490 e 595 nm (ROLÓN *et al.*, 2006). Os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) foi calculada com base no comportamento da curva dose-resposta.

## 2.10 Ensaio da concentração mínima citotóxica (CMC) em macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos RAW 264.7 foram transferidas para placas de 96 poços na concentração de 10<sup>6</sup> céls/mL. Em seguida, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações dos OEs de *Citrus* (31,35 a 1000 µg/mL) e suas nanoemulsões (31,25 a 2000 µg/mL). Após 48 h de tratamento, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL), conforme descrito por Mosmann (1983). Com os dados obtidos, foi determinado o índice de seletividade (IS) com a razão entre a CC50 para RAW 264.7 e CI50 para protozoários. A viabilidade celular foi determinada por espectrofotometria a 570 nm. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em triplicata. A porcentagem de viabilidade foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Abs amostra} \times 100}{\text{Abs controle positivo}}$$

## 2.11 Ensaio de hemólise

A atividade hemolítica foi realizada segundo descrito por Rodrigues *et al.* (2015). Os OEs de *Citrus* e suas nanoemulsões foram diluídas em tampão fosfato, pH 7,2 nas concentrações de 50 a 800 µg/mL e 56,25 a 1800 µg/mL, respectivamente. Uma

suspensão com hemácia (4%) em PBS foi preparada a partir do sangue coletado de um doador voluntário (O Rh+). Posteriormente, 80 µL desta suspensão foram transferidos para microplacas, onde então foram adicionados de 20 µL das amostras previamente diluídas. Após 1 h de incubação a 37°C, a reação foi interrompida com a adição de 200 µL de água destilada nos poços com o controle positivo (100% de hemólise) ou adição do mesmo volume de PBS aos demais poços. Em seguida, as microplacas foram centrifugadas a 2500 RPM por 10 minutos, o sobrenadante transferido para uma nova microplaca e a absorbância adquirida a 540 nm. Os ensaios hemolíticos foram realizados em triplicata. A porcentagem de hemólise foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\text{hemólise (\%)} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs controle negativo}}{\text{Abs controle positivo} - \text{Abs controle negativo}} \times 100$$

## 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1. Cromatografia gasosa dos OEs

Com a finalidade de analisar os componentes presentes nos OEs, foi realizado as análises por CG-EM. Os resultados obtidos mostraram um componente majoritário em comum, o limoneno (Tabela 1). Diversos estudos relatam que as espécies do gênero *Citrus* contêm este monoterpeneo como maior constituinte em seus OEs (TIRADO *et al.*, 1995; BERTUZZI *et al.*, 2013; AYOUB *et al.*, 2018). As concentrações de limoneno encontradas no presente estudo foram 80,86% (CR), 60,18% (CL) e 82,16% (CA). No estudo de Bourgou *et al.* (2012) foi avaliada a composição química de vários OEs extraídos de frutas cítricas, incluindo *C. reticulata*, *C. limonum* e *C. aurantium*. Os resultados mostraram a predominância do limoneno em concentrações que variaram entre 51,81% a 69%, 37,63% a 69,71% e 67,9% a 90,95% para os OEs de *C. reticulata*, *C. limonum* e *C. aurantium*, respectivamente. O alto teor de limoneno em OEs tem sido relacionado às atividades biológicas dos mesmos. De fato, o limoneno de forma isolada mostra atividade contra bactérias, fungos, câncer, etc (ARRUDA *et al.*, 2009). Graebin *et al* (2010) demonstrou que o limoneno, isoladamente, apresenta atividade contra formas promastigotas de *L. braziliensis* com o  $CI_{50}$  de 876.2  $\mu$ M. Ainda, outros 14 novos compostos sintetizados a partir do limoneno apresentaram melhorias na sua atividade.

**Tabela 1.** Análise dos óleos essenciais de *Citrus* por cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS).

Componentes	Rt	CR (%)	CL (%)	CA (%)
$\alpha$ -Pinoeno	5,7	3,85	3,23	2,96
$\beta$ -felandreno	6,8	-	-	1,60
Biciclo[3,1,1]heptano, 6,6-dimetil-2-metil	6,9	-	17,44	3,41
$\beta$ -Mirceno	7,2	5,46	2,69	5,83
D-Limoneno	8,7	80,86	60,18	82,16
$\gamma$ -Terpineno	9,6	9,83	6,72	4,04

Rt: tempo de retenção; CR: *C. reticulata*; CL: *C. limonum*; CA: *C. aurantium*

## 4.2. Caracterização das nanoemulsões

Durante o processamento, o tensoativo age reduzindo as tensões superficiais, melhorando a homogeneização entre as fases e auxiliando na estabilidade (KOURNIATIS *et al.*, 2010). O poloxamer (Pluronic® F-127) apresenta vasta aplicabilidade nas indústrias, baixo custo e facilidade da formulação (MENDONÇA *et al.*, 2016). O grupo de Singh (2017) desenvolveu micelas poliméricas com Pluronic® F-127 recoberta com quitosana e, em seguida, enriqueceu com Anfotericina B (Cs-PF-AmB-M). A análise farmacocinética mostrou que, após 5 minutos, a concentração plasmática máxima (C<sub>max</sub>) da Cs-PF-AmB-M foi menor que os controles. Foi proposto que após a administração intravenosa, os macrófagos fagocitaram mais rápido as micelas e mantiveram por um longo período a concentração plasmática do fármaco.

O desenvolvimento de nanoemulsões (NE) foi utilizado como estratégia para melhorar a solubilidade e estabilidade dos OEs. Ainda, era pretendida uma possível melhora no perfil de atividade dos mesmos nos ensaios de atividade anti-*Leishmania*. A tabela 2 mostra a caracterização das nanoemulsões obtidas. Podemos observar que os tamanhos de gota obtidos para todas as amostras foram inferiores a 500 nm e, com exceção da NECA, todas obtiveram tamanhos menores do que a NE vazias (< 306,8 nm). Essas diferenças entre os tamanhos de cada NE podem estar relacionadas com alterações na formação das micelas durante o processo de sonicação, porém, mesmo assim encontram-se dentro do diâmetro estipulado de até 500 nm. As características sensoriais observadas mostram que as NE obtiveram uma coloração clara (transparente) e sem nenhum tipo de precipitação, tais particularidades podem ser justificadas pelo pequeno tamanho da gotícula e a inserção adequada do óleo essencial na formulação, respectivamente (SINGH *et al.*, 2017).

O índice de polidispersão (PDI) teve valores menores que o controle, o que significa que as micelas apresentam uma distribuição dos tamanhos das gotículas mais uniformes (SINGH *et al.*, 2017). A variação do PDI indica essas alterações no diâmetro. Quando o PDI for mais próximo de 1, as partículas serão mais heterogêneas. De outro modo, quanto mais próximo de zero for o PDI, mais monodispersas (COELHO *et al.*, 2017). O PDI encontrado nas nanoformulações contendo 5% dos OEs de CR, CL e CA foi de 0,341; 0,382 e 0,393, respectivamente (tabela 2). As micelas de Pluronic® F-127



com concentrações de  $1.59 \times 10^{-3}$  M e  $3.9 \times 10^{-3}$  M do anti-inflamatório Cetoprofeno apresentou um PDI de 0,34 e 0,32; respectivamente (LEONTIEŞ *et al.*, 2017).

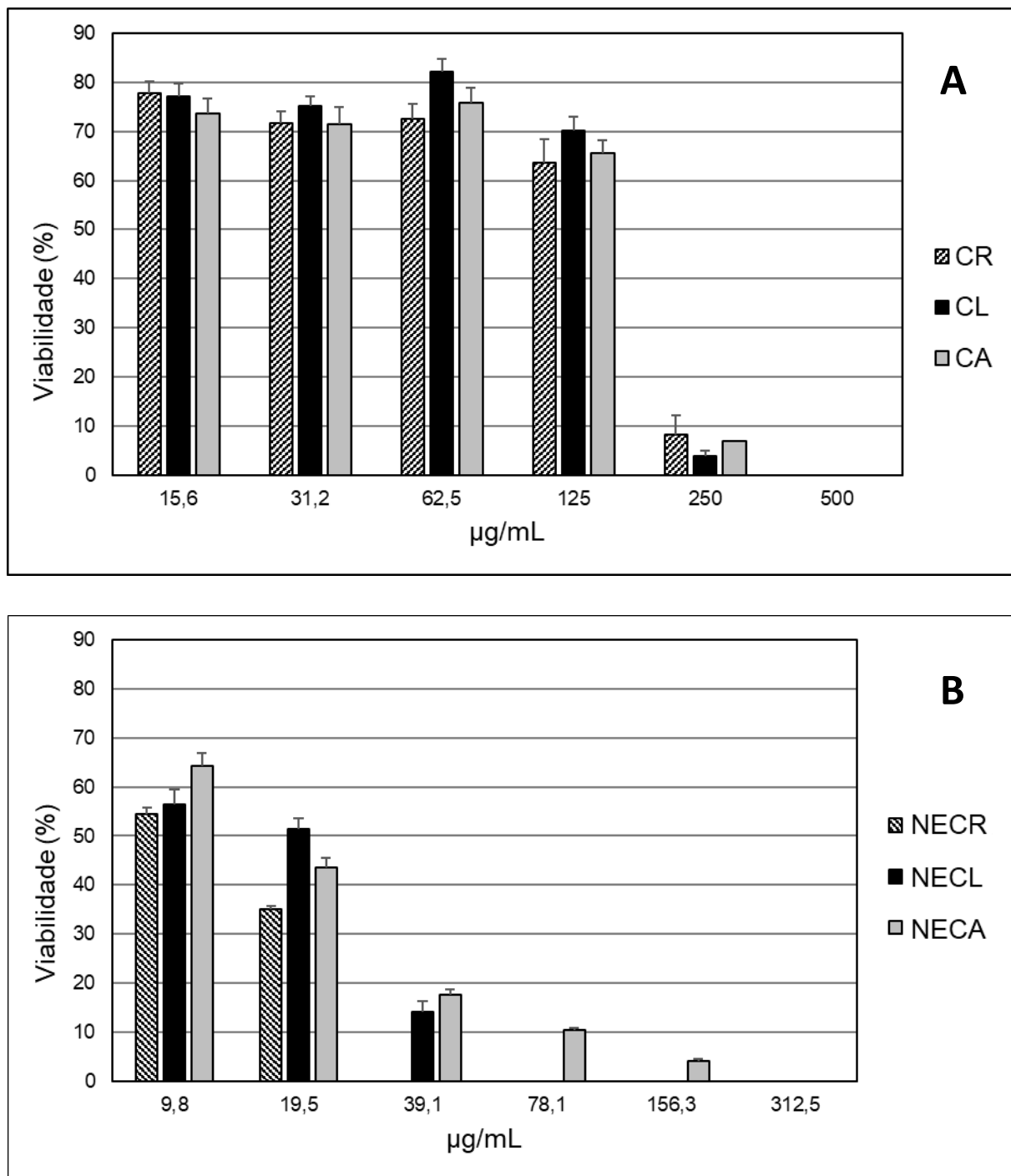
**Tabela 2:** Caracterização das nanoemulsões dos óleos essenciais de *Citrus* spp. As leituras foram realizadas no Zetasizer Nano®.

Amostras	Tamanho da gota	PDI	Características sensoriais
NE vazia	306,8 nm	0,557	Clara, sem separação de fase
NECR	281,6 nm	0,341	Clara, sem separação de fase
NECL	275,4 nm	0,382	Clara, sem separação de fase
NECA	322,3 nm	0,393	Clara, sem separação de fase

PDI: índice de polidispersão; NE: nanoemulsão; CR: *C. reticulata*; CL: *C. limonum*; CA: *C. aurantium*

### 4.3. Atividade anti-*Leishmania*

Os OEs e suas nanoemulsões apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L. infantum*. Como pode ser observado na figura 5A, a concentração mínima capaz de inibir os parasitas foi de 250 µg/mL (CMI). A concentração dos OEs *C. reticulata*, *C. limonum* e *C. aurantium* necessária para inibir 50% das promastigotas (CI<sub>50</sub>) foram iguais a 156,7; 163,6 e 158,7 µg/mL, respectivamente. No entanto, é importante observar que a atividade das nanoemulsões dos OEs de *C. reticulata* (NECR), *C. limonum* (NECL) e *C. aurantium* (NECA) foram mais promissoras com CMI iguais a 19,5; 39,1 e 156,3 µg/mL, respectivamente (Figura 5B). A partir do comportamento das curvas dose-resposta, foram obtidas CI<sub>50</sub> iguais a 11,7; 19,5 e 16,9 µg/mL, respectivamente. Segundo os dados expressos na tabela 3, as nanoemulsões apresentaram uma redução de aproximadamente 10 vezes a CI<sub>50</sub>. A CMI da anfotericina B, droga de referência neste estudo, para formas promastigotas de *L. infantum* foi de 1 µg/mL (CI<sub>50</sub> = 0,95 µg/mL). Não foi observado efeito inibitório quando os parasitas foram tratados com a nanoemulsão vazia.



**Figura 5.** Efeito inibitório dos óleos essenciais e das nanoemulsões de *Citrus spp.* sobre *Leishmania infantum*.

A CMI foi determinada após a incubação de formas promastigotas com diferentes concentrações dos OEs por 48h, a 27°C. Resazurina (0,005% em PBS, pH 7,2) foi utilizada como indicador da viabilidade celular. NE: nanoemulsão; CR: *C. reticulata*; CL: *C. limonum*; CA: *C. aurantium*. **(A)** Efeito inibitório dos óleos essenciais; **(B)** Efeito inibitório das nanoemulsões dos OEs.

**Tabela 3. Atividade contra formas promastigotas de *L. infantum* dos óleos essenciais e nanoemulsões de *Citrus* spp.** A concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração Inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) dos óleos essenciais foram determinadas por espectrofotometria, utilizando resazirina como indicadores.

Óleos essenciais	CMI (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
CR	250	156,7
CL	250	163,6
CA	250	158,7
NECR	19,5	11,7
NECL	39,1	19,5
NECA	156,3	16,9

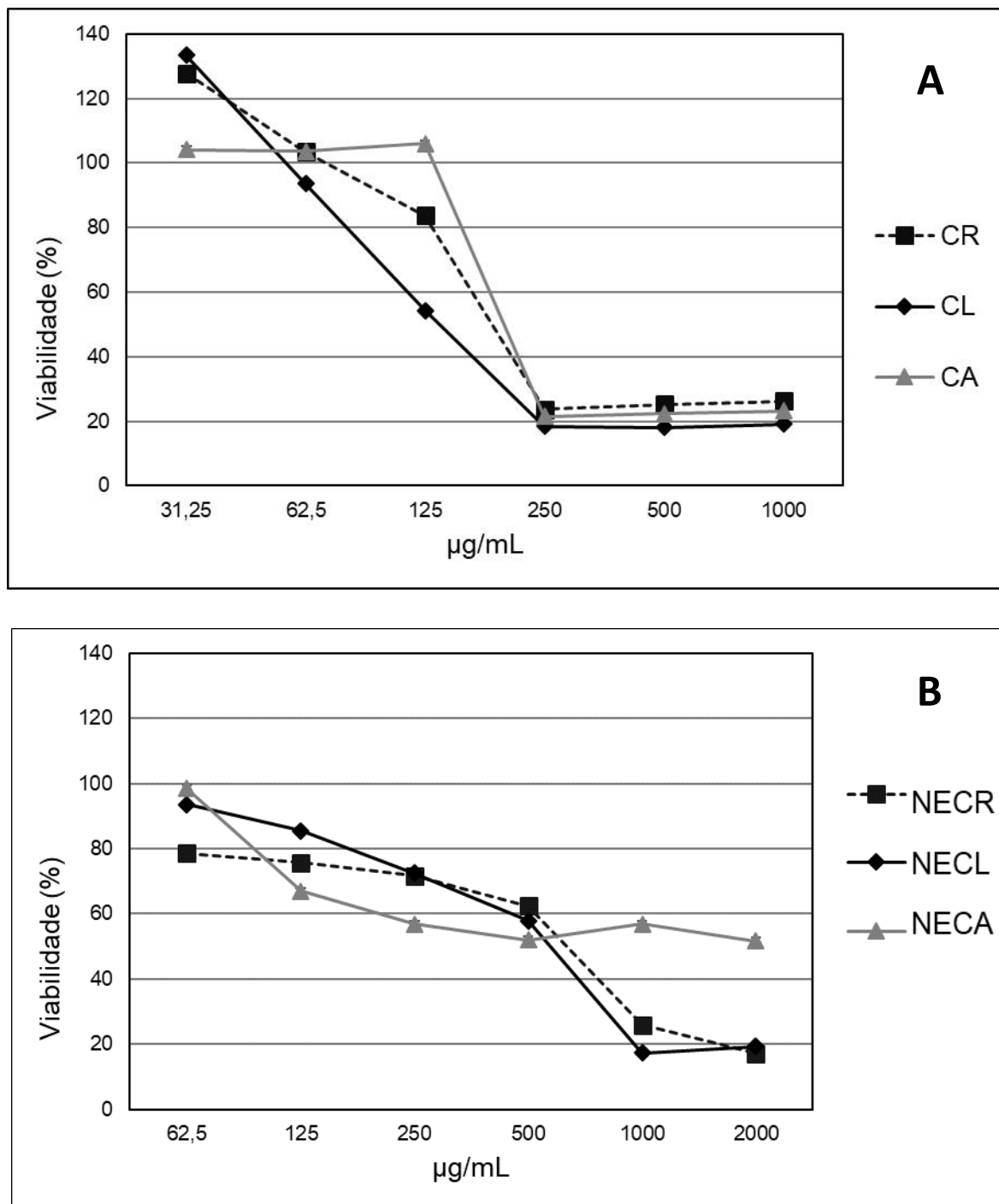
CR: *Citrus reticulata*; CL: *Citrus limonum*; CA: *Citrus aurantium*; NE: Nanoemulsão.

No estudo de Baldissera *et al.* (2013) foi desenvolvida uma nanoemulsão contendo o óleo de andiroba e aroeira. Foi feita uma diluição, em DMSO, com 0,5% dos óleos e nanoformulação com a mesma concentração. Formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* foram incubadas com os óleos puros e suas nanoemulsões. Após 1 h de tratamento, foi observado que na concentração mais baixa dos óleos puros de andiroba e aroeira houve uma redução de 66% e 63% na viabilidade, respectivamente. Em contrapartida, a quantidade de tripomastigotas diminuiu 94% e 81% quando tratadas com as nanoemulsões destes óleos. No trabalho de Siqueira *et al.* (2017) foi desenvolvida, utilizando óleo de cravo e pluronic, uma nanoformulação contendo o composto de coordenação ftalocianina de zinco (ZnPc) para ser utilizado na terapia fotodinâmica contra *L. amazonensis*. A CI<sub>50</sub> obtida a partir da ZnPc livre foi de 3,71 µg/mL, já a sua nanoemulsão apresentou atividade em 0,45 µg/mL. Essas informações reforçam que há uma melhora na atividade das amostras nanoemulsionadas, podendo ser ocasionada pela proteção da estrutura dos compostos contra a sua oxidação e degradação, mas também devido a uma maior penetração na célula alvo ocasionada pela melhor interação entre a superfície da membrana da célula e o nanossistema.

#### 4.4. Atividade citotóxica e IS

Os OEs CR, CL e CA apresentaram citotoxicidade quando testados em macrófagos RAW 264.7. Na concentração de 250 µg/mL, os macrófagos tratados apresentaram uma viabilidade em torno de 20% (Figura 6A). Em contrapartida, ao avaliarmos os OEs nanoemulsionados na mesma concentração, as células de linhagem apresentaram mais de 50% de viabilidade (Figura 6B). A concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) de CR, CL e CA foram iguais a 198,2; 141,6 e 208,5 µg/mL, respectivamente. Quando as suas respectivas nanoemulsões foram avaliadas, obtivemos CC<sub>50</sub> iguais a 662,1; 599,5 e 497,8 µg/mL. Tais resultados mostram que a utilização de nanosistemas foi uma boa estratégia para diminuir o perfil citotóxico dos OEs. Cabe salientar que a NE vazia não apresentou citotoxicidade. Quando avaliada, a droga de referência anfotericina B não inibiu a linhagem RAW 264.7 na maior concentração testada deste estudo (1 µg/mL), porém, dados anteriores do laboratório mostram um CC<sub>50</sub> de 11,07 µg/mL (GARCIA *et al.*, 2017).

Um critério relevante na procura de compostos com atividades terapêuticas é determinar se o mesmo apresenta atividades tóxicas para o parasita e para as células do hospedeiro. O índice de seletividade avalia essa relação, uma vez que quanto maior for a razão, maior a atividade contra o protozoário e, portanto, menos seletiva para os macrófagos. Os resultados apresentados na tabela 4 mostram que todos os OEs apresentam baixa seletividade para os parasitas, tendo em vista apresentarem IS iguais a 0,9 (CL) e 1,3 (CR e CA). Segundo Katsuno *et al.* (2015) IS superiores a 10 são desejáveis e categorizam drogas como mais seguras. Neste contexto, pudemos observar que as nanoemulsões obtiveram resultados mais promissores. Em especial, NECR se mostrou bastante seletivo para *L. infantum*, com IS igual a 56,6. Considerando o CC<sub>50</sub> de 11,07 da anfotericina B do trabalho de Garcia (2017), o IS seria em torno de 11, menor que as nanoemulsões deste estudo.



**Figura 6. Efeito citotóxico dos óleos essenciais e das nanoemulsões de *Citrus* spp. sobre macrófagos RAW 264.7.** A CMC foi determinada através da incubação de macrófagos RAW 264.7 com diferentes concentrações dos OEs a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. A viabilidade celular foi obtida por espectrofotometria a 570 nm utilizando sal de tetrazólio (MTT, 5 mg/mL). NE: nanoemulsão; CL: *Citrus limonum*; CR: *Citrus reticulata*; CA: *Citrus aurantium*. (A) Atividade citotóxica dos óleos essenciais; (B) Atividade citotóxica das nanoemulsões dos OEs.

**Tabela 4.** Índice de seletividade (IS) dos OEs de *Citrus* e nanoemulsões.

Óleos essenciais	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS
CR	156,7	198,2	1,3
CL	163,6	141,6	0,9
CA	158,7	208,5	1,3
NECR	11,7	662,1	56,6
NECL	19,5	599,5	30,7
NECA	16,9	497,8	29,5

NE: nanoemulsão; CR: *C. reticulata*; CL: *C. limonum*; CA: *C. aurantium*; CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória de 50%; CC<sub>50</sub>: Concentração Citotóxica de 50%.

O estudo de Garcia *et al.* (2017) mostrou que o extrato hexânico de *Citrus sinensis* apresenta atividade CC<sub>50</sub> sobre macrófagos RAW 264.7 igual a 86,17 µg/mL, enquanto o seu CI<sub>50</sub> contra formas promastigotas de *L. amazonensis* foi de 25,91 µg/mL (IS = 3,32). Jung *et al.* (2007) aborda em seu estudo a atividade do extrato metanólico de *C. reticulata* em RAW 264.7. Nele, diferentes concentrações foram testadas e mesmo na maior delas (100 µg/mL) houve mais de 95% de viabilidade celular. Esses estudos evidenciam o efeito citotóxico do gênero *Citrus* sobre macrófagos de linhagem.

No estudo de Carvalho (2014) foi formulado um nanossistema composto pelo extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *Melaleuca leucadendron* e cloridrato de pilocarpina. Na atividade citotóxica, a nanoemulsão composta pela maior quantidade de EEB e pilocarpina (0,05/0,05%) inibiu cerca de 20% dos macrófagos J774. Nanopartículas contendo anfotericina B foram desenvolvidas pelo grupo de Kumar *et al.* (2015) para serem direcionadas a tecidos com macrófagos infectados com *L. donovani*. Os resultados obtidos evidenciaram que a inibição das amastigotas com o medicamento convencional foi menor do que com as partículas nanométricas (74,42% e 93,02%, respectivamente). Com isso, apresentando um maior potencial em sua eficácia terapêutica.

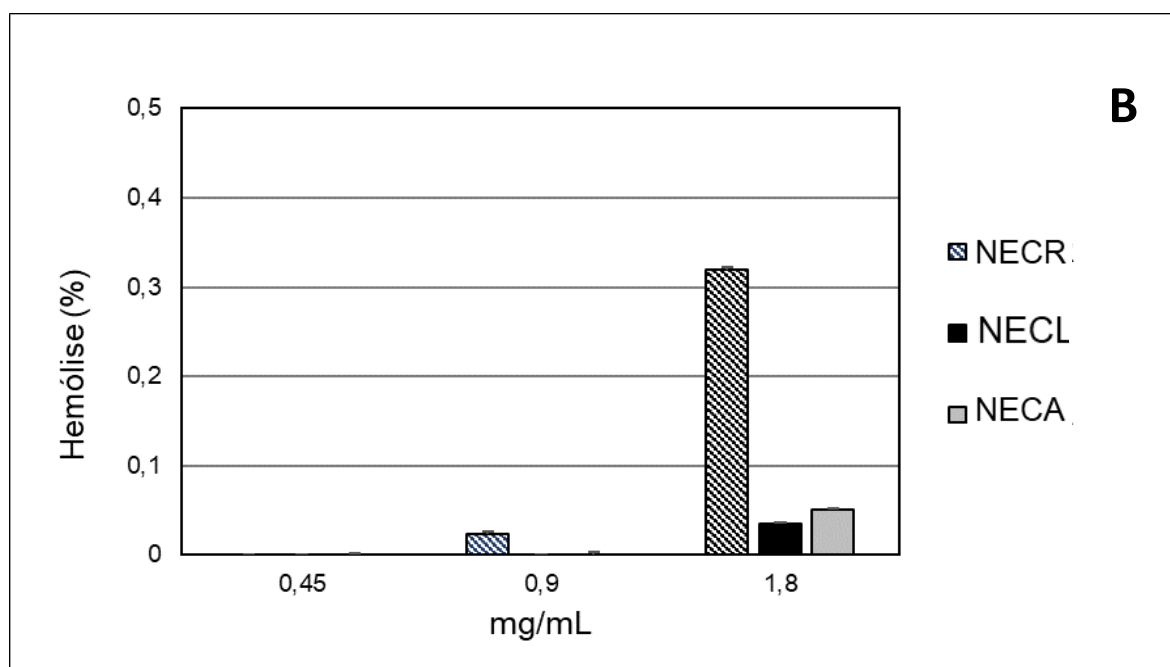
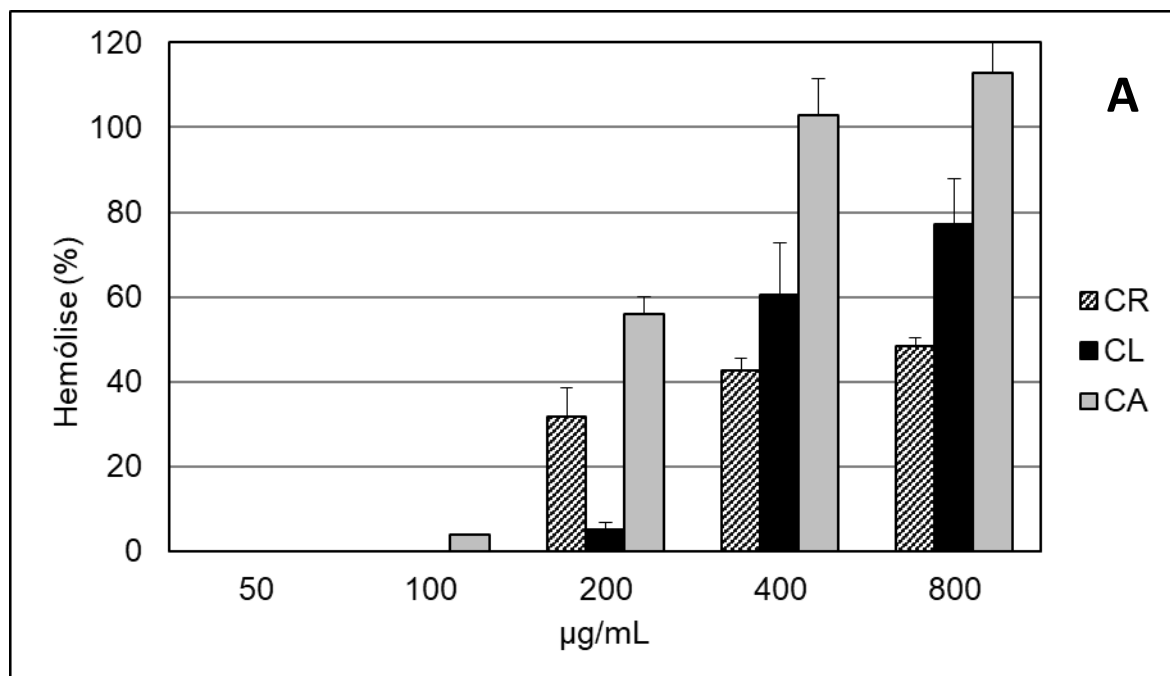
A diferença entre a viabilidade dos OEs puros e nanoemulsionados pode ser explicada pelo fato que tensoativos não-iônicos, como o Pluronic, apresentam a capacidade de não afetar drasticamente a viabilidade das células (HUNG *et al.*, 2005). Destaca-se que os macrófagos conseguem internalizar nanopartículas com tamanhos entre 50 a 500 nm. Desta maneira, com a fagocitose das NE há um aumento na concentração do princípio ativo no meio intracelular. Desta forma, uma maior atividade contra o parasito pode ser observada (SOUZA *et al.*, 2018).

#### 4.5. Atividade hemolítica

Alguns medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, além de ser administrados por via venosa, apresentam muitos efeitos colaterais que acarretam a descontinuação do tratamento. Em vista disto, foi avaliado a citotoxicidade dos OEs em eritrócitos. A figura 7A mostra o potencial hemolítico dos OEs de *Citrus*. Como pode ser observado, dentre as amostras testadas CA apresentou maior perfil hemolítico (superior a 50% em 200 µg/mL). Apesar de CR apresentar atividade hemolítica de aproximadamente 40% quando eritrócitos foram tratados com 200 µg/mL, esta atividade não se elevou tão drasticamente como os outros óleos (CA e CL) em função do aumento da concentração. É importante notar que as nanoemulsões dos OEs, NECR, NECA e NECL, não apresentaram atividade hemolítica (inferior a 1% para todas as amostras) (Figura 7B). Na tabela 5, é possível observar a concentração hemolítica de 100% (CH<sub>100</sub>) e concentração hemolítica de 50% (CH<sub>50</sub>) dos OEs de *Citrus* e das nanoemulsões feito pela análise de regressão da curva dose-resposta.

No estudo de Rodrigues *et al.* (2015) foi avaliado a atividade hemolítica do OE de *Syzygium cumini* (ScEO) e do glucantime, medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose. Com a maior concentração testada, 800 µg/mL, houve mais de 70% de viabilidade das hemácias quando tratadas com o produto natural. Já o glucantime apresentou uma redução de 50% dos eritrócitos em 100 µg/mL. A toxicidade do OE de *Piper sp.* sobre eritrócitos foi avaliada no estudo de Almeida *et al.* (2018). Os resultados mostram que só houve hemólise em 2500 µg/mL, a maior concentração testada. Na dissertação de Cardoso (2015) foi utilizado β-ciclodextrina e OEs das folhas de *C. sinensis* para a formulação de um complexo de inclusão (CIOECS-βCD). No ensaio hemolítico, o mesmo não apresentou mais de 10% de hemólise em 200 µg/mL,

enquanto o controle positivo (Triton X-100) mostrou 100% de atividade em todas as concentrações testadas (10 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 7. Atividade hemolítica dos óleos essenciais e das nanoemulsões.** A atividade hemolítica foi avaliada através da incubação de solução de sangue humano a 5% com diferentes concentrações dos OEs a 37°C por 1 hora. A absorbância foi medida utilizando espectrofotômetro a 540 nm. NE: nanoemulsão; CR: *C. reticulata*; CL: *C. limonum*; CA: *C. aurantium*. (A) Atividade citotóxica dos óleos essenciais; (B) Atividade citotóxica das nanoemulsões dos OEs.



**Tabela 5.** Concentração Hemolítica de 100% (CH<sub>100</sub>) e Concentração Hemolítica de 50% (CH<sub>50</sub>) dos OEs de *Citrus* e nanoemulsões.

Óleos essenciais	CH <sub>100</sub> (µg/mL)	CH <sub>50</sub> (µg/mL)
CR	>800	>800
CL	>800	412,2
CA	400	197,1
NECR	>1800	n.d.
NECL	>1800	n.d.
NECA	>1800	n.d.
NE VAZIA	n.d.	n.d.

NE: nanoemulsão; CR: *C. reticulata*; CL: *C. limonum*; CA: *C. aurantium*; n. d.: não detectado.

A literatura tem demonstrado que o desenvolvimento de nanoemulsões contendo o fármaco é uma estratégia que pode ser empregada para a redução da atividade hemolítica. A elaboração de nanoemulsões contendo miltefosina e tamoxifeno, para administração oral ou parenteral, reduziu o potencial hemolítico, onde em 700 µM o fármaco encapsulado causou 11,55% de hemólise, e o fármaco na forma livre causou 100% (GERASSI, 2016). O efeito da anfotericina B em produzir o desequilíbrio eletrolítico nas hemácias já foi relatado em alguns estudos. Contudo, novas investigações relatam a redução da toxicidade em virtude da proteção das NE contra a lise (SANTOS *et al.*, 2017).

## 5. CONCLUSÃO

- ✓ Os óleos essenciais de *C. aurantium*, *C. limonum* e *C. reticulata* possuem atividade contra formas promastigotas de *L. infantum*;
- ✓ As nanoemulsões destes óleos, desenvolvidas utilizando Pluronic<sup>®</sup> F-127, não apenas apresentaram melhor perfil de atividade frente aos parasitas, mas também demonstraram menor efeito citotóxico para macrófagos e eritrócitos;
- ✓ Tais resultados sugerem os benefícios da aplicação desses nanosistemas objetivando maior eficácia de candidatos a novas drogas;
- ✓ Estudos futuros serão imprescindíveis a fim de avaliar a atividade das amostras frente a formas amastigotas intracelulares de *L. infantum*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALMEIDA, C. A.; AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, I. A.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. *Piper* Essential Oils Inhibit *Rhizopus oryzae* Growth, Biofilm Formation, and Rhizopuspepsin Activity. **Canadian Journal Of Infectious Diseases And Medical Microbiology**, v. 2018, p.1-7, 2018.

ARRUDA, D. C.; MIGUEL, D.C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; KATZIN, A. M.;ULIANA, S. R. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, n. 9, p.643-649, 2009.

AYOUB, A.; FATIMA, K.; MOHAMMED, T.; SANAA, C.; MERIEM, E.; MHAMED, E. K.; REDA, B. M.; HASSAN, A. E.; SANAA, S.; AINANE, T. Chemical characterizations of the aromatic compositions of two *citrus* species: *citrus aurantium* and *citrus reticulata*. **MOJ Drug Des Develop Ther**, v. 2, p. 80–83, 2018

AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; ALMEIDA, C. A.; BIZZO, H. R.; DUARTE, R. S.; TAKAKI, G. M. C.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. Antioxidant and Antimicrobial Activities of 7-Hydroxy-calamenene-Rich Essential Oils from *Croton cajucara* Benth. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1128-1137, 2013.

BACANLI, M.; BAŞARAN, A. A.; BAŞARAN, N. Effects and Usage of a Citrus Compound, Limonene. **Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease**, c. 32, p. 419-424, 2018.

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

BEKHIT, A. A.; EL-AGROUDY, E.; HELMY, A.; IBRAHIM, T. M.; SHAYANDI, A.; BEKHIT, A. E. A. *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 160, p.229-244, 2018.

BERGMANN, B. R. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Cienc. Cult.** v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

BERTUZZI, G.; TIRILLINI, B.; ANGELINI, P.; VENANZONI, R. Antioxidative Action of Citrus limonum Essential Oil on Skin. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

BINH LE, T.; BEAUFAY, C.; BONNEAU, N.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; LECLERCQ, J. Q. Anti-protozoal activity of essential oils and their constituents against *Leishmania*, Plasmodium and Trypanosoma. **ISTE OpenScience**, v. 1, n. 1, 2018.

BOHORQUEZ, M.; KOCH, C.; TRYGSTAD, T. PANDIT, T. A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 216, n. 34-40, 1999.

BOURGOU, S.; RAHALI, F. Z.; OURGHEMMI, I.; TOUNSI, M. S. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-202, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância em saúde. Brasília, Ministério da Saúde, 2016. Disponível em <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_led\\_atual.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_led_atual.pdf)>.

Acesso em 29 novembro 2018.

CARDOSO, K. M. F. **Desenvolvimento e análise farmacológica de um complexo de inclusão a partir de Citrus sinensis (L) Osbeck direcionado para Doença de**

**Alzheimer.** 79 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2015.

CARVALHO, K. V. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* e cloridrato de pilocarpina para o uso potencial como radioprotetor tópico.** Dissertação (Mestrado). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2014.

CASTELLANO, L. R. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. **VITAE Academia Biomédica Digital**, v. 25, p. 1-10, 2005.

COELHO, E. L.; MOURA, C. L.; MAIA, D. S.; ARAÚJO, T. G.; FRANCA, F. C. F.; RICARDO, N. M. P. S.; RIBEIRO, M. E. N. P.; RICARDO, N. M. S. Binary systems of Brij® surfactants with Pluronic® F127 as griseofulvin carrier. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 305-309, 2017.

COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p.15-19, 2010.

DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; BRUNKER, K.; IMAMURA, H.; MÜLLER, S. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Natural *Leishmania* Populations Vary with Genetic Background. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1514, 2012.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p.31-36, 2002.

FERRARINI, S. R.; GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R. F. S.; DIAS, S. O.; ROSA, R. G.; MADEIRA, M. F.; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis of limonene  $\beta$ -amino alcohol derivatives in support of new anti*Leishmanial* therapies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 773-777, 2008.

FOKIALAKIS, N.; Kalpoutzakis E.; Tekwani, B. L.; Khan, S. I.; Kobaisy, M.; Skaltsounis, A. L.; Duke, S. O. Evaluation of the antimalarial and anti*Leishmanial* activity of plants from the Greek island of Crete. **Journal Of Natural Medicines**, v. 61, n. 1, p.38-45, 2006.

GARCIA, A. R. **Estudo in vitro da arginase de *Leishmania infantum* como alvo terapêutico para fitoativos**. Dissertação (Mestrado)– Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

GARCIA, A. R.; AMARAL, A. C. F.; AZEVEDO, M. M. B.; CORTE-REAL, S.; LOPES, R. C.; ALVIANO, C. S.; PINHEIRO, A. S.; VERMELHO, A. B.; RODRIGUES, I. A. Cytotoxicity and anti-*Leishmania amazonensis* activity of *Citrus sinensis* leaf extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p.1780-1786, 2017.

GERASSI, L. R. M. **Nanoemulsão contendo os fármacos Miltefosina e Tamoxifeno com possível aplicação para tratamento da Leishmaniose**. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2016.

GRAEBIN, C. S.; MADEIRA, M. F.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B.; BENITEZ, D.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against *Leishmania* and Trypanosoma. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1524-1528, 2010.

HENAO, H. H.; OSORIO, Y.; SARAVIA, N. G.; GOMEZ, A.; TRAVI, B. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) en un modelo animal de *Leishmaniasis* cutánea americana: aplicación de la luminometría.. **Biomédica**, v. 24, n. 4, p.393-402, 2004.

HUNG, C.-F.; HWANG, T.-L.; CHANG, C.-C.; FANG, J.-Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various

coemulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 197–208, 2005.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/citros>>. Acesso em 07 novembro 2018.

JUNG, K. H.; HA, E.; KIM, M. J.; WON, H.; ZHENG, L. T.; KIM, H. K.; HONG, S. J.; CHUNG, J. H.; YIM, S. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by *Citrus reticulata* extract in RAW 264.7 macrophage cells. **Food And Chemical Toxicology**, v. 45, n. 8, p.1545-1550, 2007.

JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; JUNIOR, J. P. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo, 2005. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/index.php>> Acesso em 06 novembro 2018.

KATSUNO, K.; BURROWS, J. N.; DUNCAN, K, HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C. E.; SCHMATZ, D.; WARNER, P.; SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p.751-758, 2015.

KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R.; GONZÁLEZ, G. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 295-300, 2010.

KUMAR, R.; SAHOO, G.C.; PANDEY, K., Das, V.; Das, P. Study the effects of PLGA-PEG encapsulated Amphotericin B nanoparticle drug delivery system against *Leishmania donovani*. **Drug Deliv.** v. 22, p. 383–388, 2015.

LEONTIEȘ, A. R.; STÎNGĂ, G.; ILIE, C.; ANGHEL, D. F. PHYSICO-CHEMICAL STUDIES ON KETOPROFEN ENCAPSULATED IN PLURONIC F127

NANOMICELLES FOR DRUG APPLICATIONS. **Rev. Roum. Chim**, v. 62, n. 8-9, p. 657-662, 2017.

MENDONÇA, D. V.; LAGE, L. M.R.; LAGE, D. P.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LUDOLF, F.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D.; FARACO, A. A. G.; CASTILHO, R. O.; TAVARES, C. A. P.; BARICHELLO, J. M.; DUARTE, M. C.; COELHO, E. A. F. Poloxamer 407 (Pluronic® F127)-based polymeric micelles for amphotericin B: in vitro biological activity, toxicity and in vivo therapeutic efficacy against murine tegumentary *Leishmaniasis*. **Experimental parasitology**, v. 169, p. 34-42, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; FILHO, P. D.; CORTEZ, A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade anti*Leishmania* do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 61-66, 2006.

Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas, n. 6, fevereiro 2018. Disponível em <<http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34857>>. Acesso em 29 novembro 2018.

RODRIGUES, I.A.; SILVA, B.A.; SANTOS, A.L.S.; VERMELHO, A.B.; ALVIANO, C. S.; ROSA, M.S.S. A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. **Parasitology Research**, v. 106, n. 5, p.1249–1252, 2010.

RODRIGUES, K. A. F.; AMORIM, L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential



oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 160, p.32-40, 2015.

ROLÓN. M.; VEGA, C.; ESCÁRIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p.103-107, 2006.

ROTTINI, M. M. **Ação de óleos essenciais e do  $\alpha$ -bisabolol em ensaios experimentais in vitro com *Leishmania amazonensis***. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

SANTOS, D. C. M., SOUZA, L. S.; TEIXEIRA, E. M.; ALVES, L. L.; VILELA, J. M. C; ANDRADE, M.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, A. P.; FERREIRA, L. A. M.; AGUIAR, M. M. G. A new nanoemulsion formulation improves anti-*Leishmanial* activity and reduces toxicity of amphotericin B. **Journal Of Drug Targeting**, v. 26, n. 4, p.357-364, 2017.

SINGH, P. K.; PAWAR, V. K.; JAISWAL, A. K.; SINGH, Y.; SRIKANTH, C. H.; CHAURASIA, M. BORA, H. K.; RAVAL, K.; MEHER, J. G.; DUBE, A.; CHOURASIA, M. K. Chitosan coated pluronicF127 micelles for effective delivery of amphotericin B in experimental visceral *Leishmaniasis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 105, p. 1220-1231, 2017.

SINGH, Y.; MEHER, J. G.; RAVAL, K.; KHAN, F. A.; CHAURASIA, M.; JAIN, N. K.; CHAURASIA, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SIQUEIRA, L. B. O.; CARDOSO, V. S.; RODRIGUES, I. A.; VAZQUEZ-VILLA, A. L.; SANTOS, E. P.; GUIMARÃES, B. C. L. R.; COUTINHO, C. S. C.; VERMELHO, A. B.; RICCI, E. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmaniaspp*. **Nanotechnology**, v. 28, n. 6, p. 065101, 2017.

SOARES-BEZERRA, J.R.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Bra J Pharm Sci**. v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004..

SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUKUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LOBENBERG R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating *Leishmaniasis*. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p.421-431, 2018.

TIRADO, B.; STASHENKO, E. E.; COMBARIZA, M. Y.; MARTINEZ, J. R. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p. 501-513, 1995.

VERMA, P.; MEHER, J. G.; ASTHANA, S.; PAWAR, V. K.; CHAURASIA, M.; CHOURASIA, M. K. Perspectives of nanoemulsion assisted oral delivery of docetaxel for improved chemotherapy of cancer. **Drug deliv**, v. 23, p. 479–488, 2014.

VERMELHO, A. B.; SUPURAN, C. T.; CARDOSO, V.; MENEZES. D.; SILVA, J. R. A.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F.; RODRIGUES, I. A. *Leishmaniasis*: Possible New Strategies for Treatment. **Leishmaniasis - Trends In Epidemiology, Diagnosis And Treatment**, c. 15, p.351-376, 2014.

World Health Organization: *Leishmaniasis*. Disponível em <<http://www.who.int/Leishmaniasis/en/>>. Acesso em 29 outubro 2018.